



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

***Schizosaccharomyces pombe*'de MİTOTİK MİKROTÜBÜL  
OLUŞUMU ÜZERİNE MAGNEZYUMUN ETKİSİ**

**Gülşen UZ**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**Danışman**

**Prof.Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA**

**Mayıs, 2012**

**İSTANBUL**



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

***Schizosaccharomyces pombe*'de MİTOTİK MİKROTÜBÜL  
OLUŞUMU ÜZERİNE MAGNEZYUMUN ETKİSİ**

**Gülşen UZ**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**Danışman**

**Prof.Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA**

**Mayıs, 2012**

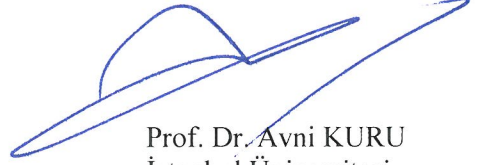
**İSTANBUL**

Bu çalışma 21/06/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

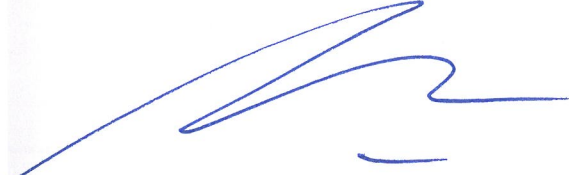


Prof. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA (Danışman)  
Yeni Yüzyıl Üniversitesi


Tez Jürisi



Prof. Dr. Avni KURU  
İstanbul Üniversitesi



Prof. Dr. Şule ARI  
İstanbul Üniversitesi



Prof. Dr. Nazlı ARDA  
İstanbul Üniversitesi



Doç. Dr. Kadir TURAN  
Marmara Üniversitesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin 8001 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## **ÖNSÖZ**

Tez çalışmalarım sırasında bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım değerli danışmanım Prof. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA' ya çok teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen Yard. Doç. Dr. Semian KARAER UZUNER, Yard. Doç. Dr. Bedia GEMİCİ PALABIYIK, Dr. Çağatay TARHAN ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmamın uygulama kısmını gerçekleştirdiğim Newcastle University Institute for Cell and Molecular Biosciences' daki Prof. Michael WHITAKER, Dr. Mark LEVASSEUR ve Dr. Simon WHITEHALL' a her türlü destek ve misafirperverliklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Çalışmam sırasında kendilerini tanıdığım ve tanımaktan ötürü onur duyduğum, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilimdalı' ndaki değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet UĞUR ve Yard. Doç. Dr. Hilmi Burak KANDİLCİ' ye bana bilgilerini aktardıkları ve kıymetli zamanlarını ayırdıkları için teşekkürü bir borç bilirim.

**Mayıs, 2012**

**Gülşen UZ**

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	I
İÇİNDEKİLER .....	II
ŞEKİL LİSTESİ .....	V
TABLO LİSTESİ .....	VIII
SEMBOL LİSTESİ .....	IX
ÖZET .....	XI
SUMMARY .....	XIII
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL KISIMLAR .....	6
2.1. MAGNEZYUMUN FİZİKOKİMYASAL VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ.....	6
2.1.1. Magnezyumun Enzimlerle Olan ilişkisi.....	8
2.1.2. Magnezyumun Nükleik Asitlerle Olan İlişkisi.....	10
2.1.3. Magnezyumun Biyomembranlarla Olan İlişkisi.....	11
2.2. MAGNEZYUMUN BİYOLOJİK AÇIDAN ÖNEMİ.....	11
2.2.1. Magnezyum ve Enerji Metabolizması.....	12
2.2.2. Magnezyum ve Hücre Bölünmesi.....	13
2.2.3. Magnezyum ve Mitotik Mikrotübüller.....	15
2.3. HÜCRESEL MAGNEZYUM TRANSPORTU VE HOMEOSTASİSİ.....	19
2.4. MAGNEZYUMUN ÖLÇÜLMESİ.....	22
2.4.1. Magnezyuma Özgün Floresan Problar.....	24
2.4.2. Hücreiçi Serbest Mg <sup>2+</sup> nin Hesaplanması.....	29

<b>3. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. KULLANILAN IRKLAR VE PLAZMİT.....</b>	<b>30</b>
3.1.1. Kullanılan Irklar.....	30
3.1.2. Plazmit.....	32
<b>3.2. BESİ ORTAMLARI.....</b>	<b>34</b>
<b>3.3. <i>Schz. pombe</i> IRKLARINDA ÜREME EĞRİLERİNİN ÇIKARILMASI.....</b>	<b>36</b>
3.3.1. Generasyon Süresinin ve Generasyon Sayısının Hesaplanması.....	37
<b>3.4. KONTROL VE İKİLİ MUTANT IRKTA BAZI METALLERİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ.....</b>	<b>38</b>
<b>3.5. <i>E. coli</i>'ye PLAZMİT TRANSFORMASYONU.....</b>	<b>39</b>
3.5.1. <i>E. coli</i> (DH5a) Hücrelerinin CaCl <sub>2</sub> Aracılığıyla Kompetent (Yeterli) Hale Getirilmesi.....	39
3.5.2 Transformasyon Aşamaları.....	39
<b>3.6. <i>E.coli</i>' den PLAZMİT İZOLASYONU.....</b>	<b>40</b>
3.6.1. Plazmit DNA' sının Miktarı ve Saflığının Ölçülmesi.....	41
<b>3.7. PLAZMİT DNA' SININ HINDIII RESTRİKSİYON ENDONUKLEAZI İLE KESİMİ.....</b>	<b>42</b>
<b>3.8. AGARUZ JEL HAZIRLANIŞI VE ELEKTROFOREZ.....</b>	<b>42</b>
<b>3.9. pDQ105 PLAZMİTİNİN <i>Schz. pombe</i>'ye TRANSFORMASYONU.....</b>	<b>43</b>
<b>3.10. HÜCRE İÇİ SERBEST MAGNEZYUM İYONUNUN MAG-FURA 2 AM (CELL PERMEANT) FLORESAN PROBU ARACILIĞIYLA ÖLÇÜLMESİ (MAG-FURA 2 IMAGING).....</b>	<b>45</b>
<b>3.11. HOECSHT 33342 İLE GENOMİK MATERYALİN BOYANMASI.....</b>	<b>50</b>
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>51</b>

4.1. KONTROL IRK (SP292) VE İKİLİ MUTAN IRKIN ÜREMELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI.....	51
4.2. MAGNEZYUM KONSANTRASYONUNDAKİ ARTIŞIN, KONTROL IRK VE İKİLİ MUTANT IRKTA, HÜCRE SAYISI, CANLILIK VE HÜCRE ÇAPI ÜZERİNE ETKİSİ.....	53
4.3. FARKLI MAGNEZYUM KONSANTRASYONLARININ KATI BESİYERİNDE KONTROL VE İKİLİ MUTANT IRKIN ÜREMESİ ÜZERİNE ETKİSİ.....	58
4.4. KONTROL VE İKİLİ MUTANT IRKTA BAZI METALLERİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ.....	59
4.5. PLAZMİT İZOLASYONU, MİKTAR TAYİNİ VE SAFLIK KONTROLÜ.....	61
4.6. PDQ105' İN KONTROL VE İKİLİ MUTANT IRKA TRANSFORMASYONU.....	62
4.7. HÜCRE İÇİ SERBEST MAGNEZYUMUN MAG-FURA 2 ARACILIĞIYLA ÖLÇÜLMESİ.....	64
4.8. HÜCRE İÇİ MAGNEZYUMUN MİTOTİK MİKROTÜBÜLLERİN OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ.....	73
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	84
6. KAYNAKLAR .....	94
7. ÖZGEÇMİŞ .....	105



