



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GENOMİK KARARLILIKTA MAGNEZYUMUN
HÜCRE DÖNGÜSÜ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dua ÖZBİLENLER

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Bedia PALABIYIK

Mayıs, 2016

İSTANBUL

Bu çalışma 06/06/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

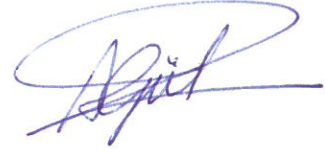
Tez Jürisi:



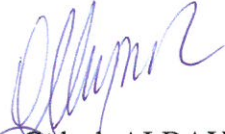
Doç. Dr. Bedia PALABIYIK (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



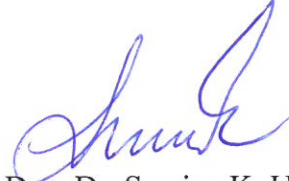
Prof. Dr. Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Ayşegül T. SARIKAYA
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Yard. Doç. Dr. Semian K. UZUNER
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 6683 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tüm yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen ve kahrımı çeken değerli danışmanım Doç. Dr. Bedia PALABIYIK'a çok teşekkür ediyorum.

Çalışmalarım sırasında bana her konuda yardımcı olan Prof. Dr. Ayşegül T. SARIKAYA, Yard. Doç. Dr. Semian KARAER UZUNER, Araş. Gör. Dr. Çağatay TARHAN ve Gülşen UZ'a destekleri için çok teşekkür ediyorum.

Her zaman yanımda olan ve eğitim hayatım boyunca maddi manevi desteğini esirgemeyen annem Dürdane ÖZCAN ÖZBİLENLER'e anlayışı ve sabrı için çok teşekkür ediyorum ve aramızdan erken ayrılan babam Cahit ÖZBİLENLER'i özlemle anıyorum.

Mayıs, 2016

Dua ÖZBİLENLER

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	vi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	vii
ÖZET.....	viii
SUMMARY	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	2
2.1. HÜCRE DÖNGÜSÜ	2
2.2. HÜCRE DÖNGÜSÜNÜN DÜZENLENMESİ.....	3
2.3. MAGNEZYUMUN HÜCRE DÖNGÜSÜNE ETKİSİ.....	5
2.4. GENOMİK KARARLILIKTA HÜCRE DÖNGÜSÜNÜN ÖNEMİ.....	7
2.5. MODEL ORGANİZMA OLARAK <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	7
2.6. DAPI/KALKOFLOR FLORESAN BOYAMA TEKNİĞİ.....	9
2.7. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (GZ-PZR).....	11
3. MALZEME VE YÖNTEM	12
3.1. KULLANILAN IRKLAR	12
3.2. BESİ ORTAMI.....	13
3.3. ÜREME EĞRİLERİNİN ÇIKARILMASI.....	13
3.4. DAPI/KALKOFLOR FLORESAN BOYAMA	13
3.5. TOTAL RNA İZOLASYONU	14
3.5.1. Hücre Sayımı	14
3.5.2. Hücrelerin Yıkanması.....	14
3.5.3. Hücrelerin Parçalanması.....	14
3.5.4. Total RNA'nın İzolasyonu	15
3.5.5. Total RNA'nın Miktar ve Saflık Tayini	16
3.6. cDNA SENTEZİ.....	16

3.7. TOTAL RNA VE cDNA'NIN ELEKTROFORETİK ANALİZİ	19
3.8. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (GZ-PZR)	19
4. BULGULAR	22
4.1. ÜREME EĞRİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI	22
4.2. DAPI/KALKOFOR FLORESAN BOYAMA	23
4.3. TOTAL RNA İZOLASYONU	26
4.3.1. Hücre Sayımı	26
4.4. TOTAL RNA'NIN ELEKTROFORETİK ANALİZİ, MİKTAR VE SAFLIK TAYİNİ.....	27
4.5. cDNA SENTEZİ.....	29
4.6. cDNA'NIN ELEKTROFORETİK ANALİZİ	29
4.7. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU ANALİZİ	30
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	33
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ.....	38

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Ökaryotik hücrelerde hücre döngüsü.	2
Şekil 2.2: Hücre döngüsü düzenleyicilerinin çalışma mekanizması.....	3
Şekil 2.3: Memelilerde hücre döngüsünde görev alan siklin proteinleri ve CDK enzimleri.....	4
Şekil 2.4: Magnezyumun hücre döngüsünün düzenlenmesine etkisi.	5
Şekil 2.5: <i>S. pombe</i> hücrelerinde haploid vegetatif döngü.	8
Şekil 2.6: DNA'nın küçük oluğuna (mavi ve yeşil) bağlanmış DAPI (pembe).	9
Şekil 2.7: Kalkoflor ile boyanmış <i>Saccharomyces cerevisiae</i> hücrelerinde tomurcuk izleri.	10
Şekil 3.1: GZ-PZR plaka düzeni; Standart (Standard): Sulandırılmış kontrol ırk, Kalibratör (Callibrator): Kontrol cDNA'sı, Bilinmeyen (Unknown): GA2 (YEL+10 mM Mg ²⁺ ve YEL+75 mM Mg ²⁺), NTC: cDNA örneği içermeyen kontrol kuyucukları, Normal (Norm): Normalizatör olarak kullanılan <i>act1</i> primerleri, P1: p25 ^{rum1} primerleri.....	21
Şekil 3.2: GZ-PZR termal profil şeması.....	21
Şekil 4.1: Üreme eğrilerinin karşılaştırılması; Sp292 h ⁻ : Kontrol ırk, GA2: İkili mutant ırk.....	22
Şekil 4.2: GA2 (YEL).....	23
Şekil 4.3: 24. saatte GA2 (YEL+75 mM Mg ²⁺).	24
Şekil 4.4: 48. saatte GA2 (YEL+75 mM Mg ²⁺).	24
Şekil 4.5: 24. saatte kontrol ırk (YEL).	25
Şekil 4.6: 48. saatte kontrol ırk (YEL).	25
Şekil 4.7: Total RNA'nın agaroz jel elektrofezindeki görüntüsü; A: GA2 (YEL), B: GA2 (YEL+10 mM Mg ²⁺), C: GA2 (YEL+75 mM Mg ²⁺), D: Kontrol ırk (YEL).	28
Şekil 4.8: cDNA'nın agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü; A: GA2 (YEL), B: GA2 (YEL+10 mM Mg ²⁺), C: GA2 (YEL+75 mM Mg ²⁺), D: Kontrol ırk (YEL).	29
Şekil 4.9: GZ-PZR'de p25 ^{rum1} geninin erime (ayırışma) eğrisi.	30
Şekil 4.10: <i>act1</i> primerlerinin standart eğrisi (verimlilik oranı %99).....	31
Şekil 4.11: p25 ^{rum1} primerlerinin standart eğrisi (verimlilik oranı %108.6).	31

Şekil 4.12: p25^{rum1} geninin ikili mutant ve kontrol ırktaki anlatım düzeyleri arasındaki kat farkını gösteren göreceli miktar tablosu. 10-P1: Kontrol ırk (Kalibratör), 12-P1: GA2 (YEL+10 mM Mg²⁺), 14-P1: GA2 (YEL+75 mM Mg²⁺).....32



TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan ırklar.....	12
Tablo 3.2: <i>S. pombe</i> 'nin üretiminde kullanılan besi ortamları.....	13
Tablo 3.3: Total RNA izolasyon kitinin bileşenleri ve içerikleri.....	15
Tablo 3.4: cDNA izolasyon kitinin bileşenleri ve içerikleri.....	17
Tablo 3.5: cDNA sentezinde kullanılan RNA, primer ve su miktarları.....	18
Tablo 3.6: cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımındaki bileşenler ve miktarları.....	18
Tablo 3.7: Agaroz jel hazırlamak için kullanılan tampon ve çözeltiler.....	19
Tablo 3.8: GZ-PZR'de kullanılan primerler.....	20
Tablo 3.9: GZ-PZR'de primerler için hazırlanan karışım.....	20
Tablo 4.1: Kontrol ve ikili mutant ırkta boy ve nukleusa göre hücre yüzdeleri.....	26
Tablo 4.2: Cedex HiRes ile yapılan hücre sayımında elde edilen veriler.....	27
Tablo 4.3: Total RNA izolasyonu için hücrelerden alınan örnek miktarları.....	27
Tablo 4.4: Total RNA'nın NanoDrop ölçüm sonuçları.....	28
Tablo 4.5: cDNA izolasyonunda kullanılan total RNA miktarları.....	29

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
ACT	: GZ- PZR’de standart olarak kullanılan primer (Aktin)
ALR1	: Mayalarda Mg ²⁺ transportundan sorumlu protein (Alüminyum Direnci)
ALR2	: Mayalarda Mg ²⁺ transportundan sorumlu protein (Alüminyum Direnci)
CDC	: Hücre bölünme döngüsü
cDNA	: Komplementer (tamamlayıcı) DNA
CDK	: Siklin-bağımlı kinaz enzimi
Cip/Kip	: Siklin-bağımlı kinaz inhibitörlerinin oluşturduğu protein ailesi
CKI	: Siklin-bağımlı kinaz inhibitörü
DAPI	: 4',6-diamidin-2-fenilindol dihidroklorür
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNaz	: DNA’nın kesilmesinden sorumlu enzim sınıfı
DTT	: Ditiyotreitol
E2F	: Ökaryotlarda transkripsiyon faktörü
EDTA	: Etilendiamintetrasetik asit
EtBr	: Etidyum bromür
GA2	: <i>S. pombe</i> ’nin Mg ²⁺ taşıma sistemi olmayan mutant ırkı
GZ-PZR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
HC11	: Fare meme epiteli hücre hattı
HL-60	: İnsan promyelositik lösemi hücre hattı
INK4	: Siklin-bağımlı kinaz inhibitörlerinin oluşturduğu protein ailesi
MCF7	: İnsan meme adenokarsinoma hücre hattı
O.D.	: Optik dansite
p25 ^{rum1}	: <i>S. pombe</i> ’nin hücre döngüsünde G1 fazı inhibitörü
p34 ^{cdc2}	: <i>S. pombe</i> ’nin CDK enzimi
p34 ^{CDC28}	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ’nin CDK enzimi
P40 ^{SIC1}	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ’nin hücre döngüsünde G1 fazı inhibitörü
p27 ^{Kip1}	: Memelilerde CDK inhibitörü
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
RNaz	: RNA’nın kesilmesinden sorumlu enzim sınıfı
Sp292	: Yabani <i>S. pombe</i> ırkının lösün, adenin ve urasil mutanı
SYBR Green	: Nükleik asit bağlayıcı floresan boya
TAE	: Tri asetat tamponu
YEA	: Maya özütlü katı besi ortamı
YEL	: Maya özütlü sıvı besi ortamı

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GENOMİK KARARLILIKTA MAGNEZYUMUN HÜCRE DÖNGÜSÜ ÜZERİNE ETKİLERİ

Dua ÖZBİLENLER

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Bedia PALABIYIK

Hücrel sistemlerde en çok bulunan divalent katyon olan magnezyum, DNA replikasyonu ve protein sentezini stimule ettiğinden hücre bölünmesiyle doğrudan ilişkilidir.

Hücre döngüsünde faz geçişleri, siklin ve siklin-bağımlı kinaz (CDK) komplekslerinin aktivasyonu ve deaktivasyonu ile gerçekleştirilir. CDK inhibitörleri (CKI), kinazların aktivitesini durdurarak faz geçişlerini engeller. Düşük magnezyum konsantrasyonunun, CDK inhibitörlerinin anlatımını arttırarak hücre döngüsünün tutuklanmasında rol oynadığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada, magnezyum taşıma sistemi bulunmayan mutant *Schizosaccharomyces pombe* hücrelerinde magnezyum eksikliği ile *S. pombe*'nin G1 fazı inhibitörlerinden p25^{rum1} arasında doğrudan bir korelasyon olup olmadığının incelenmesi hedeflenmiştir. Çalışma sonuçları, p25^{rum1}'in gen anlatımının mutant ırkta kontrol ırka kıyasla azaldığını göstermiştir. Bu sonuç, magnezyum eksikliği ile p25^{rum1} arasında doğrudan bir korelasyon olmadığını düşündürmektedir. Magnezyum ile hücre döngüsü düzenleyicileri arasındaki ilişkilerin daha iyi anlaşılabilmesi için mutant ırkta gen anlatımı profillemesi yapılması gerekmektedir.

Mayıs 2016, 47 Sayfa.

Anahtar kelimeler: *S. pombe*, maya, hücre döngüsü, regülasyon, magnezyum

SUMMARY

M.Sc. THESIS

EFFECTS OF MAGNESIUM ON CELL CYCLE IN GENOMIC STABILITY

Dua ÖZBİLENLER

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Doç. Dr. Bedia PALABIYIK

Magnesium, which is the second most abundant element in cellular systems, is directly involved in cell division, as it stimulates DNA replication and protein synthesis.

Phase transitions in cell cycle is regulated by activation and deactivation of cyclin and cyclin-dependant kinase (CDK) complex. CDK inhibitors stop CDK activity and prevent phase transitions. It's suggested that low magnesium concentration upregulates CDK inhibitors and plays an important role in cell cycle's arrest.

This study aims to see whether there is a direct correlation between magnesium deficiency and *Schizosaccharomyces pombe*'s G1 phase inhibitor p25^{rum1} in mutant *S. pombe* cells that don't have a magnesium transport system. The results have shown that gene expression of p25^{rum1} decreased in mutant cells, compared to control cells. This result suggests that there's no direct correlation between magnesium deficiency and p25^{rum1}. In order to understand the relation between magnesium and cell cycle regulators, it's required to do gene expression profiling in mutant *S. pombe* cells.

May 2016, 47 Pages.

Keywords: *S. pombe*, yeast, cell cycle, regulation, magnesium

1. GİRİŞ

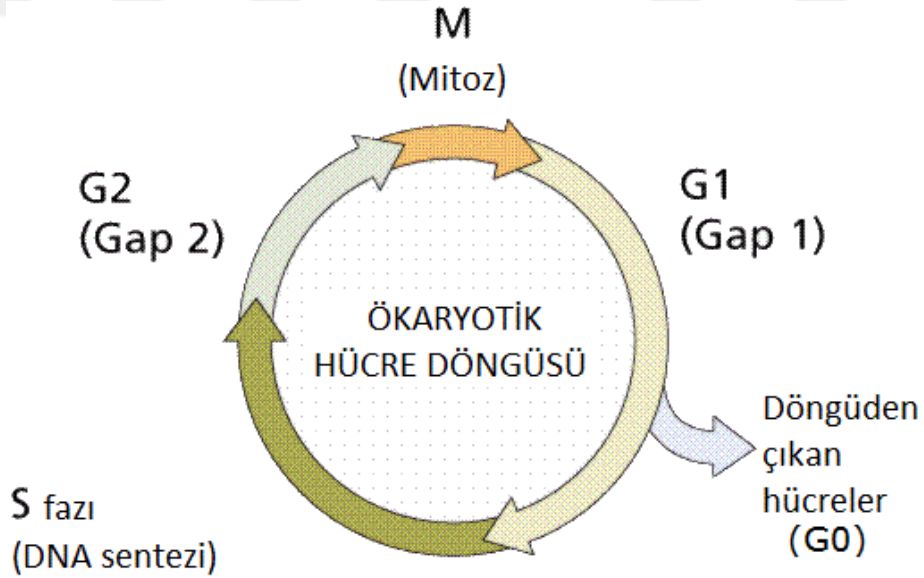
Hücre döngüsünde faz geçişleri, siklin adı verilen düzenleyici proteinler ve bu proteinlere bağlanarak aktive olan siklin-bağımlı kinaz (CDK) enzimleri aracılığıyla gerçekleştirilir. CDK inhibitörleri (CKI) ise gereken durumlarda bu enzimlere bağlanarak aktivitelerini durdurur, faz geçişlerini engeller ve hücre döngüsünün tutuklanmasına neden olur [1]. Magnezyumun hücre döngüsü üzerine etkisinin moleküler düzeyde anlaşılmasını sağlamak amacıyla yapılan çalışmalar, düşük magnezyum konsantrasyonunun hücre döngüsü inhibitörlerinden p21 [2], p27 [3] ve p53 [4] genlerinin anlatımını arttırdığını, hücre döngüsünün ilerlemesini sağlayan siklin D, siklin F, transkripsiyon faktörü E2F ve hücre döngüsünün S fazına özgü genlerin anlatımını ise azalttığını göstermiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise düşük konsantrasyonda magnezyum içeren besi ortamında G0/G1 fazındaki hücrelerin oranının arttığı, buna karşın S ve G2/M fazındaki hücrelerin oranının azaldığı gösterilmiştir [5]. Fakat hücre içi magnezyum konsantrasyonu ile *Schizosaccharomyces pombe*'nin CDK inhibitörleri arasında doğrudan bir ilişki olup olmadığına dair yapılmış bir çalışma yoktur.

Bu çalışmada, *S. pombe*'nin CDK inhibitörlerinden p25^{rum1} ile hücre içi magnezyum konsantrasyonu arasında doğrudan bir ilişki olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında ökaryotik hücre modeli olarak yaygın bir şekilde kullanılan maya türü *S. pombe*'nin magnezyum taşıma sistemi bulunan ve bulunmayan iki farklı ırkı kullanılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. HÜCRE DÖNGÜSÜ

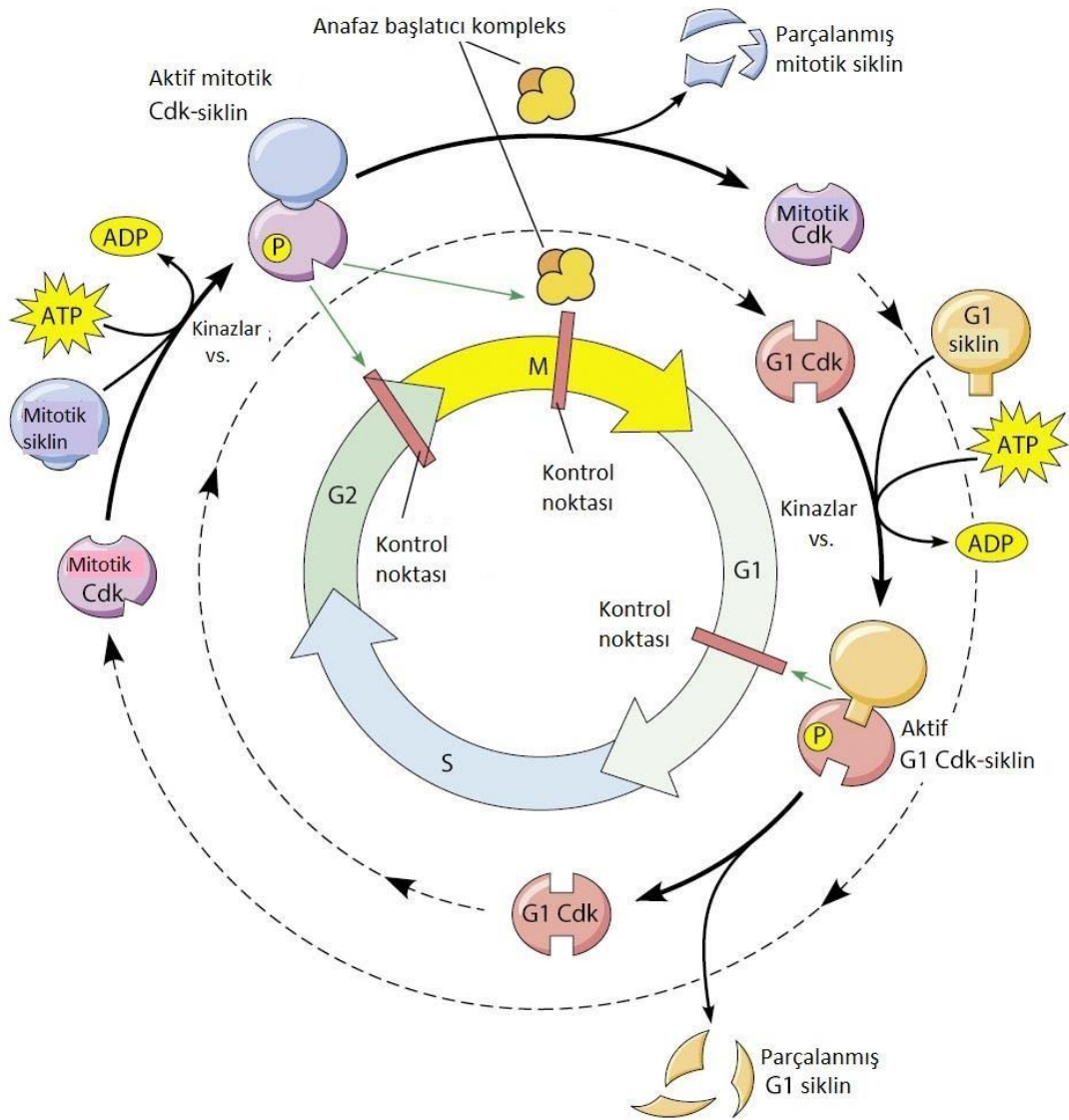
Hücre döngüsü, hücre bölünmesi sırasında belirli bir sırayla gerçekleşen bir dizi işlemin toplamıdır. Ökaryotik hücrelerde hücre döngüsü 4 fazdan oluşur; bunlar G1 , S, G2 ve M fazlarıdır. G1, S ve G2 fazları interfazı oluşturur; M fazı profaz, metafaz, anafaz ve telofaz olmak üzere dörde ayrılır. G1 fazı, bir önceki döngüde tamamlanan M fazı ile bir sonraki döngünün S fazı arasında bir geçiş fazıdır. S fazında DNA replikasyonu gerçekleşir. G2 fazında hücre bölünmeye hazır hale gelir. M fazında hücre bölünmesi gerçekleşir ve bölünen hücreyle aynı genetik materyale sahip iki yavru hücre meydana gelir. Bazı hücreler, çevresel veya içsel sinyaller doğrultusunda hücre döngüsünü G1 fazında geçici veya kalıcı olarak terk ederek G0 denilen bir faza girerler [1] (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Ökaryotik hücrelerde hücre döngüsü.

2.2. HÜCRE DÖNGÜSÜNÜN DÜZENLENMESİ

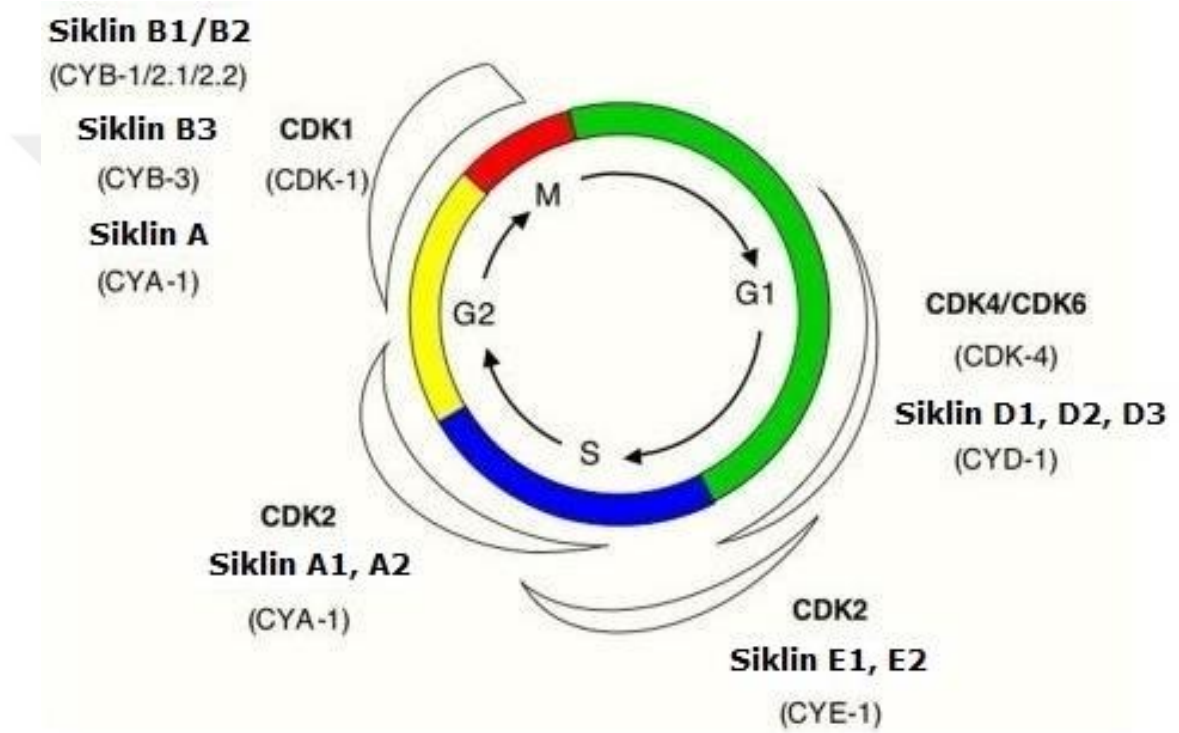
Hücre döngüsünde faz geçişleri, siklin adı verilen proteinler ve siklin-bağımlı kinaz (CDK) adı verilen enzimlerle sağlanır. CDK'lar, küçük serin/treonin protein kinazlardır ve ilgili siklinlere bağlanarak aktive olurlar. Siklinler ve CDK'ların oluşturduğu komplekslerin düzenli aktivasyonu ve deaktivasyonu, ökaryotik hücrelerde faz geçişlerini düzenleyerek hücre döngüsünün tamamlanmasını sağlar (Şekil 2.2).



Copyright © 2009 Pearson Education, Inc.

Şekil 2.2: Hücre döngüsü düzenleyicilerinin çalışma mekanizması.

Memelilerde hücre döngüsünün tamamlanmasında birden fazla siklin proteini ve siklin-bağımlı kinaz enzimi rol oynar. Bunlar A, B, D ve E siklinleri ile Cdk1, Cdk2, Cdk4 ve Cdk6 enzimleridir. Siklin D/Cdk4 ile siklinD/Cdk6 kompleksleri G1 fazının ortasından sonuna kadar, siklin E/Cdk2 kompleksi G1 fazının sonunda, siklin A/Cdk2 kompleksi S fazında, siklin A/Cdk1 ile siklin B/Cdk1 kompleksleri de G2 ve M fazlarında görev yapar. Özellikle G1 siklinleri, hücrenin G1 fazındaki restriksiyon noktasını geçebilmesinde büyük önem taşır [6] (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Memelilerde hücre döngüsünde görev alan siklin proteinleri ve CDK enzimleri [1].

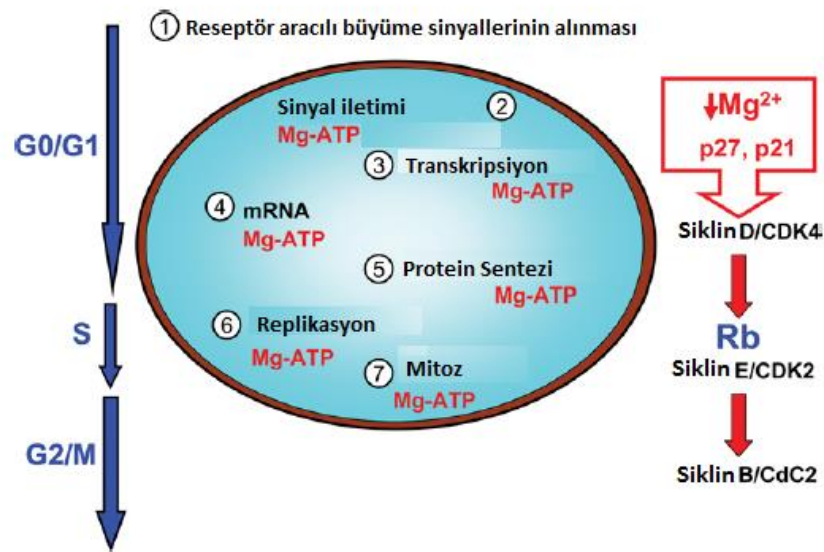
Siklin/CDK komplekslerinin aktiviteleri, siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI) aracılığı ile kontrol edilir. Memelilerde hücre döngüsünün düzenlenmesinde birden fazla inhibitör rol oynar. Bu inhibitörler iki ana gruba ayrılır; bunlardan biri G1 fazında görev yapan siklin D/Cdk4 ile siklin D/Cdk6 komplekslerini inhibe eden p15, p16, p18 ve p19 gibi inhibitörlerin bulunduğu INK4 ailesi, diğeri ise tüm Cdk enzimlerinin aktivitesini inhibe eden p21, p27 ve p57 gibi inhibitörlerin bulunduğu Cip/Kip ailesidir [6, 7, 8, 9].

Maya hücrelerinde ise tek bir CDK enzimi bulunur ve her bir faz için farklı siklinlere bağlanarak faz geçişlerini düzenler. Bu enzim, *Saccharomyces cerevisiae*'de p34^{CDC28}, *S. pombe*'de p34^{cdc2} dir [1]. Yapılan çalışmalarda bu iki enzimin fonksiyonel homolog olduğu gösterilmiştir [10]. Bir başka çalışma ise insanın cdc2 homologunun, *S. pombe*'de cdc2'nin görevlerini yerine getirebildiğini göstermiştir [11].