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1.1	:Magnezyum iyonunun altı su molekülü ile oluşturduğu oktahedral konformasyon .....	8
Şekil 2.2.1	:Hücre içi magnezyumun dağılımı.....	12
Şekil 2.2.2	:Hücre bölünmesinin farklı aşamalarında magnezyumun rolü.....	14
Şekil 2.2.3	:A.Böbrek epitel hücrelerinde interfaz mikrotübülleri ve mitotik mikrotübüller B.Mitotik mikrotübüllerin ayrıntılı olarak şematize edilmesi.....	16
Şekil 2.2.4	: <i>Schizosaccharomyces pombe</i> 'de hücre döngüsünün farklı evrelerinde mikrotübüllerin durumu.....	17
Şekil 2.2.5	:Mikrotübül polimerizasyonu ve depolimerizasyonu.....	17
Şekil 2.3.1	:Hücre içi $Mg^{2+}$ nın regülasyonunda olası mekanizmalar .....	20
Şekil 2.4.1	:Nonpolar mag-fura-2 AM'nin, hücresel esteraz aracılığıyla, hücre içinde $Mg^{2+}$ ya duyarlı olan polar gruplarının ortaya çıkışı .....	24
Şekil 2.4.2	: $Mg^{2+}$ ya özgü mag-fura-2 ve $Ca^{2+}$ ya özgü fura-2 problemlerinin kimyasal yapılarının karşılaştırılması.....	26
Şekil 2.4.3	: $Mg^{2+}$ ya özgün kumarin türevli problemlerin kimyasal yapısı.....	26
Şekil 2.4.4	:DCHQ probunun kimyasal yapısı ve HC11 fare meme hücresinde $Mg^{2+}$ nın prob aracılığıyla yerleşiminin gösterilmesi.....	27
Şekil 2.4.5	:İki eksitasyon dalga boyuna sahip probun $Mg^{2+}$ ya bağlı ve serbest olduğu durumlarda floresan yoğunluğunun ve oranının hipotetik olarak gösterilmesi.....	27
Şekil 2.4.6	:A) Nonratiometric prob ile ölçüm B) Ratiometric prob ile yapılan ölçüm.....	28
Şekil 3.1.1	:Plazma membranındaki $Mg^{2+}$ transportundan sorumlu genler bakımından, PZR temelli delesyon yapılarak elde edilen ikili mutant ırkın, elde edilmiş aşamaları .....	31
Şekil 3.1.2	:pDQ105 Plazmitinin genetik haritası.....	33
Şekil 3.10.1	:Orantısız görüntüleme temel prensibi.....	47
Şekil 3.10.2	:A).MetaFluor yazılımı kullanılarak yapılan örnek bir ölçüm B) <i>Schz. pombe</i> ' de mag-fura 2 ile yapılan ölçüm.....	48
Şekil 3.10.3	:Floresan görüntüleme (fluorescence imaging) sistemi.....	50
Şekil 4.1.1	:Sp292 ırkının YEL besi ortamındaki üreme eğrisi.....	51
Şekil 4.1.2	:İkili mutantın farklı $Mg^{2+}$ konsantrasyonlarındaki YEL besi ortamlarında üreme eğrilerinin karşılaştırılması.....	52
Şekil 4.1.3	:İkili mutantın magnezyum içermeyen ve üreyebildiği optimum $Mg^{2+}$ konsantrasyonuna sahip YEL besi ortamında üreme eğrilerinin karşılaştırılması .....	52
Şekil 4.2.1	:Farklı Mg konsantrasyonlarının kontrol ırkın hücre sayısı üzerine etkisi.....	54
Şekil 4.2.2	:Farklı $Mg^{2+}$ konsantrasyonlarının ikili mutant ırkın hücre sayısı üzerine etkisi.....	54
Şekil 4.2.3	:Artan $Mg^{2+}$ konsantrasyonunun, kontrol ırkta canlılık üzerine etkisi.....	55

<b>Şekil 4.2.4</b>	:Artan $Mg^{2+}$ konsantrasyonunun, ikili mutant ırkta canlılık üzerine etkisi.....	<b>56</b>
<b>Şekil 4.2.5</b>	:Artan $Mg^{2+}$ konsantrasyonunun, kontrol ırkta hücre çapı üzerine etkisi....	<b>57</b>
<b>Şekil 4.2.6</b>	:Artan $Mg^{2+}$ konsantrasyonunun, ikili mutant ırkta hücre çapı üzerine etkisi.....	<b>57</b>
<b>Şekil 4.3</b>	:Farklı $Mg^{2+}$ konsantrasyonlarının katı besiyerinde kontrol ve ikili mutant ırkta üreme üzerine etkisi (Kontrol:Sp292, 2M:İkili Mutant İrk).....	<b>58</b>
<b>Şekil 4.4.1</b>	:YEA besi ortamında 1 mM- 2 mM- 3 mM $CoCl_2$ konsantrasyonlarının kontrol ve ikili mutant ırkın üremesi üzerine etkisi (Kontrol:Sp292, 2M:İkili Mutant ).....	<b>59</b>
<b>Şekil 4.4.2</b>	:YEA besi ortamında 5 mM- 6 mM-7 mM $NiSO_4$ konsantrasyonlarının kontrol ve ikili mutant ırkın üremesi üzerine etkisi.....	<b>60</b>
<b>Şekil 4.4.3</b>	:YEA besi ortamında 150 $\mu M$ - 250 $\mu M$ - 500 $\mu M$ $CdCl_2$ konsantrasyonlarının kontrol ve ikili mutant ırkın üremesi üzerine etkisi.....	<b>60</b>
<b>Şekil 4.4.4</b>	: YEA besi ortamında 4-5 mM $ZnCl_2$ konsantrasyonlarının, kontrol ve ikili mutant ırkın üremesi üzerine etkisi.....	<b>61</b>
<b>Şekil 4.5</b>	:pDQ105 plazmitinin HindIII ile kesim sonuçlarının agaroz jel elektroforezi ile analizi. 1- 10 kb markır, 2- pDQ105+ HindIII.....	<b>62</b>
<b>Şekil 4.6.1</b>	:İkili mutantın pDQ105 ile transformasyonunun gerçekleştiği A.'da transformasyon öncesi EDTA ile yıkanan hücrelerin oluşturduğu büyük transformant koloniler, B.' de EDTA ile yıkama yapılmadan transformasyon yapılması sonucunda oluşan küçük transformant koloniler.....	<b>63</b>
<b>Şekil 4.6.2</b>	:Kontrol ırkın (Sp292) pDQ105 ile transformasyonu.....	<b>63</b>
<b>Şekil 4.6.3</b>	:Transformasyon sonrası kontrol ve ikili mutantın floresan mikroskopunda 1000x büyütme ile elde edilmiş görüntüleri .....	<b>64</b>
<b>Şekil 4.7.1</b>	:Mag-fura 2 ile yükleme yapılmayan ve yüklemenin gerçekleştiği kontrol ırka ait hücrelerin orantısal görüntüleri.....	<b>65</b>
<b>Şekil 4.7.2</b>	:Mag-fura 2 ile yükleme yapılan hücrelerde, ışık mikroskobu görüntüsü (brightfield) ile ratio görüntüsü.....	<b>65</b>
<b>Şekil 4.7.3</b>	:Kalibrasyon sırasında, hücre ortamına artan konsantrasyonlarda $Mg^{2+}$ eklenmesinin R değeri üzerindeki etkisi.....	<b>66</b>
<b>Şekil 4.7.4</b>	:Hücre ortamına 10 mM $MgCl_2$ ilave edilen, hücre döngüsünün G1-S ve G2-M aşamalarında bulunan 5 farklı hücreye ait R değerlerinin zamana bağlı değişimi.....	<b>67</b>
<b>Şekil 4.7.5</b>	:Artan EDTA konsantrasyonlarının R değeri üzerine etkisi.....	<b>69</b>
<b>Şekil 4.7.6</b>	: 340 nm ve 380 nm ' deki floresan yoğunluğunun zamanla azalmasına bağlı olarak R değerinin artması.....	<b>70</b>
<b>Şekil 4.7.7</b>	:Kontrol ve ikili mutant ırktan elde edilen R değerlerinin karşılaştırılması.....	<b>71</b>
<b>Şekil 4.7.8</b>	:Mag-fura 2 yüklü ikili mutanta ait hücrelerde ışık mikroskobu görüntüsü, ratio görüntüsü, 340 ve 380 eksitasyon filtrelerinden elde edilen görüntüler.....	<b>72</b>
<b>Şekil 4.8.1</b>	:Magfura-2 ile yüklenmiş A. Kontrol ırk, B. İkili mutant ırka ait hücrede, GFP sinyali alınmasına rağmen mikrotübül yapısının görülmemesi.....	<b>75</b>
<b>Şekil 4.8.2</b>	:24.saatte kontrol ve ikili mutant ırkın (Mg destekli ve desteksiz ortamda) mikrotübülleri.....	<b>77</b>
<b>Şekil 4.8.3</b>	:24.saatte Kontrol ırkta ve ikili mutant ırkın Mg destekli (2M 75) ve Mg desteksiz (2M 0) ortamlarda canlılık yüzdeleri.....	<b>78</b>
<b>Şekil 4.8.4</b>	:24. saatte kontrol ırkta ve ikili mutant ırkta (Mg destekli -2M 75 ve Mg desteksiz -2M 0) mitotik mikrotübül yüzdeleri.....	<b>79</b>
<b>Şekil 4.8.5</b>	:48. saatte kontrol ve ikili mutant ırkın mikrotübülleri.....	<b>79</b>