Saccharomyces cerevisiae'nin CDK inhibitörlerinden p40^{SIC1} ile *S. pombe*'nin CDK inhibitörlerinden p25^{rum1}, hücre döngüsünün G1 fazının düzenlenmesinde önemli rol oynar. p25^{rum1}, G1 fazında cdc2/cdc13 kompleksiyle etkileşime girer ve ayrıca cdc13'ün yıkılmasından sorumludur. p40^{SIC1} ile p25^{rum1}'in siklin/CDK komplekslerine bağlanan bölgelerinin büyük oranda homolog olduğu gösterilmiştir [12]. Yapılan bir başka çalışma ise, p40^{SIC1} ile memeli hücrelerinin CDK inhibitörlerinden p27^{Kip1}'in inhibisyonundan sorumlu bölgelerinin yapısal olarak homolog olduğunu göstermiştir [13].

2.3. MAGNEZYUMUN HÜCRE DÖNGÜSÜNE ETKİSİ

Magnezyum (Mg²⁺), hücre döngüsünde sinyal iletiminden mitoz kadar tüm aşamalarda etkilidir. Moleküler düzeyde, eğer Mg²⁺ miktarı yetersizse p21 ve p27 inhibitör proteinlerini kodlayan genlerin anlatımı artar. Böylece hücre döngüsü, siklin/CDK komplekslerinin ve Rb (retinoblastoma) aracılı kontrol noktasının inhibisyonu ile tutuklanmış olur [5] (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Magnezyumun hücre döngüsünün düzenlenmesine etkisi [5].

Mg^{2+} kısıtlaması olan ortamda hücre döngüsünün inhibe edildiği [14], buna karşın ortama Mg^{2+} eklenmesi ile hücre döngüsünün kaldığı yerden devam ettiği gösterilmiştir [15]. Ayrıca yüksek Mg^{2+} konsantrasyonunun hücre bölünmesini hızlandırdığı tespit edilmiştir [16, 17]. Ancak yüksek Mg^{2+} konsantrasyonuna adapte olan hücrelerin, hücre içi Mg^{2+} düzeyinde belirgin bir artış olmadığı gözlenmiştir [14].

Mg^{2+} kısıtlaması yapılmış hücre kültürlerinde, hücre döngüsünün çeşitli fazlarında hücrelerin sayıca $G0/G1 > G2/M > S$ olmak üzere tutuklandığı gösterilmiştir. Meme epitel hücreleri üzerinde yapılan bir araştırma, Mg^{2+} kısıtlaması yapıldığında hücre döngüsü inhibitörlerinden p27'nin [2]; kılcal damar endotel hücreleri üzerinde yapılan diğer bir araştırma ise p21'in [3] anlatımlarının arttığını göstermiştir. Mg^{2+} kısıtlı ortamda p53, "jumonji" ve "numblike" gibi hücre döngüsü inhibitörlerinin anlatımları artarken [4, 16, 18], siklin D ve siklin F ile siklin-bağımlı kinazların ve S fazına özgü genlerin anlatımlarından sorumlu transkripsiyon faktörü E2F'nin anlatımının azaldığı tespit edilmiştir.

İnsan endotel hücreleriyle yapılan bir çalışmada, yetersiz Mg^{2+} konsantrasyonunun hücrelerin genişlemesine ve boyca uzamasına neden olduğu ve bu hücrelerde p21 geninin anlatımının arttığı görülmüştür [19]. İnsan fibroblast hücreleriyle yapılan bir başka çalışmada ise benzer şekilde hücre boyutunda artış olduğu ve p21'in anlatımının arttığı, dolayısıyla bu hücre popülasyonunda replikasyon kapasitesinin azaldığı gözlenmiştir [20]. Memeli epitel hücrelerinden HC11 hücreleri, Mg^{2+} eksikliğinde hücre döngüsünün G0/G1 geçişinde tutuklanmış, ortama Mg^{2+} eklendiğinde ise tutuklanma ortadan kalkmıştır [21].

Farklı hücre tipleri, çoğalmak için farklı konsantrasyonda Mg^{2+} 'ye gerek duyar. Dış ortamdaki Mg^{2+} konsantrasyonu endotel hücrelerinde 0.1 mM olduğunda, HC11 memeli epitel hücrelerinde ise 0.05 mM olduğunda hücre çoğalmasında belirgin bir azalma görülmüştür [2, 22]. Tümör hücreleri dış ortamdaki Mg^{2+} değişimlerine karşı normal hücrelerden daha dirençlidir. Örneğin HL-60 lösemi hücreleri, MCF7 meme karsinom hücreleri ve Ehrlich asit tümör hücreleri, hücre dışı ortamdaki 0.05 mM Mg^{2+} konsantrasyonuna karşı oldukça dirençlidir [2, 23].

2.4. GENOMİK KARARLILIKTA HÜCRE DÖNGÜSÜNÜN ÖNEMİ

Hücre döngüsünün düzenlenmesi, genomik düzeyde meydana gelebilecek hataların tamir edilmesi ve kontrolsüz hücre bölünmesinin önlenmesi de dahil olmak üzere pek çok süreçten meydana gelir. Bu süreçler, çok hücreli organizmalarda sıkı bir şekilde kontrol edilir ve organizmanın gelişiminin kararlı ve sorunsuz sürdürülebilmesi için büyük önem taşır.

Hücre bölünmesi sırasında genomda istenmeyen değişiklikler meydana gelme eğiliminin artması genomik kararsızlık olarak tanımlanır. Genomik kararsızlıkta, genomda meydana gelen hasarlar organizma için pek çok soruna yol açabileceği gibi, kontrolsüz hücre bölünmeleri tümör oluşumuna ve kansere neden olur.

Memeli hücreleri, hücre bölünmesinde genomik kararlılığı korumak için genellikle dört mekanizmadan yararlanır. Bunlar; S fazında yüksek duyarlı DNA replikasyonu, mitoz sırasında kromozomların yavru hücrelere doğru bir şekilde paylaşılması, DNA hasarının hücre döngüsü boyunca hataya yer bırakmayacak şekilde tamir edilmesi ve hücre döngüsündeki kontrol noktalarıdır [24].

2.5. MODEL ORGANİZMA OLARAK *Schizosaccharomyces pombe*

Fisyon mayası olarak adlandırılan *S. pombe*, tek hücreli ökaryot bir maya türüdür. Hücreleri çubuk şeklinde, 2-4 µm çapında, 7-14 µm uzunluğundadır.

S. pombe genomu 3 kromozomludur ve diğer ökaryotlara kıyasla oldukça az sayıda gen içerir. Genom dizilemesi 2002 yılında tamamlanmıştır. Genlerinin yaklaşık 50 tanesi bazı insan hastalıklarının genleriyle önemli ölçüde benzerlik gösterir ve bu genlerin yaklaşık yarısı kanserle ilişkilidir [25]. Protein kodlayan gen sayısı 5064 civarındadır¹.

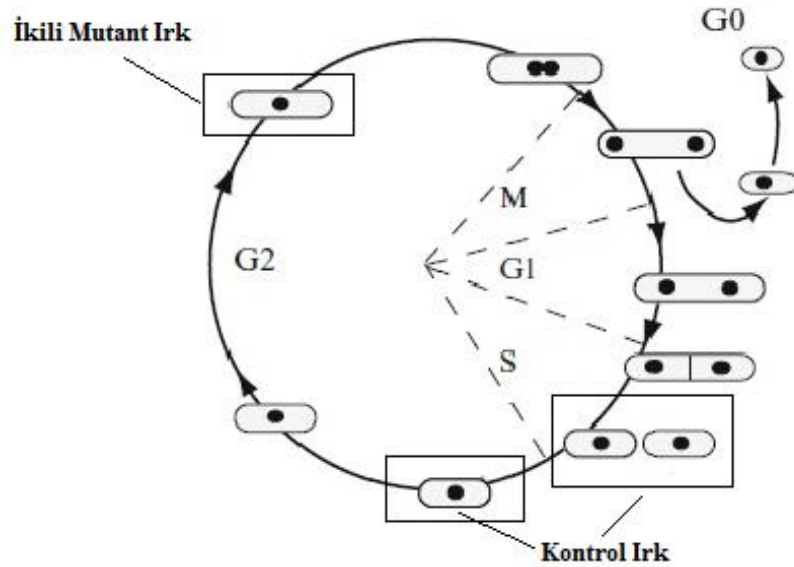
S. pombe'nin hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji çalışmalarında avantaj sağlayan özellikleri şöyle sıralanabilir:

- Genomunun küçük ve basit yapılı olması
- Çok fazla sayıda hücreyle çalışabilme imkanı
- Nadir mutantlar keşfetme imkanı
- Haploid hücrelerde mutant alellerin belirlenmesi

¹ <http://www.pombase.org/status/statistics>

- Diploid hücrelerde mutant alelin dominant mı resesif mi olduğunun belirlenmesi
- Besi ortamını ve yetiştirme koşullarını değiştirerek pek çok biyolojik süreçte görevli genleri tanımlama
- Mayadan insana korunmuş fakat bakterilerde olmayan biyolojik süreçleri çalışma (organeller, hücre döngüsünün düzenlenmesi, protein fosforilasyonu ve hücre iskeletinin organizasyonu gibi)
- Bakterilere kıyasla çok daha farklı olan biyolojik mekanizmaları çalışma (replikasyon, transkripsiyon, translasyon gibi)
- Genomuna plazmid yerleştirebilme imkanı (gen klonlama)
- Homolog rekombinasyon mekanizmaları (yeni alel kombinasyonları taşıyan hücreler üretme)

S. pombe, tüm bu avantajları nedeniyle hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji çalışmalarında model organizma olarak kullanılır. Özellikle hücre bölünmesi, hücre döngüsü ve kanser mekanizmaları üzerine yürütülen çalışmalarda büyük öneme sahiptir [26] (Şekil 2.5).

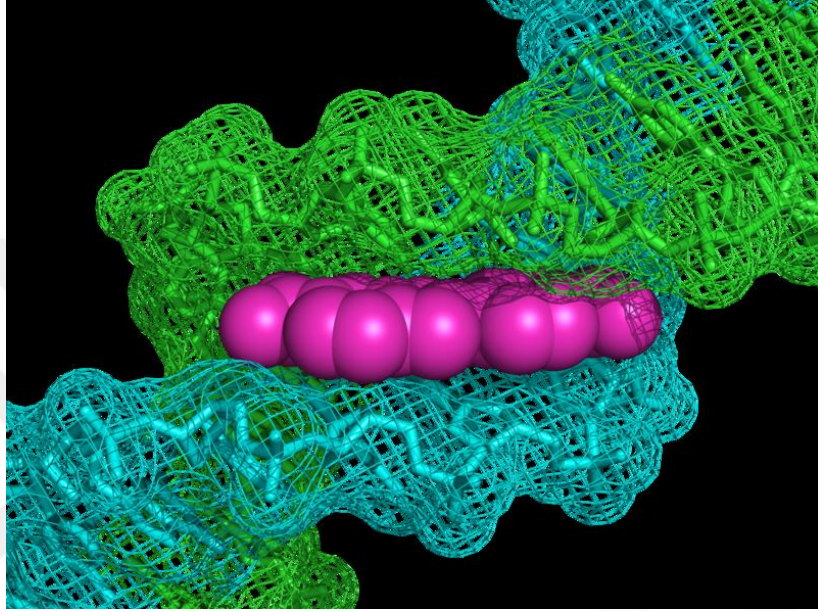


Haploid, Vegetatif Döngü

Şekil 2.5: *S. pombe* hücrelerinde haploid vegetatif döngü [27].

2.6. DAPI/KALKOFLOR FLORESAN BOYAMA TEKNİĞİ

Floresan mikroskopisinde sıklıkla kullanılan DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindol dihidroklorür), DNA'nın küçük oluğunda A ve T bakımından zengin bölgelere bağlanan floresan bir boyadır (Şekil 2.6). Hücre zarından geçebildiği için hem canlı hem fikse edilmiş hücreleri boyayabilir.



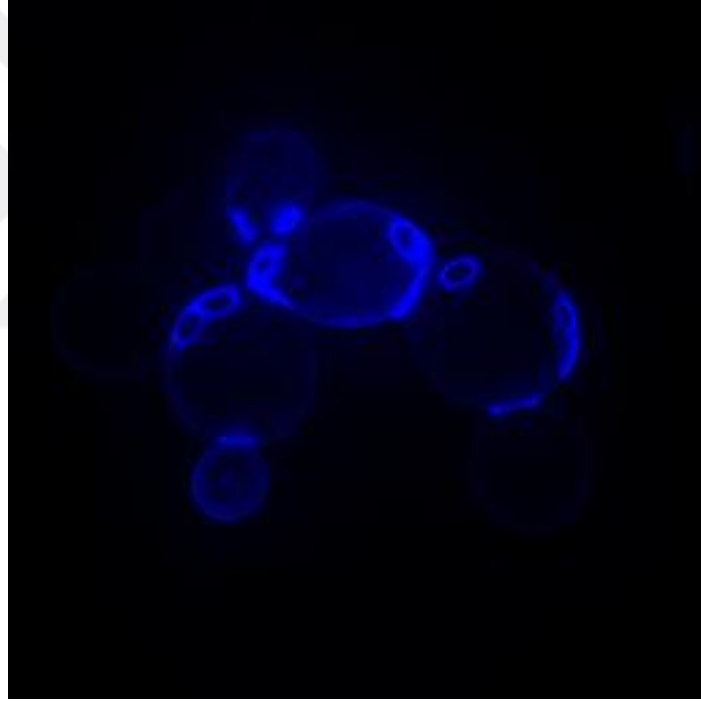
Şekil 2.6: DNA'nın küçük oluğuna (mavi ve yeşil) bağlanmış DAPI (pembe) [28].

İlk defa 1971 yılında bir ilaç araştırması sırasında üretilen DAPI, ilaç olarak başarılı olmadı. Sonradan DNA'ya güçlü bir şekilde bağlanabildiği ve bağlandığında floresan özellik gösterdiği keşfedildi. 1975'te mitokondri DNA'sını belirleme amacıyla kullanıldı ve bu, DAPI'nin floresan DNA boyası olarak kayda geçen ilk kullanımı oldu [29].

DAPI çift sarmallı DNA'ya bağlandığında 358 nm dalga boyunda (ultraviyole) absorpsiyon, 461 nm dalga boyunda (mavi) emisyon yapar. Bu nedenle floresan mikroskopisinde ultraviyole ışıkla uyarılır ve mavi filtre ile incelenir. DAPI'nin mavi emisyonu, tek bir örnekte birden fazla floresan boya kullanmak isteyen araştırmacılara kolaylık sağlar.

Kalkoflor, selüloz ve kitin içeren yapılara kuvvetli biçimde bağlanan floresan bir boyadır [30]. Alglerin ve yüksek bitkilerin hücre duvarlarının boyanmasında, tıpta ve hayvan biyolojisi çalışmalarında mantarların hücre duvarlarında bulunan kitine bağlanarak dokularda mantar tespiti yapılmasında kullanılır [30, 31, 32].

Kalkoflor, aynı zamanda maya hücrelerinin tomurcuk izlerinin boyanmasında kullanılır. Bu bölgelerde kitin miktarı yüksektir, dolayısıyla hücre zarının diğer bölgelerine göre daha koyu boyanırlar. Böylece tomurcuk izleri sayılarak hücrenin yaşı hakkında fikir edinilebilir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: Kalkoflor ile boyanmış *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinde tomurcuk izleri.²

² http://www.virtual-labs.leeds.ac.uk/brewing/fermentation/microscope_pics.php

2.7. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (GZ-PZR)

Temeli polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemine dayanan GZ-PZR, DNA'daki hedef gen bölgesinin çoğaltılmasını reaksiyon sırasında gerçek zamanlı olarak takip eder. Bu yöntem kantitatif, yarı kantitatif veya kalitatif olarak kullanılabilir. Kantitatif GZ-PZR yöntemi, gen anlatım çalışmalarında sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir.

GZ-PZR'de meydana gelen ürünü tespit etmek için yaygın olarak iki yöntem kullanılır. Bunlardan biri çift sarmallı DNA'ya bağlanan floresan boyalar, diğeri belli bir DNA dizisine özgü olan ve oligonükleotidlerden oluşan özel DNA problarıdır. Bu çalışmada floresan bir boya olan SYBR Green kullanılmıştır. SYBR Green'in çalışma prensibi, çift sarmallı DNA'ya bağlandığında gösterdiği floresan ışımının ölçülmesine dayanır. PZR çoğaltımı ile birlikte bu ışımada artış meydana gelir [33].

Çift zincirli DNA'ya bağlanan SYBR Green 100 kat daha fazla floresan ışımaya gösterir. Sıcaklığın artması ve DNA zincirlerinin birbirinden ayrılması (denatürasyon) sonucu bu miktar gittikçe azalır. Erime (ayrışma) eğrisi, floresan ışımaya ve sıcaklık arasındaki ilişkiyi gösterir ve PZR işlemi sırasında hedeflenen DNA bölgesinden farklı bir bölge kullanılıp kullanılmadığını veya kontaminasyon olup olmadığını belirtir.

GZ-PZR işleminde PZR ürünlerinin meydana gelme oranına amplifikasyon verimi denir ve genellikle yüzde ile ifade edilir. Belirli bir PZR ürününün miktarı, amplifikasyonun geometrik fazında iki katına çıkıyorsa işlemin %100 verimli olduğu anlaşılır. Amplifikasyon verimini görmek için standart eğriye bakılır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN IRKLAR

S. pombe'nin İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonunda bulunan ve yabancı ırkın lösin, adenin ve urasil açısından mutanti olan Sp292 ırkı, Mg²⁺ transport sistemine sahip olduğundan kontrol ırk olarak kullanılmıştır. Model ırk olarak kullanılan ve Mg²⁺ transport sistemi olmayan ikili mutant ırk (GA2) ise; Sp292 ırkında plazma membranında yer alan ve Mg²⁺ transportundan sorumlu olan iki kanal proteinini kodlayan ve *Saccharomyces cerevisiae*'nin *ALR1* ve *ALR2* genlerinin *S. pombe*'deki homoloğu olarak bilinen *SPAC17A2.14* ve *SPBC27B12.12c* genlerinin Dr. Gökhan Akman tarafından polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile delesyona uğratılması yoluyla elde edilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan ırklar.

Kullanılan Irklar	Kullanım Amacı
<i>S. pombe</i> Sp292 (leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 h ⁻)	Kontrol grubu olarak kullanılmıştır.
<i>S. pombe</i> GA2 (İkili Mutant) (Δ <i>SPAC17A2.14</i> Δ <i>SPBC27B12.12</i> leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 kan ^r)	Mg ²⁺ transport kanal proteinlerini kodlayan genler bakımından delesyonlu ırk olduğundan, Mg ²⁺ 'nin dış ortamdan alınmadığı durumlar için model olarak kullanılmıştır.

S. pombe'nin kontrol ırk olarak kullanılan Sp292 ırkının genotipik kontrolleri minimal besi ortamı ile adenin, lösin ve urasil amino asitlerinin eklendiği minimal besi ortamında yapılmıştır.

3.2. BESİ ORTAMI

Hücrelerin üretilmesinde kullanılan besi ortamları ve içerikleri Tablo 3.2’de verildi.

Tablo 3.2: *S. pombe*’nin üretiminde kullanılan besi ortamları.

Besi Ortamı	İçerik
Maya ekstreli sıvı besi ortamı (YEL)	Maya Ekstresi (Yeast Extract) 5 g/L Glukoz 30 g/L
Maya ekstreli katı besi ortamı (YEA)	YEL besi ortamına Agar eklendi 20 g/L

Kontrol ırk YEA ve YEL, ikili mutant ırk YEA+200 mM MgCl₂ ve YEL+75 mM MgCl₂ besi ortamlarında üretildi [34].

3.3. ÜREME EĞRİLERİNİN ÇIKARILMASI

Kontrol ve ikili mutant ırkın üreme eğrilerinin çıkarılması amacıyla hücreler önce YEA besi ortamında üretildi. Kontrol ırk YEA besi ortamına, ikili mutant ırk YEA+200 mM MgCl₂ besi ortamına ekildi. Hücreler 30°C’de üç gece üremeye bırakıldıktan sonra 5 mL steril distile su ile süspansedildi. Ardından kontrol ırk YEL besi ortamına, ikili mutant ırk YEL, YEL+10 mM MgCl₂ ve YEL+75 mM MgCl₂ besi ortamlarına ekildi. Hücreler 30°C’de 180 devir/dk hıza sahip çalkalamalı etüvde üremeye bırakıldı.

Hücre sayısındaki artışı belirlemek amacıyla, belli aralıklarla spektrofotometrik ölçümler yapıldı ve 600 nm dalga boyunda optik yoğunluk (O.D.) ölçüldü. Elde edilen değerler ile mL başına düşen hücre sayısı 0.5 O.D.’ye yaklaşık 1×10^7 hücre düşmesi formülünden yola çıkarak hesaplandı ve her iki ırkın üreme eğrilerinin karşılaştırmalı grafiği çıkarıldı.

3.4. DAPI/KALKOFLOR FLORESAN BOYAMA

DAPI stoğu 1.5 mg/mL olacak şekilde dimetilsülfoksitte (DMSO), Kalkoflor stoğu 2 mg/mL olacak şekilde distile suda hazırlandı. Ardından 1/1 (v/v) oranında gliserol-distile su karışımına 1 µg/mL olacak şekilde DAPI stoğundan, 0.2 mg/mL olacak şekilde Kalkoflor stoğundan eklenerek taze karışım hazırlandı.

YEL ve YEL+75 mM Mg²⁺ besi ortamında üretilen ikili mutant hücreleri ile YEL besi ortamında üretilen kontrol hücreleri 24. ve 48. saatlerde fikse edildi. Fiksasyon işlemi için hücre süspansiyonlarından 1'er mL alındı ve 2000 rpm'de 5 dk süreyle çöktürüldü. Ardından hücrelere 1 mL absolü etanol eklenip karıştırılarak fikse edildi ve boyama aşamasına kadar +4°C'de saklandı.

Boyama işlemi için 300 µL hücre solüsyonuna 1 mL distile su eklenerek yıkama yapıldı. Hücre çökeltisi 50 µL distile suda süspanse edildi. Bu hücre süspansiyonundan 5 µL alınarak üzerine taze hazırlanmış DAPI/Kalkoflor karışımından 5 µL eklendi. Ardından preparatlara aktarılan örnekler floresan mikroskopunda 100x objektifte DAPI filtresi altında incelendi, fotoğrafları çekildi ve hücre sayımı yapıldı.

3.5. TOTAL RNA İZOLASYONU

3.5.1. Hücre Sayımı

Total RNA izolasyonu için her bir örnek grubundan yaklaşık 10⁸ hücre kullanmak gerektiğinden izolasyon öncesi hücre sayımı yapıldı.

Kontrol ırk YEL besi ortamına, ikili mutant ırk YEL, YEL+10 mM Mg²⁺ ve YEL+75 mM Mg²⁺ besi ortamına ekildi ve 30°C'de 180 devir/dk'lık çalkalamalı etüvde üremeye bırakıldı. Logaritmik fazda etüvden alınan hücreler Cedex HiRes cihazı ile sayıldı. Elde edilen veriler kullanılarak, 10⁸ hücre elde etmek için her bir YEL örneğinden ne kadar alınması gerektiği hesaplandı.

3.5.2. Hücrelerin Yıkanması

Besi ortamından alınan hücreler temiz tüplere aktarıldı, 4000 rpm'de santrifüj yapıldı ve süpernatant atıldı. Mg²⁺ artıklarının iyice temizlenmesi için tüplere 10 mL su eklendi, 4000 rpm'de santrifüj yapıldı ve süpernatant atıldı. Yıkama işlemi 4-5 defa tekrar edildi.

3.5.3. Hücrelerin Parçalanması

Total RNA'nın açığa çıkmasını ve kolaylıkla izole edilebilmesini sağlamak amacıyla hücreler parçalamaya işleminden geçirildi.

RNA ile karışabilecek hücre artıklarının temizlenmesi için yıkama işleminden sonra hücreler 200 µL PBS'te süspanse edildi. 1.5 mL'lik mikro tüplere 0.2 mL hizasına kadar cam boncuk kondu, üstüne üç adet metal bilye eklendi ve PBS içindeki hücreler

bu mikro tüplere aktarılarak ağızları parafilmleildi. Ardından parçalayıcıda (Sartorius 3000M), 1 dk buz 1 dk parçalama olacak şekilde toplam 3 dk süreyle parçalama işlemine tabi tutuldu. Sonrasında her bir mikro tüpün alt kısmı alevde sterilize edilmiş bir iğne ile delindi, altlarına steril mikro tüpler yerleştirildi ve 6000 rpm'de 30 sn santrijüflenerek boncukların ayrılması sağlandı. Steril mikro tüplere geçen hücre süspansiyonu 8000 rpm'de 2 dk santrifüj edildikten sonra süpernatanta 400 µL lizis bağlayıcı tampon eklendi ve 15 sn vorteksten geçirildi.

3.5.4. Total RNA'nın İzolasyonu

İşlem, total RNA izolasyon kiti (Roche) kullanılarak gerçekleştirildi. Kit bileşenleri ve içerikleri Tablo 3.3'te verildi.

Tablo 3.3: Total RNA izolasyon kitinin bileşenleri ve içerikleri.

Şişe/Kapak	Etiket	İçerik/Fonksiyon
1 Yeşil	Lizis Bağlayıcı Tampon	<ul style="list-style-type: none"> • 25 mL • [4.5 M guanidin-HCl, 50 mM Tris-HCl, %30 Triton X-100 (w/v), pH 6.6 (25°C)]
2	DNaz I, rekombinant, liyofilizat	<ul style="list-style-type: none"> • 10 KU liyofilize DNaz I • 0.55 mL elüsyon tamponunda çözdürün
3 Beyaz	DNaz İnkübasyon Tamponu	<ul style="list-style-type: none"> • 10 mL • [1 M NaCl₂, 20mM Tris-HCl ve 10 mM MnCl₂, pH 7.0 (25°C)]
4 Siyah	Yıkama Tamponu I	<ul style="list-style-type: none"> • 33 mL (ilk kullanımdan önce 20 mL etanol ekleyin) • [5 M guanidin hidroklorür ve 20 mM Tris-HCl, pH 6.6 (25°C); 20 mL absolü etanol eklendikten sonraki final konsantrasyonları]
5 Mavi	Yıkama Tamponu II	<ul style="list-style-type: none"> • 10 mL (ilk kullanımdan önce 40 mL absolü etanol ekleyin) • [20 mM NaCl₂, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5 (2°C); 40 mL absolü etanol eklendikten sonraki final konsantrasyonları]
6 Renksiz	Elüsyon Tamponu	<ul style="list-style-type: none"> • 30 mL • Su (PZR için uygun)
7	Filtreli mikro tüpler	<ul style="list-style-type: none"> • 50 adet polipropilen tüp • 700 µL kapasiteli
8	Toplama mikro tüpleri	<ul style="list-style-type: none"> • 50 adet polipropilen tüp • 2 mL kapasiteli

Hücrelerin parçalanmasının ardından örnekler pipet yardımıyla, toplama mikro tüplerinin içine yerleştirilen filtrelili mikro tüplere aktarıldı ve bu filtrelili mikro tüpler 8000 g'de 15 sn santrifüj edildi. Filtrelili mikro tüpler toplama mikro tüplerinden çıkarıldı, toplama mikro tüpleri boşaltıldı ve filtrelili mikro tüpler yeniden yerleştirildi.

Steril bir mikro tüpte örnek başına 90 µL DNaz inkübasyon tamponu ve 10 µL DNaz olacak şekilde bir karışım hazırlandı ve pipetaj yapıldı. Bu karışım, örneklerin bulunduğu filtrelili mikro tüplere pipet yardımıyla eşit olarak paylaştırıldı ve filtrelili mikro tüpler oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Ardından filtrelili mikro tüplere 500 µL yıkama tamponu I eklendi ve 8000 g'de 15 sn santrifüj yapıldı. Toplama mikro tüpleri boşaltıldıktan sonra filtrelili mikro tüplere 500 µL yıkama tamponu II eklendi ve 8000 g'de 15 sn santrifüj yapıldı. Toplama mikro tüpleri tekrar boşaltıldı, filtrelili mikro tüplere 200 µL yıkama tamponu II eklendi ve maksimum seviyede (yaklaşık 13000 g) 2 dk santrifüj yapıldı. 1.5 mL'lik steril mikro tüpler içine yerleştirilen filtrelili mikro tüplere 100 µL elüsyon tamponu eklendi ve 8000 g'de 1 dk santrifüj yapıldı. Elde edilen total RNA, -80°C'de saklandı.

3.5.5. Total RNA'nın Miktar ve Saflık Tayini

Elde edilen total RNA'nın miktarı ve saflığı, NanoDrop spektrofotometre cihazı ile ölçüldü. Ölçüm için her bir RNA örneğinden 2'şer µL alındı. Örneklerin saflık derecesi 260nm/280nm absorbans değerine göre belirlendi.

3.6. cDNA SENTEZİ

Total RNA'dan cDNA sentezi, cDNA sentez kiti (Roche) kullanılarak gerçekleştirildi. Kit bileşenleri ve içerikleri Tablo 3.4'te verildi.