<b>Şekil 4.8.6</b>	:Kontrol ve ikili mutant ırkta başlangıç anındaki (0), 24. ve 48.saatteki canlılık yüzdeleri.....	<b>80</b>
<b>Şekil 4.8.7</b>	:Kontrol ve ikili mutant ırkta, seçici minimal besi ortamında hücre sayısındaki artışın incelenmesi.....	<b>80</b>
<b>Şekil 4.8.8</b>	:Durağan fazda kontrol ve ikili mutant ırka ait hücrelerin bulunduğu hücre döngüsü aşamaları.....	<b>82</b>
<b>Şekil 4.8.9</b>	:Durağan fazda kontrol ve ikili mutant ırkın, hücre bölünmesinin hangi aşamalarda bulunabileceğini gösteren şematik şekil.....	<b>83</b>

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2.1.1</b>	:Tipik bir memeli hücresinde metal iyonlarının dağılımı.....	6
<b>Tablo 2.1.2</b>	:Erişkin bir insanda magnezyumun dokular arasındaki dağılımı.....	7
<b>Tablo 2.1.3</b>	:Mg <sup>2+</sup> gerektiren enzim sınıfları.....	9
<b>Tablo 2.3.1</b>	:Prokaryotik ve ökaryotik Mg <sup>2+</sup> transport proteinleri .....	21
<b>Tablo 2.4.1</b>	:Magnezyuma özgü floresan problemlerin kimyasal ve spektroskopik özellikleri.....	25
<b>Tablo 3.1.1</b>	:Çalışmada kullanılan ırklar ve plazmit.....	32
<b>Tablo 3.2.1</b>	: <i>Schz. pombe</i> 'nin üretiminde kullanılan besi ortamları.....	34
<b>Tablo 3.2.2</b>	:MML ve MMA besi ortamında kullanılan stok çözeltiler.....	35
<b>Tablo 3.2.3</b>	: <i>E. coli</i> 'nin üretiminde kullanılan besi ortamları.....	36
<b>Tablo 3.4.1</b>	:Farklı konsantrasyonlarda ağır metaller içeren besi ortamları.....	38
<b>Tablo 3.5.1</b>	: <i>E.coli</i> 'ye transformasyon için gereken çözelti ve besi ortamları.....	40
<b>Tablo 3.6.1</b>	:Plazmit izolasyonunda kullanılan kitin bileşenleri.....	41
<b>Tablo 3.7</b>	:HindIII enzim kesimi reaksiyon bileşenleri.....	42
<b>Tablo 3.8</b>	:Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tampon ve çözeltiler.....	43
<b>Tablo 3.9</b>	:Transformasyonda kullanılan tampon ve çözeltiler.....	45
<b>Tablo 3.10.1</b>	:Mag-fura 2 aracılığıyla hücre içi serbest Mg <sup>2+</sup> nin ölçümü için gerekli tampon,çözeltiler.....	49
<b>Tablo 3.10.2</b>	:Floresan görüntüleme (fluorescence imaging) için kullanılan sistemin özellikleri.....	49
<b>Tablo 4.1</b>	:Kontrol ırkın YEL, ikili mutantın YEL ve optimum ürettiği YEL+75 mM MgCl <sub>2</sub> besi ortamlarında, generasyon sayıları ve süreleri.....	53
<b>Tablo 4.5</b>	:Plazmit DNA'sının spektrofotometrik analizi.....	62
<b>Tablo 4.7.1</b>	:Kontrol ve ikili mutant ırktan elde edilen R değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	71
<b>Tablo 4.8.1</b>	:Kontrol ırkın seçici minimal ortamda ve ikili mutant ırkın Mg <sup>2+</sup> destekli ve Mg <sup>2+</sup> desteksiz seçici minimal ortamdaki generasyon sayıları.....	81

## SEMBOL LİSTESİ

<b>ALR1</b>	:Mayalarda magnezyum transportundan sorumlu protein 1
<b>ALR2</b>	:Mayalarda magnezyum transportundan sorumlu protein 2
<b>CorA</b>	:Prokaryotlarda magnezyum transportundan sorumlu protein
<b>YEL</b>	:Maya özütlü sıvı besiyeri
<b>YEA</b>	:Maya özütlü katı besiyeri
<b>ATP</b>	:Adenozin trifosfat
<b>DNA</b>	:Deoksiribonükleik asit
<b>RNA</b>	:Ribonükleik asit
<b>GTP</b>	:Guanozin trifosfat
<b>GFP</b>	:Green fluorescent protein (Yeşil floresan protein)
<b>NTP</b>	:Nükleozit trifosfat
<b>rRNA</b>	:Ribozomal RNA
<b>EDTA</b>	:Etilendiamintetraasetik asit
<b>k<sub>ex</sub></b>	:Ligand değişim sabiti
<b>K<sub>d</sub></b>	:Disosiasyon sabiti
<b>CCCP</b>	:carbonyl cyanide m-chloro phenyl hydrazone
<b>FCCP</b>	:p-trifluoromethoxy carbonyl cyanide phenyl hydrazone
<b>HC11</b>	:Fare meme epitel hücre hattı
<b>HL-60</b>	:İnsan promyelositik lösemi hücre hattı
<b>MCF7</b>	:İnsan meme adenokarsinoma hücre hattı
<b>PtK2</b>	:Kanguru böbrek epitel hücresi
<b>nda2<sup>+</sup></b>	: <i>Schz. pombe</i> ' de $\alpha$ tubulin geni
<b>atb2<sup>+</sup></b>	: <i>Schz. pombe</i> ' de $\alpha$ -2 tubulin geni
<b>nda3<sup>+</sup></b>	: <i>Schz. pombe</i> ' de $\beta$ tubulin geni
<b>gtb1<sup>+</sup>/ tug1</b>	: <i>Schz. pombe</i> ' de $\gamma$ tubulin geni
<b>cAMP</b>	:Cyclic adenosine monophosphate (Siklik adenozin monofosfat)
<b>LPE10</b>	:Mayalarda mitokondriyal magnezyum transportundan sorumlu protein
<b>MRS2</b>	:Mayalarda mitokondriyal magnezyum transportundan sorumlu protein
<b>pet<sup>-</sup></b>	:Mayalarda mitokondri DNA' sında meydana gelen mutasyon çeşiti
<b>AAS</b>	:Atomik absorpsiyon spektroskopisi
<b>NMR</b>	:Nükleer manyetik rezonans
<b>ICP-MS</b>	:Induction coupled plasma mass spectrometry
<b>PZR</b>	:Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>ORF</b>	:Open reading frame (Açık Okuma Çerçevesi)
<b>MMA</b>	:Minimal katı besi ortamı
<b>MML</b>	:Minimal sıvı besi ortamı
<b>LEU2</b>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ' de beta-isopropilmalat dehydrogenaz geni
<b>LB</b>	:Luria bertani sıvı besi ortamı
<b>LBA</b>	:Luria bertani katı besi ortamı
<b>O.D.</b>	:Optik dansite
<b>EtBr</b>	:Etidyum bromür

<b>TAE</b>	:Tris asetat tamponu
<b>TE</b>	:Tris-EDTA tamponu
<b>LiAc</b>	:Lityum asetat
<b>PEG</b>	:Polietilen glikol
<b>DMSO</b>	:Dimetil sülfoksit
<b>kb</b>	:Kilobaz

## ÖZET

### *Schizosaccharomyces pombe*' de MİTOTİK MİKROTÜBÜL OLUŞUMU ÜZERİNE MAGNEZYUMUN ETKİSİ

Magnezyum ( $Mg^{2+}$ ), hücrel sistemlerde en çok bulunan divalent katyon olup, birçok biyolojik fonksiyon için önemlidir. Biyomembranların ve nükleik asitlerin kararlılığını sağlar; DNA, protein sentezi ve iyon kanallarının çalışmasının düzenlenmesi gibi birçok hücrel işlevden sorumlu 300' den fazla enzimin ko-substratıdır. Ayrıca magnezyum, mikrotübül polimerizasyonu ve sitokinez gibi diğer hücrel işlevlerle de ilgilidir. Kardiyovasküler hastalıklar, primer hipertansiyon, diabet ve metabolik sendrom gibi pekçok hastalık,  $Mg^{2+}$  homeostasisinin bozulmasıyla ilişkilidir.

Mitozun ilk aşamalarında, mitotik mikrotübüllerin polimerizasyonu,  $Mg^{2+}$  ve GTP varlığında gerçekleşir. Önceleri yapılan bir çalışmada, hücreler büyürken hücre içi  $Mg^{2+}$  konsantrasyonunun düştüğü ve bunun mitotik mikrotübüllerin oluşumunu sağladığı, hücre bölünmeden önce hücre içinde  $Mg^{2+}$  konsantrasyonunun artarak mitotik mikrotübüllerin depolimerize olduğu yönünde bir hipotez öne sürülmüştü. Magnezyumun, mikrotübüllerin polimerizasyonunu teşvik ettiği bilinmesine rağmen, hücre bölünmesi öncesinde mitotik mikrotübüllerin depolimerizasyonunu nasıl sağladığını gösteren özgün bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca bu zamana kadar,  $Mg^{2+}$ 'nin mikrotübüller üzerindeki etkisini anlamak amacıyla, mikrotübüllerin floresan mikroskopunda görünür hale gelmesi için immunofloresan yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem hücrelerin fikse edilmesini gerektiren bir yöntem olup,  $Mg^{2+}$ 'nin mitotik mikrotübüller üzerine etkisi gösterilmemiştir. Dolayısıyla  $Mg^{2+}$ 'nin mitotik mikrotübüller üzerine etkisini göstermek için, *Schizosaccharomyces pombe*'nin, bilinen iki magnezyum transport geni bakımından delesyonlu ikili mutant ırkı ve bu ırkın elde edildiği magnezyum transport sistemine sahip atasal ırkı, kontrol olarak kullanıldı. Mikrotübülleri floresan mikroskopunda görünür hale getirmek için, iki ırka, GFP işaretli alfa 2 tubulin geni taşıyan pDQ105 plazmidi aktarıldı. Magnezyumun GFP işaretli mitotik mikrotübüller üzerine etkisini göstermek ve eş zamanlı olarak da serbest  $Mg^{2+}$ 'nin kantifikasyonunu yapmak için, iyon formundaki  $Mg^{2+}$ 'ya özgün Mag-fura 2 AM probu kullanıldı.

Sadece iyon formundaki  $Mg^{2+}$ 'nin kantifikasyonu için oldukça duyarlı olan orantısal görüntüleme (ratiometric imaging) yöntemi kullanılarak, hücre içi serbest  $Mg^{2+}$ 'nin, ikili mutantta kontrole göre daha düşük olduğu gösterildi. *Schz. pombe*'de mag-fura 2 AM probunun kalibrasyon güçlüğü nedeniyle, hücre içi  $Mg^{2+}$  kantifikasyonu yapılamadı. GFP işaretli mikrotübüllerin mag-fura 2 probuna karşı oldukça duyarlı olduğu gösterildi ve mag-fura 2 yüklü hücrelerde mikrotübüller gözlenemedi. Bu nedenle mikrotübüllerin ve serbest magnezyumun eş zamanlı gösterebilmesi için, kullandığımız yöntemin geliştirilmesi gerektiğine karar verildi. Diğer taraftan ikili

mutantta başlangıçta sağlıklı interfaz mikrotübülleri görülmesine rağmen, ilk hücre bölünmesinden sonra, kısa, daha az sayıda ve organizasyonu bozulmuş interfaz mikrotübülleri görüldü. Kontrol ırkta dördüncü bölünmeden sonra mikrotübüller görülmez hale gelirken, ikili mutantta ikinci bölünmeden sonra mikrotübüller görülmez hale geldi. Bu durumun, ikili mutantın mikrotübül polimerizasyonu için gerekli  $Mg^{2+}$  yı, ya pasif yolla sınırlı olarak dış ortamdan almasından ya da mitokondri gibi hücre içi  $Mg^{2+}$  depolarından kullanmasından ileri geldiği düşünüldü. Ayrıca logaritmik fazda, kontrol ırka ait hücrelerde mitotik mikrotübül yüzdesi %17 iken, ikili mutant hücrelerinde %4 olup hücrelerin ~ %70'inin uzun, septumsuz ve tek nukleuslu olduğu gözlemlendi. Bu bulgulara dayanarak, ikili mutant ırka ait hücrelerinin, hücre döngüsünün G2-M evresinde tutuklandığı düşünüldü. Bulgularımız  $Mg^{2+}$  eksikliğinin, mitotik mikrotübüllerin oluşumunu engellediğini, dolayısıyla mitotik mikrotübül oluşum kontrol noktasının etkilenerek, hücre döngüsünde tutuklanmaya yol açmış olabileceğini göstermektedir. Magnezyum eksikliğinin, mitotik mikrotübüller ve de mikrotübül oluşum kontrol noktasına olan etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için, ikili mutantın model hücre olarak kullanılarak, gen anlatım profillemesi yapılmasına gereksinim vardır.