Tablo 3.4: cDNA izolasyon kitinin bileşenleri ve içerikleri.

Şişe/Kapak	Etiket	İçerik
1 Kırmızı	Yüksek Duyarlıklı Revers Transkriptaz Enzimi	<ul style="list-style-type: none"> Saklama tamponu: 200 mM potasyum fosfat, 2 mN ditiyotritol, %0.2 Triton X-100 (v/v), %50 gliserol (v/v), pH ~ 7.2
2 Renksiz	Yüksek Duyarlıklı Reaksiyon Tamponu (5x)	<ul style="list-style-type: none"> 5x kons.: 250 mM Tris/HCl, 150 mM KCl, 40 mM MgCl₂, pH ~ 8.5 (25°C)
3 Renksiz	RNaz İnhibitörü	<ul style="list-style-type: none"> Saklama tamponu: 20 mM HEPES-KOH, 8 mM ditiyotritol, %50 gliserol (v/v), pH ~ 7.6 (4°C'de)
4 Mor	Deoksinükleotid Karışımı	<ul style="list-style-type: none"> dATP, dCTP, dGTP, dTTP'nin her birinden 10 mM
5 Mavi	Oligo(dT) 18 Primerleri	<ul style="list-style-type: none"> 50 µM
6 Mavi	Rastgele Hekzamer Primerleri	<ul style="list-style-type: none"> 600 µM
7 Renksiz	DTT (Ditiyotriyol)	<ul style="list-style-type: none"> 1 tüp, 1 mL, 0.1 M
8 Renksiz	Su PZR için uygun	<ul style="list-style-type: none"> 1 mL

cDNA sentezi için her bir RNA örneğinden 2 µg kullanmak gerektiğinden, total RNA izolasyonu sonrası yapılan miktar tayininde elde edilen veriler kullanılarak her bir örnekten kaç µL alınması gerektiği hesaplandı. Ardından RNA örnekleri, primer ve su eklenen mikro tüpler 5 sn santrifüjlendi ve 65°C'de 10 dk inkübe edildi. Kullanılan RNA, primer ve su miktarları Tablo 3.5'te verildi.

Tablo 3.5: cDNA sentezinde kullanılan RNA, primer ve su miktarları.

	Örnek Miktarı (µL)	Oligo(dT) Primer (µL)	Su (µL)	Son Hacim (µL)
Kontrol (YEL)	2	1	8.4	11.4
GA2 (YEL)	2.12	1	4.28	11.4
GA2 (YEL+10 mM Mg²⁺)	3.40	1	7	11.4
GA2 (YEL+75 mM Mg²⁺)	4.10	1	6.3	11.4

Ardından RNA örneklerine eklenecek reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışımında kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 3.6’da verildi.

Tablo 3.6: cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımındaki bileşenler ve miktarları.

	Örnek Başına Düşen Miktar (µL)	Örnek Sayısı	Son Hacim (µL)
Reaksiyon Tamponu	4	4	16
RNaz İnhibitör	0.5	4	2
Nükleotid Karışımı	2	4	8
DTT	1	4	4
Reverse Transkriptaz Enzimi	1.1	4	4.4
Toplam Hacim (µL)	8.6		34.5

Hazırlanan karışım, her bir örnek için 11.4 µL olacak şekilde hazırlanan RNA, primer ve su karışımına örnek başına 8.6 µL düşecek şekilde paylaştırıldı. Böylece her bir mikro tüpteki toplam hacim 20 µL’ye tamamlanmış oldu. Mikro tüpler önce 55°C’de 30 dk, sonra 85°C’de 5 dk inkübasyona bırakıldı ve ardından buz içine alınarak işlem tamamlandı.

3.7. TOTAL RNA VE cDNA'NIN ELEKTROFORETİK ANALİZİ

Total RNA'nın ve cDNA'nın istenilen aralıkta ve yoğunlukta olup olmadığını anlamak için elektroforetik analiz yapıldı. Elektroforez işlemi için %2'lik agaroz jel hazırlandı. Kullanılan tampon ve çözeltilerin listesi Tablo 3.7'de verildi.

Tablo 3.7: Agaroz jel hazırlamak için kullanılan tampon ve çözeltiler.

Tampon ve Çözeltiler	İçerik
Tris-asetat (TAE) tamponu (50X)	Trizma Base 242 g Glasiyel asetik asit 57.1 mL 0.5 M EDTA (pH8.0) 100 mL Distile su ile hacim 1 litreye tamamlanır.
Yükleme tamponu (BromoPhenol Blue 10X)	Üre 4 M EDTA (pH8.0) 0.025 M Sukroz % 60 (w/v) Bromofenol mavisi %0.025 (w/v) Ksilen % 0.025 (v/v)
Etidyum Bromür (EtBr)	EtBr 10 mg/mL

%2'lik agaroz jel hazırlamak için 50 mL TAE tamponuna 1 g agaroz eklendi ve karışım agarozun çözünmesi için 2 dk mikrodalga fırında bekletildi. Ardından 55-60°C'ye kadar soğutuldu ve 3 µL EtBr (Etidyum bromür) eklendi. Jel karışımı yatay jel kasetine döküldükten sonra tarak yerleştirildi ve jelin polimerizasyonu için 15 dk beklendi.

6X yükleme tamponundan 2 µL ve her bir örnekten 3 µL alınarak bir parça parafilm üzerinde pipetaj ile karıştırıldı ve jele yüklendi. İşlem, 1X TAE tamponu içeren yatay elektroforez tankında 45 dk süreyle 80V akımda gerçekleştirildi. Elektroforez sonrası jel görüntüleme sistemi ile her iki jelin fotoğrafları çekildi.

3.8. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (GZ-PZR)

cDNA örnekleri, $p25^{rum1}$ geninin anlatım düzeyinin incelenmesi amacıyla GZ-PZR yöntemi ile çoğaltıldı. Kontrol ırka ait cDNA örnekleri 1, 5, 25 ve 125 oranlarında sulandırılarak standart olarak kullanıldı. $p25^{rum1}$ inhibitörünü kodlayan gen dizisine uygun primerler Primer3 adlı program yardımıyla belirlenerek sentezletildi ve normalizasyon için *act1* primerleri kullanıldı (Tablo 3.8).

Tablo 3.8: GZ-PZR’de kullanılan primerler.

	Başlangıç Noktası	Uzunluk	Tm Değeri	GC Oranı (%)	Nükleotid Dizilimi (5’-3’)
<i>rum1</i> (ileri primer)	359	20	60.23	40.00	TTTTTCGGGGGAAAAGAATC
<i>rum1</i> (geri primer)	518	20	60.01	45.00	GGGAGAATGCCAATTTGAGA
<i>act1</i> (ileri primer)	614	20	60.08	50.00	AGATTCTCATGGAGCGTGGT
<i>act1</i> (geri primer)	712	20	58.00	45.00	TCAAAGTCCAAAGCGACGTA

Her iki primer çeşidi için, SYBR Green karışımı, su ve ileri - geri primerlerden oluşan iki ayrı karışım hazırlandı. Karışım bileşenleri ve miktarları Tablo 3.9’da verildi.

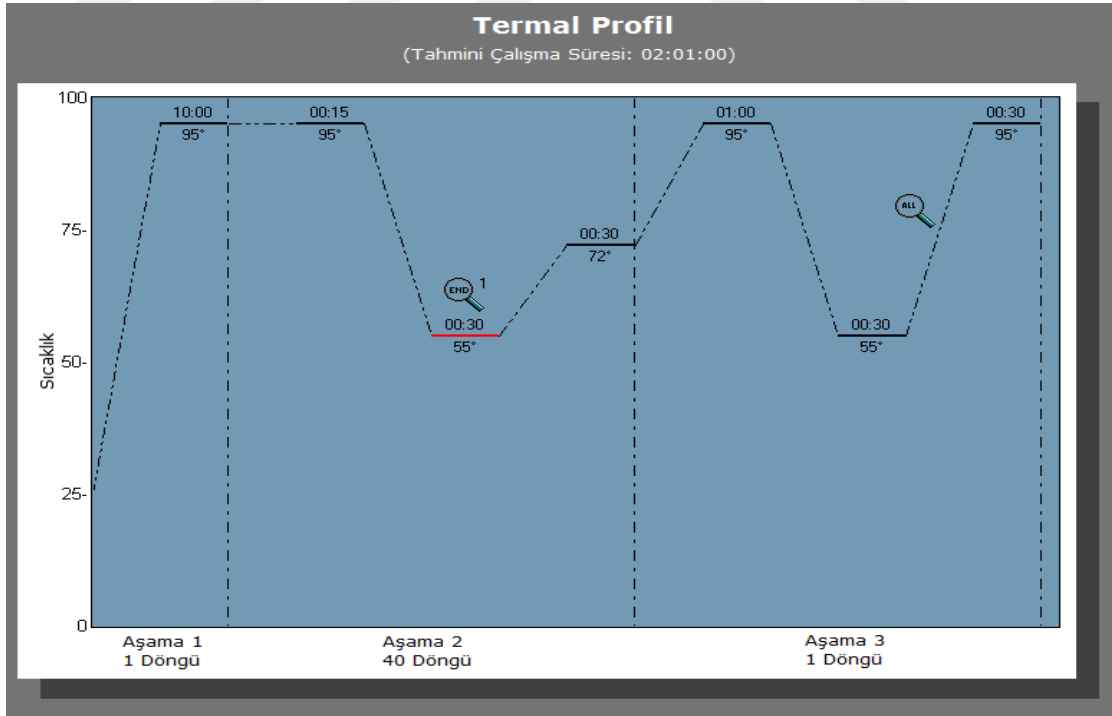
Tablo 3.9: GZ-PZR’de primerler için hazırlanan karışım.

	Kuyucuk Başına Düşen Hacim (µL)	Kuyucuk Sayısı	Son Hacim (µL)
SYBR Green Karışımı	25	12	300
Su	22	12	264
Primer (ileri)	1	12	12
Primer (geri)	1	12	23
Toplam Hacim (µL)	49		580

Bu karışımlar 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna eşit olarak dağıtıldı. cDNA örnekleri her bir kuyucuk için 1 µL olacak şekilde eklendikten sonra plaka PZR cihazına yerleştirildi ve işlem gerçekleştirildi. Kuyucukların düzeni ve PZR işleminin termal profil şeması Şekil 3.1 ve 3.2’de verildi.

All	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Standard 1 1.00e+000	Standard 2 2.00e-001	Standard 3 4.00e-002	Standard 4 8.00e-003	Standard 5 1.00e+000	Standard 6 2.00e-001	Standard 7 4.00e-002	Standard 8 8.00e-003
B	Callibrator 9 NORM A	Callibrator 10 PI A	Unknown 11 NORM B	Unknown 12 PI B	Unknown 13 NORM C	Unknown 14 PI C	NTC 15 Act1	NTC 16 PI
C	Callibrator 9 NORM A	Callibrator 10 PI A	Unknown 11 NORM B	Unknown 12 PI B	Unknown 13 NORM C	Unknown 14 PI C	NTC 15 Act1	NTC 16 PI

Şekil 3.1: GZ-PZR plaka düzeni; **Standart (Standard):** Sulandırılmış kontrol ırk, **Kalibratör (Callibrator):** Kontrol cDNA'sı, **Bilinmeyen (Unknown):** GA2 (YEL+10 mM Mg²⁺ ve YEL+75 mM Mg²⁺), **NTC:** cDNA örneği içermeyen kontrol kuyucukları, **Normal (Norm):** Normalizatör olarak kullanılan *act1* primerleri, **P1:** p25^{rum1} primerleri.

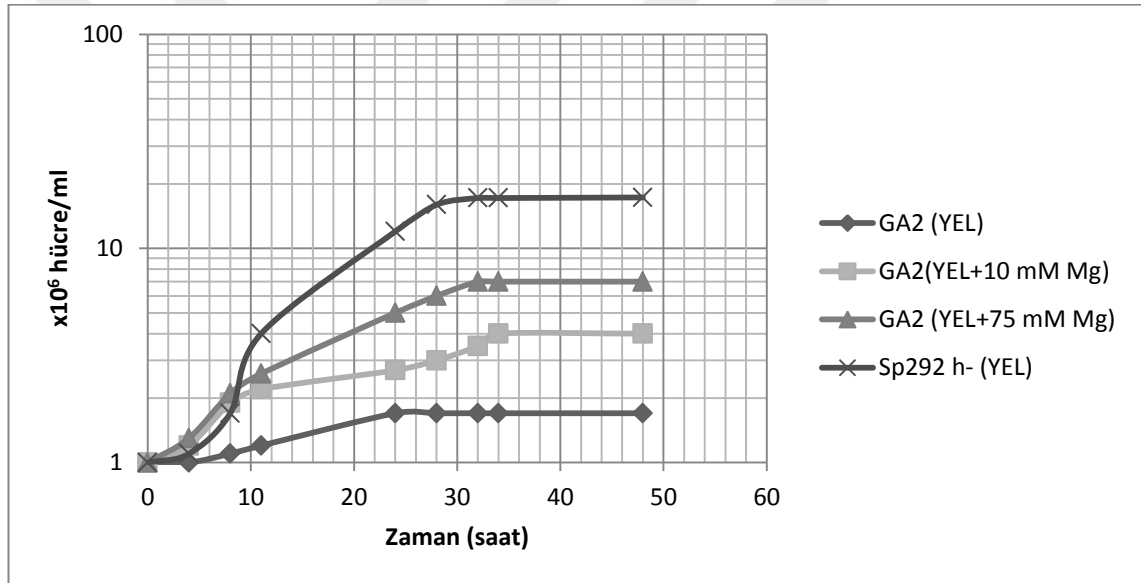


Şekil 3.2: GZ-PZR termal profil şeması.

4. BULGULAR

4.1. ÜREME EĞRİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

İkili mutant ırkın farklı Mg^{2+} konsantrasyonu içeren YEL besi ortamlarındaki üremesi takip edilerek, üreyebildiği optimum Mg^{2+} konsantrasyonu 75 mM Mg^{2+} olarak belirlendi. Kontrol ırkın YEL besi ortamındaki üreme eğrisi ile ikili mutant ırkın YEL, YEL+10 mM $MgCl_2$ ve YEL+75 mM $MgCl_2$ içeren besi ortamlarındaki üreme eğrilerinin karşılaştırmalı grafiği Şekil 4.1’de verildi.

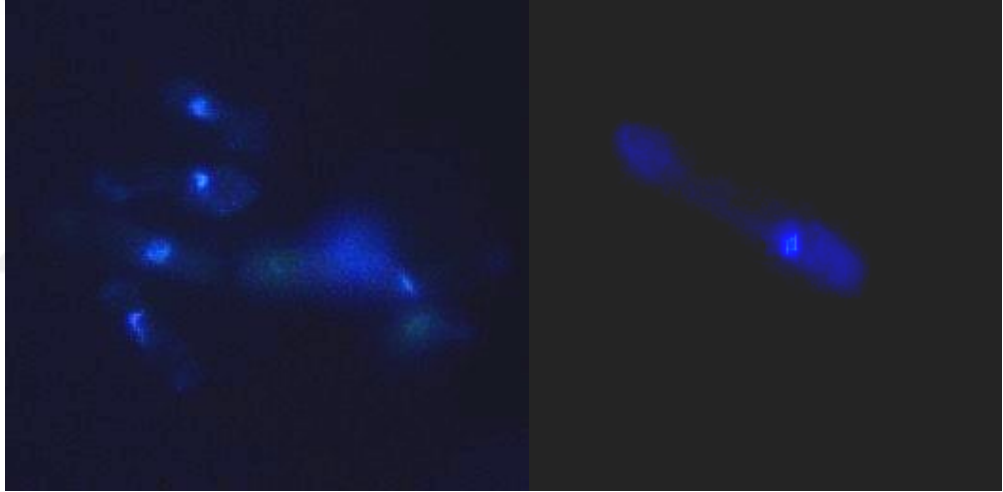


Şekil 4.1: Üreme eğrilerinin karşılaştırılması; **Sp292 h-**: Kontrol ırk, **GA2**: İkili mutant ırk.

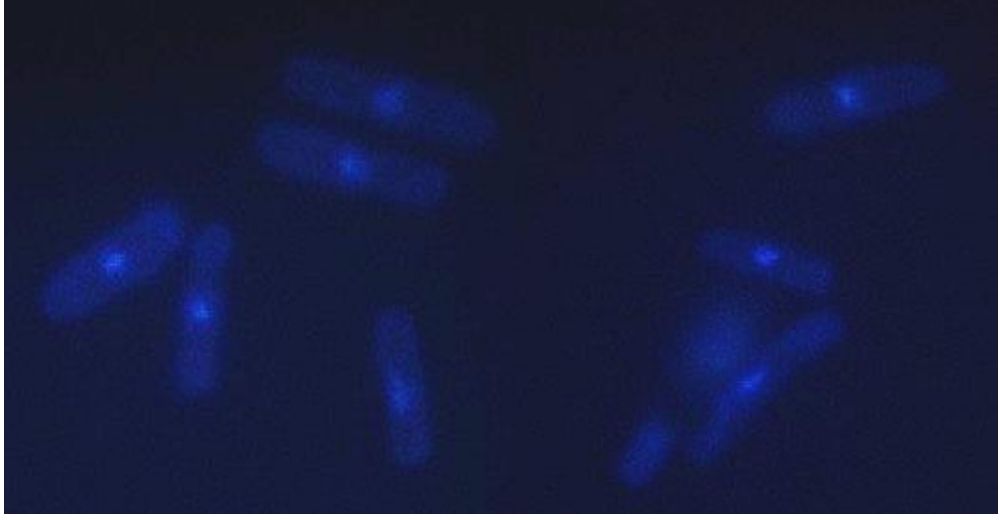
Elde edilen sonuçlar; YEL besi ortamında üretilen ikili mutant ırkın üremesinin en düşük seviyede olduğunu, bu hücrelerin logaritmik faza en son girdiğini ve hücre sayısındaki artışın en az olduğunu gösterdi. YEL besi ortamında üretilen kontrol ırkın üremesinin en yüksek seviyede olduğu, bu hücrelerin logaritmik faza erken girdiği ve hücre sayısındaki artışın en fazla olduğu görüldü. YEL+10 mM $MgCl_2$ ve YEL+75 mM $MgCl_2$ besi ortamlarında üretilen ikili mutant hücrelerin üremesinin ve hücre sayılarının ise YEL’de üretilen ikili mutant hücelere kıyasla arttığı görüldü.

4.2. DAPI/KALKOFLOR FLORESAN BOYAMA

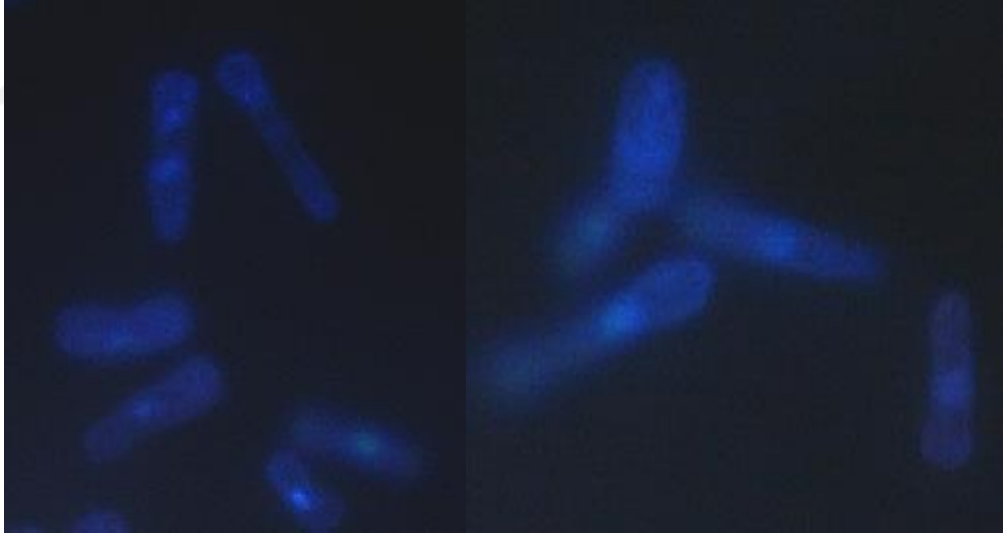
DAPI/Kalkoflor floresan boyama sonucunda çekilen fotoğraflarda YEL besi ortamında üretilen ikili mutant hücrelerin kısa boylu ve tek nukleuslu olduğu görüldü. YEL+75 mM Mg²⁺ besi ortamında üretilen ikili mutant hücrelerin 24. ve 48. saatlerde, YEL'de üreyenlere göre boyca uzadığı ve bazı hücrelerde çift nukleus bulunduğu görüldü. YEL besi ortamında üretilen kontrol ırk hücrelerinin ise 24. saatte boyca kısa olduğu, 48. saatte hücrelerin boyca uzadığı görüldü ve tek nukleuslu hücrelerin yanı sıra çift nukleuslu hücrelere de rastlandı (Şekil 4.2 – 4.6).



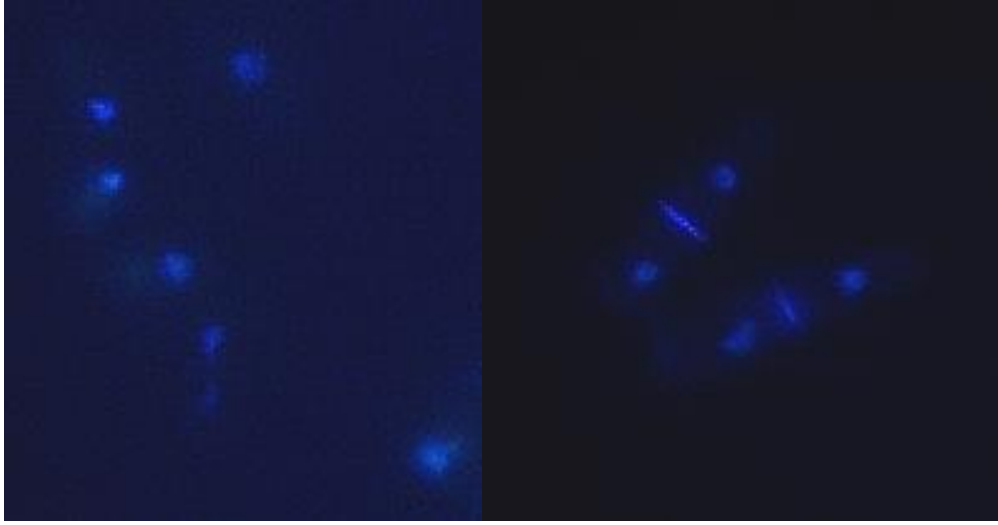
Şekil 4.2: GA2 (YEL).



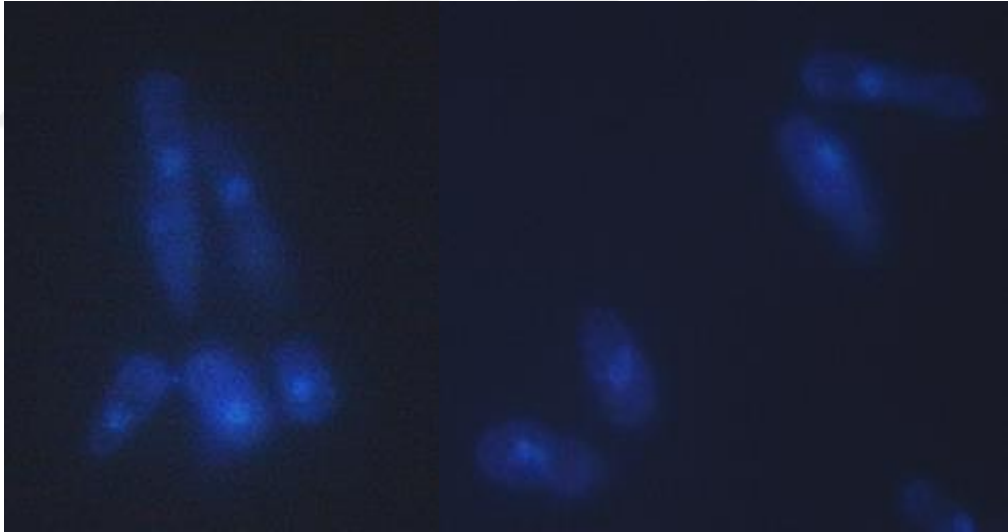
Şekil 4.3: 24. saatte GA2 (YEL+75 mM Mg²⁺).



Şekil 4.4: 48. saatte GA2 (YEL+75 mM Mg²⁺).



Şekil 4.5: 24. saatte kontrol ırk (YEL).



Şekil 4.6: 48. saatte kontrol ırk (YEL).

Her iki ırkta boy ve nukleus bakımından hücre yüzdeleri hesaplandı. YEL besi ortamında üretilen kontrol ırk hücrelerinde boyca uzun ve tek nukleuslu hücre oranı 24. saatte %39.6, 48. saatte %44.8 olarak belirlendi. YEL besi ortamında üretilen ikili mutant hücrelerinde boyca uzun ve tek nukleuslu hücre oranı %55.3 olarak belirlendi. YEL+75 mM Mg²⁺ besi ortamında üretilen ikili mutant hücrelerinde boyca uzun ve tek nukleuslu hücre oranı 24. saatte %46.2, 48. saatte %44.1 olarak belirlendi. Her iki ırkın hücrelerinde tek nukleuslu hücre yüzdesinin çift nukleuslu hücre yüzdesinden fazla çıktığı görüldü. (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Kontrol ve ikili mutant ırkta boy ve nukleusa göre hücre yüzdeleri.

	Kısa Boy Tek Nukleus (%)	Uzun Boy Tek Nukleus (%)	Uzun Boy Çift Nukleus (%)
Kontrol (YEL) (24. saat)	37.6	39.6	22.7
Kontrol (YEL) (48. saat)	43.2	44.8	11.9
GA2 (YEL)	36.9	55.3	7.7
GA2 (YEL+75 mM Mg²⁺) (24. saat)	43.1	46.2	8.75
GA2 (YEL+75 mM Mg²⁺) (48. saat)	47.9	44.1	7.9

4.3. TOTAL RNA İZOLASYONU

4.3.1. Hücre Sayımı

YEL besi ortamlarına ekilip etüvde üremeye bırakılan ve logaritmik fazda etüvden alınan hücrelerin Cedex HiRes cihazı ile sayılması sonucu elde edilen veriler Tablo 4.2'de verildi.

Tablo 4.2: Cedex HiRes ile yapılan hücre sayımında elde edilen veriler.

	Total Hücre (x10⁷)	Canlı Hücre (x10⁷)	Canlılık (%)
Kontrol (YEL)	0.69	0.31	45.1
GA2 (YEL)	1.12	0.11	10.4
GA2 (YEL+10 mM Mg²⁺)	0.46	0.09	21.1
GA2 (YEL+ 75 mM Mg²⁺)	1.05	0.19	18.4

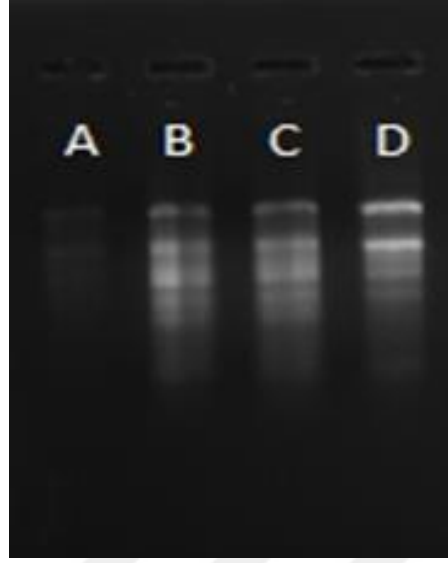
Bu veriler doğrultusunda 10⁸ hücre elde etmek için her bir YEL örneğinden alınan miktarlar Tablo 4.3'te verildi.

Tablo 4.3: Total RNA izolasyonu için hücrelerden alınan örnek miktarları.

	Alınan Miktar (mL)
Kontrol (YEL)	15
GA2 (YEL)	10
GA2 (YEL+10 mM Mg²⁺)	22
GA2 (YEL+75 mM Mg²⁺)	10

4.4. TOTAL RNA'NIN ELEKTROFORETİK ANALİZİ, MİKTAR VE SAFLIK TAYİNİ

Total RNA'nın elektroforetik analizi sonucunda çekilen fotoğraflar, izolasyon işleminin başarılı olduğunu ve her bir örnekten RNA elde edildiğini gösterdi. YEL besi ortamında üretilen ikili mutant hücrelerinden diğer hücelere kıyasla daha az miktarda RNA elde edildiği görüldü (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: Total RNA'nın agaroz jel elektrofezindeki görüntüsü; **A:** GA2 (YEL), **B:** GA2 (YEL+10 mM Mg²⁺), **C:** GA2 (YEL+75 mM Mg²⁺), **D:** Kontrol ırk (YEL).

Her bir RNA örneğinin miktarı ve A260/A280 oranı NanoDrop ölçümü ile belirlendi. Saf RNA'nın A260/A280 oranı yaklaşık 2 kabul edildiğinden elde ettiğimiz RNA örneklerinin saf olduğu görüldü (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: Total RNA'nın NanoDrop ölçüm sonuçları.