## SUMMARY

### **The Effect of Magnesium on the Formation of Mitotic Microtubules in *Schizosaccharomyces pombe***

Magnesium ( $Mg^{2+}$ ) is the most abundant intracellular divalent cation in cellular systems and important in a great variety of biological functions. It stabilizes biomembranes and nucleic acids and cosubstrate for more than 300 enzymes related multiple cellular processes like DNA, protein synthesis and modulation of ion channels. Magnesium is involved in many other cellular processes such as microtubule polymerization and cytokinesis. An abnormal  $Mg^{2+}$  homeostasis is associated with several disease conditions, such as cardiovascular diseases, essential hypertension, diabetes mellitus, and metabolic syndrome.

In the first stages of mitosis, polymerization of microtubules occurs in the presence of magnesium and GTP. According to a hypothesis from a previous study; when cells grow, intracellular  $Mg^{2+}$  concentration falls. This triggers the formation of mitotic microtubules. Shortly before cell division, rapid  $Mg^{2+}$  influx occurs and intracellular  $Mg^{2+}$  reaches to a concentration that brings about mitotic microtubules breakdown. However the stimulating effect of magnesium on polymerization of microtubules was known, there hasn't been any specific research that shows how magnesium causes depolymerisation of mitotic microtubules before cell division. Also until now, to make microtubules visible, immunofluorescence technique that is only limited to fixed (i.e., dead) cells, has been used to understand the effect of  $Mg^{2+}$  on interphase microtubules not mitotic microtubules. So to show the effect of magnesium on mitotic microtubules during mitosis, two *Schizosaccharomyces pombe* strains were used. One is double mutant strain which was deleted in terms of two essential magnesium transporter genes and its parental strain which has magnesium transport system as a control. The pDQ105 plasmid carrying GFP tagged alpha 2 tubulin gene, was introduced to these two strains to label microtubules fluorescently. Mag-fura 2 AM prob which is specific for ionized magnesium was used to show the effect of magnesium on GFP labelled mitotic microtubules and quantify the ionized magnesium simultaneously.

Using the ratiometric imaging technique which is a very sensitive method for quantifying only free  $Mg^{2+}$ , it has been confirmed that intracellular free magnesium is relatively lower in the double mutant than in control. Because of the mag-fura 2 probe calibration difficulties in *Schz. pombe*, intracellular free  $Mg^{2+}$  quantification couldn't have been done. It was shown that GFP tagged microtubules were very sensitive to chemicals like Mag-fura 2 AM and microtubules were invisible in mag fura 2 loaded cells so our method needs for improvement to show microtubules and free magnesium simultaneously. On the other hand, at first we observed healthy interphase microtubules in the double mutant, however after first division, we observed short, reduced number

of microtubule bundles and defects in microtubule organisation. After the second division, microtubules became invisible in the double mutant, although we observed the same for the control after the fourth division. This made us think that the double mutant uptaked  $Mg^{2+}$  which is essential for the polymerisation of microtubules, either by passive transport in limited quantities or consumed from intracellular stores such as mitochondria. Also in logarithmic phase, the percentage of mitotic microtubules in the double mutant was %4, whereas in control strain was %17 and ~ %70 of the double mutant cells were long without septum and contained only one nuclei. This showed us, the double mutant cells were arrested in G2-M phase of the cell cycle. According to our findings, we think that magnesium deficiency may cause cell cycle arrest by preventing the formation of mitotic microtubules so effecting spindle assembly checkpoint. For a better understanding the effect of magnesium deficiency on mitotic microtubules and so on spindle checkpoint, gene expression profiling needs to be done using the double mutant as a model cell.

## 1.GİRİŞ

Hücrelerde en fazla bulunan iki değerlikli iyon magnezyum ( $Mg^{2+}$ ) başlıca; mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulumda bulunur. Magnezyumun hücre içi toplam konsantrasyonu milimolar düzeydedir. Büyük bir kısmı negatif yüklü moleküllere özellikle fosfat gruplarına, sitoplazma ve nükleustaki ATP, DNA ve RNA gibi makromoleküllere, ribozomlara ve membranlara bağlı olup sadece küçük bir kısmı serbest iyon olarak bulunur. Serbest magnezyum konsantrasyonu nispeten değişmeden kalmasına rağmen toplam magnezyum konsantrasyonu hücre içindeki diğer iyonlara, hormonlara ve diğer metabolik uyarılara bağlı olarak önemli ölçüde değişiklik gösterir [1]. Magnezyum negatif yüklü yapılara bağlanıp yapısal kararlılık sağlamanın yanı sıra; glukoz, lipid, protein, nükleik asit metabolizmasında ve özellikle de ATP oluşumu ile ilgili reaksiyonlarda görevli 300' den fazla enzimin kofaktörü ya da enzim aktivitelerinin allosterik düzenleyicisi olarak da büyük öneme sahiptir. Bütün bu özellikleri nedeniyle magnezyum; replikasyon, transkripsiyon, protein sentezi, DNA onarımı ve genomik kararlılık, hücre iskeletinin düzenlenmesi, sitokinez, sinyal iletimi, hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücrenin antioksidatif durumunun devamının sağlanması ve apoptoz gibi çok önemli hücresel süreçlerde rol oynamaktadır.

Biyolojik membranlar, magnezyum ve diğer iyonlara geçirgen olmadığı için transport proteinler; hücrenin içine, hücre içi yapılara ve hücre dışına magnezyumun taşınmasını sağlar. Farklı hücre tipleri kendi metabolik gereksinimlerine göre farklı yollarla  $Mg^{2+}$ 'yı hücre içine ve hücre dışına taşırlar. Temelde  $Mg^{2+}$  taşınmasından sorumlu transport sistemi *CorA*; birçok bakteri ve arkeada  $Mg^{2+}$  taşınmasından sorumlu transport proteini kodlayan genidir. *Escherichia coli* 'de ilgili genin inaktivasyonundan sonra, kobalta ( $Co^{2+}$ ) direnç geliştiğinden dolayı, bu gene kobalta dirençli (**CoR= Cobalt Resistant**) anlamına gelen '*CorA*' adı verilmiştir [2]. Ökaryotik organizmalardan mayalarda bulunan  $Mg^{2+}$  taşınmasından sorumlu proteinler, *CorA* ile homoloji göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, *CorA* benzeri bu proteinlerin temelde  $Mg^{2+}$  taşınmasından sorumlu olmakla birlikte  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ve  $Sr^{2+}$  gibi katyonların da

taşımasından sorumlu olabileceği bazı organizmalarda gösterilmiştir [3]. *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan bir çalışmada *ALR1* ve *ALR2* adı verilen genlerin aşırı anlatım yapmasıyla alüminyuma ( $Al^{3+}$ ) direnç geliştiği, bu genlerin anlatım yapması engellendiğinde kobalt ( $Co^{2+}$ ) alımının azaldığı ve ortama  $Mg^{2+}$  eklenmesinin hücre çoğalması için gerekli olduğu gözlenmiş olup, magnezyum taşınmasından sorumlu proteini kodlayan *CorA* ile homoloji gösterdiği belirtilmiştir. *S.cerevisiae*'de, *ALR1* delesyonlu mutantın ortamda magnezyum yokluğunda çoğalamadığı, ortama standart konsantrasyonun üstünde  $Mg^{2+}$  eklendiğinde çoğalabildiği gösterilmiştir [3]. *Schizosaccharomyces pombe*'nin plazma membranında  $Mg^{2+}$  taşınmasından sorumlu proteinleri kodlayan genler *ALR1* ve *ALR2* genleri ile homoloji gösteren *SPAC17A2.14* ve *SPBC27B12.12c* (tahmini) olup,  $Mg^{2+}$  transport sistemi ortadan kaldırıldığında organizma standart besiyerinde çoğalamamaktadır. Ancak; ortama 200 mM  $Mg^{2+}$  ilave edildiğinde, hücreler pasif taşıma yoluyla  $Mg^{2+}$  'yi almakta ve çoğalabilmektedir [4]. Magnezyum taşınmasının moleküler mekanizması önemlidir, çünkü magnezyumun hücre içi dengesizliğinin, çok sayıda hastalığın (alzheimer, hipertansyon, ateroskleroz, tip1-2 diyabet, kalp kası tutulumları, kramplar) nedeni olduğu düşünülmektedir.