	RNA Miktarı (µg/µL)	A260/A280
Kontrol (YEL)	0.9985	2.22
GA2 (YEL)	0.3267	2.16
GA2 (YEL+10 mM Mg²⁺)	0.5874	2.13
GA2 (YEL+75 mM Mg²⁺)	0.4872	2.13

4.5. cDNA SENTEZİ

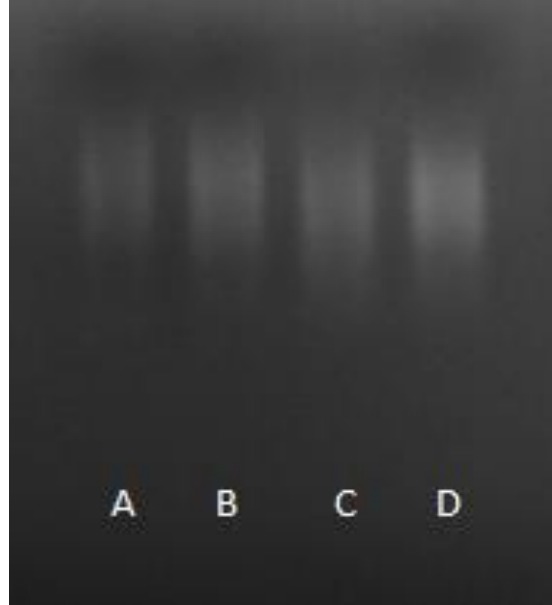
cDNA sentezi için her bir örnekten alınan RNA miktarları Tablo 4.5'te verildi.

Tablo 4.5: cDNA izolasyonunda kullanılan total RNA miktarları.

	Alınan Miktar (μL)
Kontrol (YEL)	2
GA2 (YEL)	2.12
GA2 (YEL+10 mM Mg^{2+})	3.40
GA2 (YEL+75 mM Mg^{2+})	4.10

4.6. cDNA'NIN ELEKTROFORETİK ANALİZİ

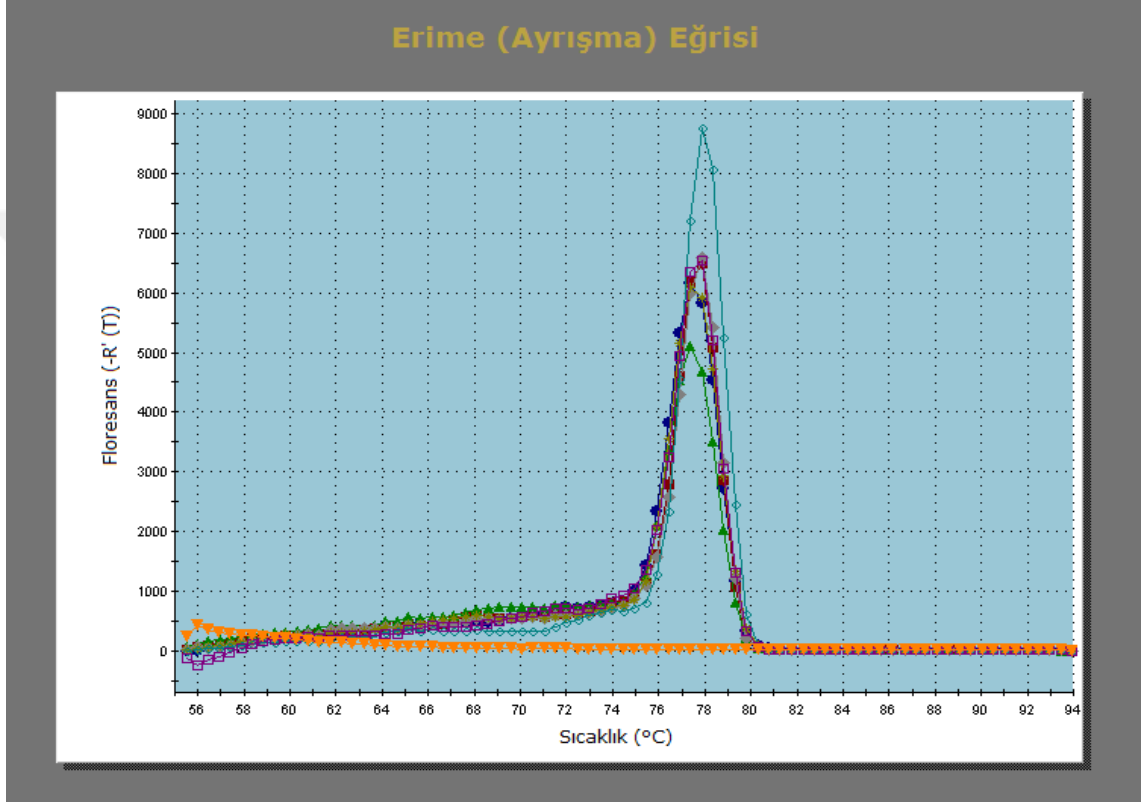
cDNA'nın elektroforetik analizi sonucunda çekilen fotoğraflar, cDNA sentezinin başarılı olduğunu gösterdi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: cDNA'nın agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü; **A:** GA2 (YEL), **B:** GA2 (YEL+10 mM Mg^{2+}), **C:** GA2 (YEL+75 mM Mg^{2+}), **D:** Kontrol ırk (YEL).

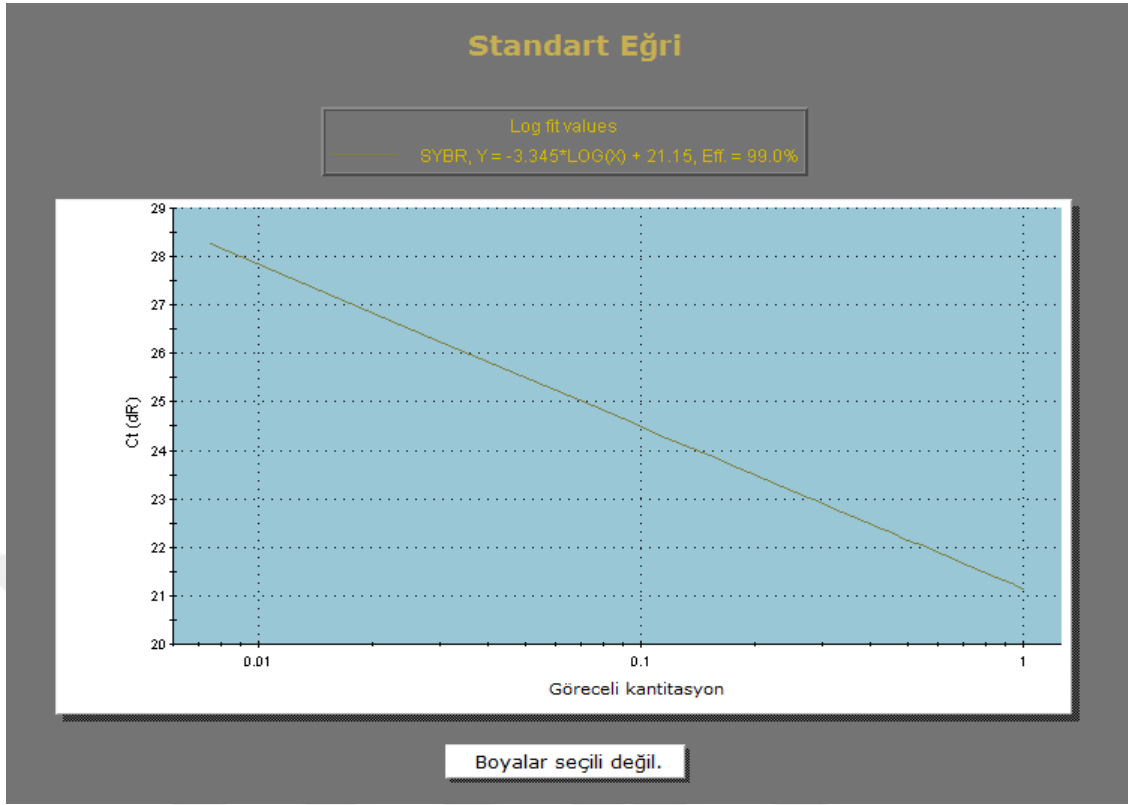
4.7. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU ANALİZİ

SYBR Green kullanılarak gerçekleştirilen GZ-PZR işleminde $p25^{rum1}$ geninin ayrışma eğrisi, hedeflenen gen bölgesinin kullanıldığını ve kontaminasyon olmadığını gösterdi (Şekil 4.9).

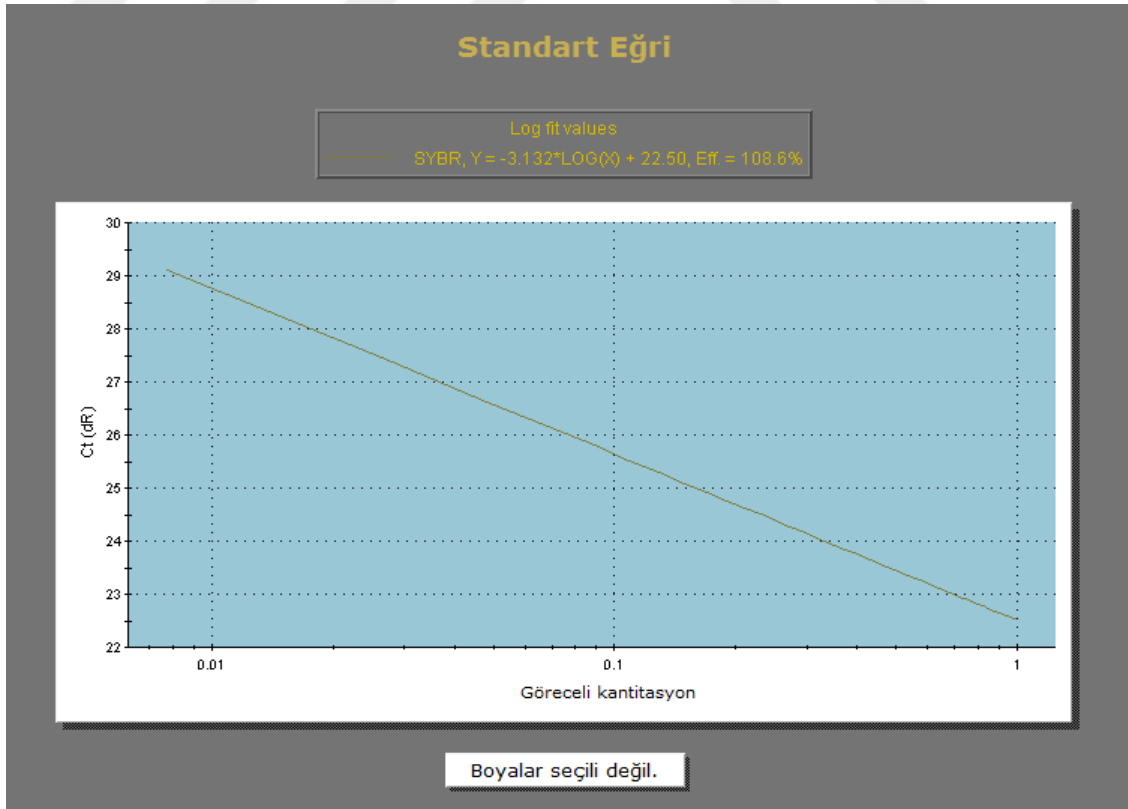


Şekil 4.9: GZ-PZR'de $p25^{rum1}$ geninin erime (ayrışma) eğrisi.

GZ-PZR işleminde kullanılan *act1* ve $p25^{rum1}$ primerlerine ait standart eğriler Şekil 4.10 ve 4.11'de verildi.



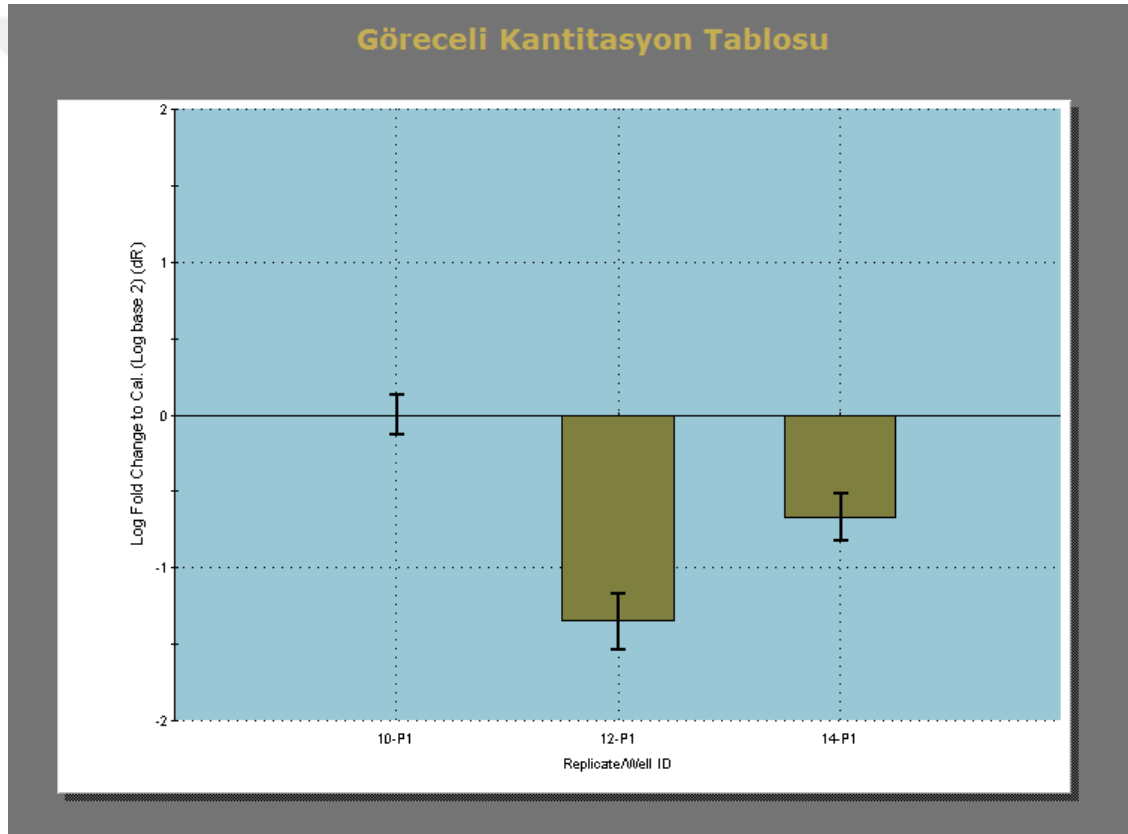
Şekil 4.10: *act1* primerlerinin standart eğrisi (verimlilik oranı %99).