1970-1980'li yıllarda magnezyumun hücre bölünmesi ve hücre döngüsü üzerine etkisini anlamak amacıyla maya ve memeli hücreleri ile yapılan çalışmalarda, magnezyumun hücre bölünmesi ve hücre döngüsünün kontrolü için gerekli olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılardan Harry Rubin çalışmasında; magnezyumun hücre bölünmesi süreci başlamadan önce reseptör aracılı mitotik sinyallere aracılık ettiğini, protein sentezinin bu süreç içerisinde devam etmesini sağladığını, polimerazlar ve ligazlar  $Mg-ATP^{2-}$  gerektirdiğinden dolayı DNA'nın replikasyon sürecinde yer aldığını, ayrıca hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini ve mitotik mikrotübüllerin oluşumu, sitokinezin gerçekleşmesi gibi hücre bölünmesinin farklı aşamalarında magnezyumun anahtar rolü olduğunu belirtmiştir [5]. Araştırmacılardan Graeme M. Walker ve John Duffus'un, tomurcuklanarak çoğalan maya türü *Kluyveromyces fragilis* ve bölünerek çoğalan maya türü *Schizosaccharomyces pombe* ile yaptıkları çalışmada; hücrelerin magnezyum içermeyen besiyerinde kısa süreli inkübasyonda bölünemediğini, uzun süreli inkübasyonda ise canlılığın azaldığını göstermişlerdir. Bununla birlikte hücre bölünmesinin sitokinezden önceki aşamalarında, hücre içi magnezyum konsantrasyonunun azaldığı, sitokinezden kısa bir süre önce de hücre içine magnezyum

girişini olduğu belirtilmiştir. Bulgularından yola çıkarak, sitokinezden önceki aşamalarda hücre içi magnezyum konsantrasyonunda meydana gelen azalmanın, kalıtım materyalinin yavru hücrelere dağılımını sağlayan mitotik mikrotübüllerin polimerize olmasına imkân sağladığı, sitokinezden hemen önce hücre içine giren magnezyumun ise, mitotik mikrotübüllerin depolimerize olmasını ve sitokinezin gerçekleşmesini sağladığı yönünde bir hipotez ortaya atılmışlardır [6]. Ancak 1980’de öne sürülen bu hipotezden sonra, mikrotübül oluşumunu GTP varlığında teşvik eden  $Mg^{2+}$ ’nin, mikrotübül depolimerizasyonunda nasıl etkili olduğunu açıklayan bir çalışma bulunmamaktadır.

Magnezyumun hücre döngüsü üzerine etkisinin, moleküler düzeyde anlaşılmasını sağlamak amacıyla yapılan çalışmalarda, düşük konsantrasyonda magnezyum içeren besi ortamında, hücre döngüsü inhibitörlerinden p27 [7], p21 [8] ve p53 [9] genlerinin anlatımında artış olduğu, buna paralel olarak hücre döngüsünün ilerlemesini sağlayan cyclin D, cyclin F, transkripsiyon faktörü E2F ve hücre döngüsünün S fazına özgü genlerin anlatımında azalma olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yapılan bir başka çalışmada düşük konsantrasyonda magnezyum içeren besi ortamında G0/G1 fazındaki hücrelerin oranının arttığı, buna karşın S ve G2/M fazındaki hücrelerin oranının azaldığı gösterilmiştir [10].

Hücre iskeletini oluşturan birimlerden mikrotübüller; hücre şeklinin korunması, vesikül, mitokondri ve diğer yapıların hücre içerisinde hareketi ve hücre bölünmesi gibi önemli hücresel olaylarda görev alır. Mikrotübülleri yer alışı hücresel sürece göre adlandırmak mümkündür. Bu nedenle hücre bölünmesi sürecinde, kalıtım materyalinin oluşacak yavru hücrelere doğru bir şekilde aktarılmasını sağlayan mikrotübüller ‘mitotik mikrotübüller’ olarak adlandırılır. Hücre bölünmesi sürecinde, kalıtım materyalini taşımak amacıyla oluşan mitotik mikrotübüller, bu önemli rolünden dolayı antikanser ilaçlarının en önemli hedefidir. Dolayısıyla mikrotübüller üzerine yapılan ve yapılacak olan çalışmalar, hücre biyolojisine yapacağı katkıların yanısıra, çağımızın en önemli hastalığı olan kansere yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Mikrotübüller üzerine yapılan çalışmalar, 1950' li yılların sonuna doğru mikrotübüllerin tanımlanmasıyla başlamıştır. Mikrotübüllerin polimerizasyon ve depolimerizasyonuna yönelik çalışmalar ise 1960' larda başlamıştır. 1972 yılı ise; mikrotübüllerin belli koşullarda polimerize olduğunun anlaşıldığı dönüm noktası olmuştur. Yapılan *in vitro* çalışmalarda mikrotübüllerin soğukta depolimerize olduğu, kolşisinin ise mikrotübül polimerizasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Mikrotübül polimerizasyonunun;  $Ca^{2+}$  iyon konsantrasyonu düşük,  $Mg^{2+}$  ve GTP konsantrasyonu yüksek olan ortamda gerçekleştiği gösterilmiştir [11]. Sitoplazmik mikrotübüllerin polimerizasyon ve depolimerizasyonu üzerine kalsiyum ve magnezyum iyonlarının etkisini gösteren çalışma, interfaz evresindeki PtK2 (rat kanguru böbrek epitel hücresi) ile, hem fiksasyon yapılarak hem de canlı hücre inceleme yoluyla gerçekleştirilmiştir. Her iki yöntemle de; hücrenin bulunduğu ortama 10-20 mM  $MgSO_4$  enjeksiyonundan 5 dakika sonra mikrotübüllerin tamamen kaybolduğu, enjeksiyondan 30 dakika sonra mikrotübül ağının yeniden oluştuğu gösterilmiştir. Bu sonuca göre, magnezyumun mikrotübüller üzerinde geçici olarak toksik etki oluşturduğu ifade edilmiştir. Deney  $CaCl_2$  ile yapıldığında da aynı bulgular elde edilmiştir [12]. Yapılan çalışmada hücreye giren  $Mg^{2+}$  ve  $Ca^{2+}$  iyon konsantrasyonu, hücre hacminde meydana gelen artışın ölçülmesiyle hesaplanmış olup, günümüzdeki mevcut yöntemlerle kıyaslandığında hassas bir yöntem değildir. Deney, hem canlı hücrelerde hem de fikse edilmiş hücrelerde yapılmıştır. Tubulinler, anti-tubulin antikoru ile işaretlendikten sonra, inceleme yapılacak hücreye aktarılmıştır. Hücrenin kendisi tarafından oluşturulan mikrotübüller üzerine magnezyum ve kalsiyum gibi iyonların etkisini, günümüzdeki modern teknikleri kullanarak araştırmak, önemli bir süreç olan hücre bölünmesinin, moleküler anlamda aydınlatılmasında daha yararlı olacaktır.