Şekil 4.11: *p25^{rum1}* primerlerinin standart eğrisi (verimlilik oranı %108.6).

GZ-PZR ile elde edilen veriler, $p25^{rum1}$ geninin anlatımının, 10 mM Mg^{2+} ve 75 mM Mg^{2+} destekli besi ortamlarında üretilen ikili mutant hücrelerde kontrol ırka kıyasla azaldığını gösterdi.

İkili mutant ırkın gen anlatımındaki azalmanın seviyesi tespit edildi. 10 mM Mg^{2+} destekli ortamda üretilen ikili mutant hücrelerde gen anlatımı kontrole göre 1.34 kat azalırken, bu oran 75 mM Mg^{2+} destekli besi ortamında üretilen ikili mutant hücrelerde 0.672 kat olarak belirlendi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: $p25^{rum1}$ geninin ikili mutant ve kontrol ırktaki anlatım düzeyleri arasındaki kat farkını gösteren göreceli miktar tablosu. **10-P1:** Kontrol ırk (Kalibratör), **12-P1:** GA2 (YEL+10 mM Mg^{2+}), **14-P1:** GA2 (YEL+75 mM Mg^{2+}).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Magnezyum homeostazının bozulması; genomik kararlılık, RNA'nın işlenmesi, membran akışkanlığı ve membran kanallarının aktivitesi gibi birçok süreci etkiler [5]. *Schizosaccharomyces pombe*'nin hücre döngüsünün G1 fazında anahtar düzenleyici olarak rol oynayan $p25^{rum1}$ 'in düzenli aktivasyonu ve deaktivasyonu, G1 siklinlerinin miktarının ve aktivitelerinin belirlenmesi ve düzenlenmesinde rol oynar; bu da G1 fazının ne kadar süreceğinin tayininde ve hücre döngüsü aşamalarının doğru sırayla gerçekleşmesinde önemlidir [35]. $p25^{rum1}$, G1 fazında cdc2 enziminin cdc13 siklini ile oluşturduğu kompleksle etkileşime girer ve aynı zamanda cdc13'ün yıkılmasında sorumludur [9]. $p25^{rum1}$, hücre bölünme için gereken boyuta ulaşmadan ve G1 kontrol noktasını geçmeden cdc2'nin aktivasyonuna izin vermemektedir [36]. $p25^{rum1}$ geni delesyona uğratıldığında hatalı ve dengesiz hücre bölünmeleri meydana geldiği ve canlılık oranında azalma olduğu görülmüştür [37].

İnsan ve memeli hücrelerinde hücre döngüsü inhibitörlerinin gen anlatımının magnezyum eksikliğinde artması, maya hücrelerinde de böyle bir ilişki olabileceğini düşündürdü. Bu nedenle bu çalışmada *S. pombe*'nin hücre döngüsü inhibitörlerinden $p25^{rum1}$ seçildi ve magnezyum eksikliği ile $p25^{rum1}$ arasında doğrudan bir ilişki olup olmadığı incelendi. Magnezyum eksikliğinin $p25^{rum1}$ geninin anlatım düzeyini artırarak hücre döngüsünü tutuklayabileceği düşünüldü.

Bu amaçla gerçekleştirilen GZ-PZR işlemi sonucunda 10 mM ve 75 mM Mg^{2+} destekli besi ortamında üretilen ikili mutant hücrelerinde $p25^{rum1}$ 'in anlatımının artması beklendi. Elde edilen veriler $p25^{rum1}$ 'in anlatımının, 10 mM ve 75 mM Mg^{2+} destekli ortamda üretilen ikili mutantlarda kontrol ırka göre artma yerine azalma olduğunu gösterdi. Kontrol ırkta gen anlatımı en yüksek seviyede iken, 75 mM Mg^{2+} destekli besi ortamında üretilen ikili mutant hücrelerinde anlatımın azaldığı, 10 mM Mg^{2+} destekli besi ortamında üretilen ikili mutant hücrelerinde ise en düşük seviyede olduğu görüldü. Bu bulgular *S. pombe*'de magnezyum eksikliği ile $p25^{rum1}$ arasında doğrudan bir ilişki olmadığını düşündürmektedir.

Elde edilen bir diğ er bulgu, YEL besi ortamında üretilmiş ikili mutant ırka ait hücrelerin büyük çoğunluğunun küçük olması ve tek nukleus içermesidir. Bu bulgu, hücrelerin bölünme için hazır duruma gelmediğini, dolayısıyla hücre döngüsünün S evresinde ya da erken G2 evresinde tutuklandığını düşündürmektedir. Tutuklanmanın hangi evrede gerçekleştiğ inin flow sitometri ile doğrulanması gerekir, ancak yapılan çalışmalarda hücrelerin Mg^{2+} kısıtlanması yapılmış besi ortamında S fazını geçemediğ i bildirilmiştir [2]. Mg^{2+} destekli ortamdaki ikili mutant hücreleri ise, uzundur ve tek nukleus içermektedir. Bu da, besi ortamına Mg^{2+} ilave edilmesi sonucu hücre içine pasif yolla giren Mg^{2+} 'nin, hücrelerin S fazını geçmesini sağladığını ve hücre döngüsünün G2 evresinin sonlarına kadar devam ettiğ ini, ancak M fazının gerçekleşmediğ ini ve hücre döngüsünün G2 evresinin sonlarında tutuklandığını düşündürmektedir.

Magnezyum transport sisteminin delesyonu pek çok hücrel mekanizmayı etkilediğ inden, *S. pombe*'de magnezyum eksikliğ i ve hücre döngüsünün düzenlenmesi arasındaki ilişkiyi daha iyi anlayabilmek için ayrıntılı analizler yapılması gerekmektedir. Öncelikle kontrol ırkta ve ikili mutant ırkta besi ortamından hücre içine alınan magnezyum miktarının atomik absorpsiyon ile ölçülmesi gerekir. Ardından ikili mutant ırkta gen profillemesi yapılması ve *S. pombe*'deki tüm hücre döngüsü düzenleyicilerinin gen anlatımlarının magnezyum kısıtlaması yapılmış ortamda incelenmesi gerekir. Böylece magnezyum eksikliğ inin *S. pombe*'nin hücre döngüsü ve hücre döngüsü düzenleyicileri üzerindeki etkileri daha iyi anlaşılacaktır.

KAYNAKLAR

- [1]. Van Den Heuvel S., 2005, *Cell-cycle regulation*, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, doi/10.1895/wormbook.1.28.1, <http://www.wormbook.org>, [Ziyaret tarihi: 4 Aralık 2012]
- [2]. Bernardini D., Nasulewic A., Mazur A., Maier J.A., 2005, Magnesium and microvascular endothelial cells: a role in inflammation and angiogenesis, *Front Biosci.*, 10, 1177-82.
- [3]. Sgambato A., Wolf F.I., Faraglia B., Cittadini A., 1999, Magnesium depletion causes growth inhibition, reduced expression of cyclin D1, and increased expression of P27^{Kip1} in normal but not in transformed mammary epithelial cells, *J Cell Physiol.*, 180(2), 245-54.
- [4]. Maier J.A.M., Nasulewicz-Goldeman A., Simonacci M., Boninsegna A., Mazur A., Wolf F.I., 2000, Insights into the mechanisms involved in magnesium-dependent inhibition of primary tumor growth, *Nutr. Cancer*, 59, 1-7.
- [5]. Wolf F.I., Trapani V., 2008, Cell (patho) physiology of magnesium, *Clinical Science*, 114, 27-35.
- [6]. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L. et al., 2000, *Molecular Cell Biology*, 4th edition, New York: W. H. Freeman; Section 13.6, Cell-Cycle Control in Mammalian Cells, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21497/>, [Ziyaret tarihi: 16 Haziran 2016]
- [7]. Draetta G.F., 1994, Mammalian G1 cyclins, *Curr. Opin. In Cell Biol.*, 6, 842-846.
- [8]. Sherr C.J, Roberts J.M., 1995, Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependant kinases, *Genes and Dev.*, 9, 1149-1163.
- [9]. Weinstein I.B., Zhou P., 1997, Cell cycle control gene defects and human cancer, *Encyclopaedia of cancer*, Ed. Bertino JR. *New York Academic Press*, 256-267.
- [10]. Beach D., Durkacz B., Nurse P., 1982, Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast, *Nature*, 300(5894):706-9.
- [11]. Lee M.G., Nurse P., 1987, Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene cdc2, *Nature*, 327(6117):31-5.
- [12]. Sanchez-Diaz A., Gonzales I., Arellano M., Moreno S., 1998, The CDK Inhibitors p25^{rum1} and p40^{SIC1} are functional homologues that play similar roles in the regulation of the cell cycle in fission and budding yeast, *Journal of Cell Science*, 111, 843-851.

- [13]. Barberis M., De Gioia L., Ruzzene M., Sarno S., Coccetti P., Fantucci P., Vanoni M., Alberghina L., 2005, The yeast cyclin-dependant kinase inhibitor Sic1 and mammalian p27^{Kip1} are functional homologues with a structurally conserved inhibitory domain, *Biochem. J.*, 387, 639-647.
- [14]. Wolf F.I., Fasanella S., Tedesco B., Torsello A. et al., 2004, Regulation of magnesium content during proliferation of mammary epithelial cells (HC-11), *Front Biosci*, 9, 2056-2062.
- [15]. Nasulewicz A., Wietrzyk J., Wolf F.I. et al., 2004, Magnesium deficiency inhibits primary tumor growth but favors metastasis in mice, *Biochim. Biophys. Acta*, 1739, 26- 32.
- [16]. Petersen P.H., Zou K., Hwang J.K., Yan Y.N., Zhong W., 2002, Progenitor cell maintenance requires numb and numbl like during mouse neurogenesis, *Nature*, 419, 929–934.
- [17]. Maier J. A., Bernardini D., Rayssiguier Y., Mazur A., 2004, High concentrations of magnesium modulate vascular endothelial cell behaviour in vitro, *Biochim. Biophys. Acta*, 1689, 6–12.
- [18]. Toyoda M., Kojima M., Takeuchi, T., 2000, Jumonji is a nuclear protein that participates in the negative regulation of cell growth, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 274, 332–336.
- [19]. Miyauchi H., Minamino T., Tateno K., Kunieda T., Toko H., Komuro I., 2004, Akt negatively regulates the in vitro lifespan of human endothelial cells via a p59/p21-dependant pathway, *EMBO J.*, 23, 212-20.
- [20]. Killiela D.W., Ames B.N., 2008, Magnesium deficiency accelerates cellular senescence in cultured human fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 5768-73.
- [21]. Wolf F.I., Trapani V., Simonacci M., Boninsegna A., Mazur A., Maier J.M., 2009, Magnesium Deficiency Affects Mammary Epithelial Cell Proliferation: Involvement of Oxidative Stress, *Nutrition and Cancer*, 61 (1), 131-136.
- [22]. Maier J.A., Malpuech-Brugere C., Zimowska W., Rayssiguier Y., Mazur A., 2004, Low magnesium promotes endothelial cell dysfunction: implications for atherosclerosis, inflammation and thrombosis, *Biochim. Biophys. Acta*, 1689, 13–21.
- [23]. Covacci V., Bruzzese N., Sgambato A., Di Francesco A., Russo M.A., Wolf F.I., Cittadini A., 1998, Magnesium restriction induces granulocytic differentiation and expression of p27^{Kip1} in human leukemic HL-60 cells, *J. Cell. Biochem.*, 70, 313-322.
- [24]. Zhiyuan S., 2011, Genomic instability and cancer: an introduction, *J Mol Cell Biol*, 3 (1): 1-3.

- [25]. Wood V. et al, 2002, The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*, *Nature*, 415(6874):871-80.
- [26]. Hoffman C.S., Wood V., Fantes P.A., 2015, An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System, *Genetics.*, 201 (2):403-23. doi: 10.1534/genetics.115.181503.
- [27]. Weissman J., Guthrie C., Fink G.R., *Methods in Enzymology, Volume 470 Guide to Yeast Genetics: Functional genomics, proteomics and other systems analysis, 2nd Edition*, ISBN: 978-0-12-375171-3, Chapter 32, Molecular Genetics of *Schizosaccharomyces pombe*, Sarah A. Sabatinos and Susan L. Forsburg., page 767.
- [28]. Larsen T.A., Goodsell D.S., Cascio D., Grzeskowiak K., Dickerson R.E., 1989, The Structure of DAPI Bound to DNA, *J Biomol Struct Dyn.* 7 (3):477-91.
- [29]. Kapuscinski J., 1995, DAPI: a DNA-specific fluorescent probe, *Biotech Histochem*, 70 (5): 220–33.
- [30]. Herth, W., Schnepf E., 1980, The fluorochrome, calcofluor white, binds oriented to structural polysaccharide fibrils, *Protoplasma (Springer)*, 105 (1-2): 129–133.
- [31]. Hoch, H.C., Galvani C.D., Szarowski D.H., Turner J.N., 2005, Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls, *Mycologia*, 97 (3): 580–588.
- [32]. Burns, E.R., Wittner M., Faskowitz F., 2005, Method for detecting chitin-containing organisms - *Patent 6875421*.
- [33]. Dorak, T., 2006, *Real-time PCR*, Taylor & Francis Group, New York, ISBN: 0-4153-7734-X
- [34]. Uz G., 2012, *Schizosaccharomyces pombe'de Mitotik Mikrotübül Oluşumu Üzerine Magnezyumun Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi.
- [35]. Benito J., Martin-Castellanos C., Moreno S., 1998, Regulation of the G1 phase of the cell cycle by periodic stabilization and degradation of the p25^{rum1} CDK inhibitor, *EMBO J.*, 17 (2), 482-97.
- [36]. Labib K., Moreno S., Nurse P., 1995, Interaction of cdc2 and rum1 regulates Start and S-phase in fission yeast, *Journal of Cell Science*, 108, 3285-3294.
- [37]. Jallepalli P.V., Kelly T.J., 1996, Rum1 and Cdc18 link inhibition of cyclin-dependent kinase to the initiation of DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe*, *Genes Dev.*, 10(5), 541-52.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Dua ÖZBİLENLER
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	19/04/1986, Üsküdar
Telefon	0532 656 1256
E-mail	duaozbilenler@gmail.com

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü / Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı / Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı	2016
Lisans	Biyoloji Bölümü	2008
Lise	Kabataş Erkek Lisesi	2004

Makaleler / Bildiriler

1. Uz G., Özbilenler D., Akman G., Sarıkaya A.T., *Schizosaccharomyces pombe*'de Co^{2+} , Cd^{2+} ve Zn^{2+} Direnci ve Magnezyum Taşıma Sistemi ile İlişkisi, XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 13-16 Aralık 2009, Antalya, Poster Özetleri Kitabı, 31.