Yaptığımız literatür taramasından elde ettiğimiz bulguları özetleyecek olursak; magnezyum gerek yapısal olarak gerekse de enzim aktivitelerinin düzenleyerek, birçok hücreyel olayın gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bu önemli olaylardan biri de; eşeysiz üreyen canlılar için türün devamını sağlayan, eşeyli üreyen canlılar için rejenerasyonu sağlayan 'mitoz bölünme' yani hücre bölünmesidir. Mitoz bölünme sonucu oluşacak yavru hücrelerin, fiziksel olarak birbirinden ayrılması olan sitokinez aşamasından önce kalıtım materyalinin eşit olarak dağıtılması gerekir ve bunu sağlayan mitotik mikrotübüllerdir. Yeterli oranda magnezyum ve GTP varlığında tubulin alt üniteleri

birleşerek mikrotübülleri oluşturmaktadır [11]. Bununla birlikte, sitokinezin gerçekleşmesi için mitotik mikrotübüllerin ortadan kaldırılması yani depolimerizasyonu gerekir [6]. Yapılan bir çalışmada, sitokinez aşamasından hemen önce hücre içerisine magnezyum girişi olduğu dolayısıyla magnezyumun, mitotik mikrotübüllerin depolimerizasyonunu sağlayabileceği ileri sürülmüştür [6]. Ancak genel anlamda mikrotübül polimerizasyonunu sağlayan magnezyumun, mikrotübül depolimerizasyonunda nasıl etkili olduğu bilinmemektedir. Ayrıca yapılan diğer bir çalışmada ise; hem magnezyumun hem de kalsiyumun sitoplazmik mikrotübüllerin depolimerizasyonunu sağladığı gösterilmiştir [12]. Yine aynı çalışmada, magnezyumun hücre içine/hücre dışına hareketini sağlayan diğer bir taşıma yolunun da kalsiyum iyonu ile yaptığı antiport (zıt yönlü) taşıma olduğu, dolayısıyla mikrotübül depolimerizasyonunda doğrudan magnezyum iyonu etkili olabileceği gibi, magnezyumun hareketi ile hücre içi depolardan salınması tetiklenen kalsiyum iyonu ya da her iki iyonunun birlikte etkisi olabileceği belirtilmiştir.

Proje kapsamında; hücre bölünmesi, hücre döngüsü ve hücre iskeletinin düzenlenmesi gibi hücrel olayların araştırılmasında, ökaryotik hücre modeli olarak yaygın bir şekilde kullanılan maya türü *Schizosaccharomyces pombe*'nin, magnezyum taşıma sistemine sahip olan ırkı, hücre bölünmesi sırasında magnezyumun mikrotübüller üzerine etkisini göstermede deney grubu olarak kullanılmıştır. Magnezyum taşıma sistemi kaldırılmış ırk ise, magnezyumun alınmadığı duruma model oluşturmasından dolayı negatif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Projemiz ile, hücre bölünmesinin en önemli elemanlarından biri olan mikrotübüllerin polimerizasyonu-depolimerizasyonu üzerine magnezyumun etkisini göstererek, hücre bölünmesi temelli başta kanser olmak üzere pek çok patolojik durumun moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik katkı sağlamayı amaçladık.

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. MAGNEZYUMUN FİZİKOKİMYASAL VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Magnezyum ( $Mg^{2+}$ ), 1808 yılında İngiliz kimyager Sir Humphrey Davy tarafından, magnezyum ve cıva (II) oksit karışımının, elektroliz yöntemiyle ayrıştırılması sonucunda bulunmuştur. Atom numarası 12, kütle numarası 24.305 akb, kaynama noktası  $1107\text{ C}^\circ$ , erime noktası  $650\text{ C}^\circ$  olup, toprak alkali metaller sınıfında yer alan, hegzogonal kristal yapıda, hayati önem taşıyan 11 mineralden (kalsiyum, fosfor, sodyum, potasyum, demir, çinko, bakır, krom, iyot, selenyum, magnezyum) biridir [13].

Doğada magnezyum; bulunan miktar açısından hidrosfer tabakasında ikinci (deniz suyunda:  $Na=450\text{ mM}$ ,  $Mg$  ve  $Cl\sim 50\text{ mM}$ ,  $Ca$  ve  $K\sim 10\text{ mM}$ ), litosfer tabakasında altıncı ( $O>Si>Al>Fe>Ca>Mg$ ), organizmalarda dördüncü (insan vücudunda:  $Ca>K>Na>Mg$ ) sırada yer alır [14]. Hücrede ise  $K^+$  den sonra en fazla bulunan ikinci katyondur (Tablo 2.1.1). Bu katyonun doğada fazla bulunması ve yararlı fiziko-kimyasal özellikleri; biyomembranların, proteinlerin ve nükleik asitlerin yapısal kararlılığının korunmasından, 300 den fazla enzimin kofaktörü ya da allosterik düzenleyicisi olmasına kadar birçok biyolojik işlevde yer almasını sağlamıştır [10].

**Tablo 2.1.1** Tipik bir memeli hücresinde metal iyonlarının dağılımı [15]

İyon	Hücre içi (mM)	Hücre dışı (mM)
$Na^+$	10	145
$K^+$	140	5
$Mg^{2+}$	30 (toplam) < 1 (serbest)	1 (0.5 bağlı , 0.5 serbest)
$Ca^{2+}$	1	4 (toplam)
$H^+$	$5 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-4}$
$Cl^-$	4	110

İnsan vücudunda yaklaşık olarak 20-28 g magnezyum bulunur. Bu magnezyumun %60'ı kalsiyum ve fosfatla birlikte kemiklerde depolanmış olup, kalan %40'ı; kas,

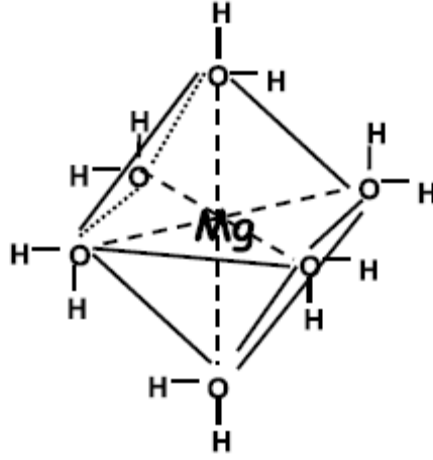


yumuşak doku, eritrosit ve plazmada yer alır (Tablo 2.1.2). Farklı hücre tiplerindeki magnezyum miktarı, magnezyum giriş çıkışını düzenleyen yollar farklı olduğu için, değişiklik gösterir; örneğin beyin ve kalpteki magnezyum miktarı diğer organlardan daha fazladır [16].

**Tablo 2.1.2** Erişkin bir insanda magnezyumun dokular arasındaki dağılımı [16]

Doku	Tam ağırlık (kg)	Magnezyum içeriği (mmol)	Total vücut magnezyumu (%)
Kemik	12	530	53
Kas	30	270	27
Yumuşak doku	23	193	19
Eritrosit	2	5	0,7
Plazma	3	3	0,3
<b>Total</b>	<b>70 kg</b>	<b>1001 mmol</b>	<b>% 100</b>

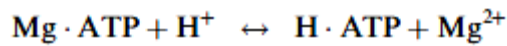
Organizmada magnezyumun birçok biyolojik işlevde yer alması; fazla miktarda bulunmasıyla birlikte biyo-yararlanımını artıran fiziko-kimyasal özelliklerinden ileri gelir. Magnezyum, periyodik tabloda aynı grupta yer alan ve sekonder haberci olarak bilinen kalsiyumla ( $\text{Ca}^{2+}$ ) benzer kimyasal özellikler gösterir. Aynı pozitif yüke sahip olmaları nedeniyle, negatif yüklü moleküllere bağlanmak için rekabete girerler. Ancak magnezyumun, oksijen içeren gruplar taşıyan negatif yüklü moleküllere (örneğin; karboksilat, fosfat, enolat gibi) afinitesi daha fazladır. Diğer taraftan kalsiyumun ligant değişim sabiti daha büyüktür ( $\text{Ca}$ :  $k_{\text{ex}}=10^9 \text{ s}^{-1}$ ,  $\text{Mg}$ :  $k_{\text{ex}}:10^5 \text{ s}^{-1}$ ). Bu özellik, bir liganttan diğer bir liganta hareketini kolaylaştırdığı için kalsiyumun, magnezyumun yerine ideal bir sekonder haberci olmasını sağlamıştır. Bununla beraber, magnezyumun iyon çapı daha küçük olup ( $\text{Mg}$ :  $0.86 \text{ \AA}$ ,  $\text{Ca}$ :  $1.14 \text{ \AA}$ ), hidrasyon enerjisi daha büyüktür ( $\text{Mg}$ :  $-1922$ ,  $\text{Ca}$ :  $-1592 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Magnezyum iyonu, bulunduğu duruma göre 6-7 molekül  $\text{H}_2\text{O}$  ile etkileşime girerken [ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ya da  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ], kalsiyum ( $\text{CaCl}_2$ ) 1-2 molekül  $\text{H}_2\text{O}$  ile etkileşime girer ve magnezyumun su molekülleri ile etkileşimi sonucunda oktahedral konformasyon oluşur (Şekil 2.1.1). Bu durum, magnezyumun kalsiyuma göre daha büyük çapa sahip olmasını sağlar. Ayrıca diğer metal iyonlarına kıyasla, magnezyumun su molekülleri ile etkileşim hızı daha yavaştır. Bu özellik de magnezyumu, kalsiyuma kıyasla biyolojik sistemlerde daha kararlı kılar [17].



**Şekil 2.1.1** Magnezyum iyonunun altı su molekülü ile oluşturduğu oktahedral konformasyon [17].

Magnezyumun stereokimyasal özellikleri düşünüldüğünde, aynı boyuta ve aynı su molekülü değişim sabitine sahip olan nikel ( $\text{Ni}^{2+}$ ), magnezyuma en çok benzeyen kationudur. Ancak nikel, doğada az miktarda bulunuşu ve oksijen donörü gruplar yerine azot donörü içeren gruplarla bağ yapmaya eğilim göstermesi nedeniyle, magnezyum ile rekabet edemez [18, 19].

Hücresele düzeyde yarışmalı reaksiyonlar sadece  $\text{Mg}^{2+}$  ve  $\text{Ca}^{2+}$  arasında değil aynı zamanda  $\text{Mg}^{2+}$  ve protonlar ya da aminler ( $-\text{NH}_2^{2+}$ ) arasında da olur. Protonlar, pH 7 'de  $10^{-7}$  M 'den daha fazla olamazken,  $\text{Mg}^{2+}$  ~1 mM olup, miktar olarak daha fazladır. Bununla birlikte protonlar, pH~6.5 olduğunda fosfat grubuna,  $\text{Mg}^{2+}$  ya kıyasla daha az bağlanır. Ancak pH 6 'ya düştüğünde  $\text{Mg}^{2+}$ , Mg.ATP kompleksinden ayrılmaya başlar.



### 2.1.1. Magnezyumun Enzimlerle Olan ilişkisi

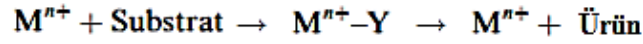
İyon-protein etkileşimi ile ilgili detaylı kristalografik çalışmalar genellikle  $\text{Mg}^{2+}$ , dan ziyade  $\text{Ca}^{2+}$  ya yönelik olmuştur. Hücre içi  $\text{Mg}^{2+}$  nın yaklaşık %90' ı ribozomlara ya da polinükleotidlere bağlıdır.  $\text{Mg}^{2+}$  nın biyolojik görevleri; protein, nükleik asit ve

membranlara bağlanarak yapısal kararlılığı sağlamanın yanısıra, proteinlerin, ribozomların ve enzimlerin, özgün yapısal ve katalitik aktivitelerini kazanmalarını teşvik etmektedir [15]. Magnezyum; enzim-substrat etkileşimine aracılık ederek, ara metabolitleri kararlı hale getirerek, iki farklı substrat arasında köprü oluşturarak ya da doğrudan enzimlere bağlanarak 300' den fazla enzimatik reaksiyonda kofaktör olarak yer almaktadır.

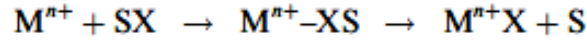
Mg' nin kofaktör olarak etki mekanizmaları şu şekilde özetlenebilir:

( $M^{n+}$ ,  $Mg^{2+}$  yi temsil etmektedir.)

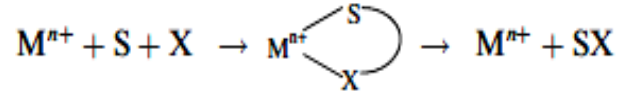
1- Ara metabolitleri (Y) kararlı hale getirmek



2- Oluşan ürünü (X) kararlı hale getirmek



3- İki farklı substrat arasında köprü oluşturup etkileşimlerini kolaylaştırmak



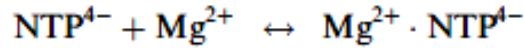
Magnezyum, doğrudan enzime de bağlanarak; ya enzimin yapısını değiştirir veya enzimi katalitik olarak aktif hale gelmesini sağlar [19]. Bu şekilde etki ettiği enzimlerden en iyi bilinenler; ribonükleaz H, ekzonükleaz ve topoizomeraz II olup, diğer etki mekanizmaları ile birlikte üç yüzden fazla enzimatik reaksiyonda yer alır (Tablo 2.1.3), [18].

**Tablo 2.1.3**  $Mg^{2+}$  gerektiren enzim sınıfları [18]

Enzim	Gereksinim
Kinazlar	ATP-Mg fosfat transferi
G-proteinler	GTP-Mg fosfat transferi
Adenilat-siklaz	ATP-Mg substrat
ATPazlar	ATP-Mg substrat
Alkalın fosfataz	Mg bağlanıp enzimi aktifleştirir
Enolaz	Mg enzime bağlanır
İzositrat liyaz	Mg-izositrat substrat
Glutamin sentaz	Mg enzim yapısında
Metil aspartat	Mg enzime bağlanır
Pirofosfataz	Mg substrata bağlanır
Ksiloz izomeraz	Mg enzime bağlanır
Ribulozfosfat karboksilaz	Mg enzim yapısında

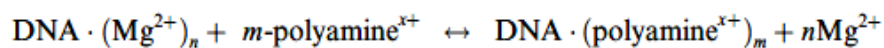
### 2.1.2. Magnezyumun Nükleik Asitlerle Olan İlişkisi

Magnezyum, enzimatik reaksiyonları birçok farklı yoldan etkilemesine rağmen, bu reaksiyonlardaki en önemli rolü; enerji gerektiren reaksiyonlarda substrat ya da fosfat donörü olan ATP' nin kullanımını kontrol etmesidir. Nükleozid trifosfat (NTP) hücrelerde birçok değişik formda bulunur, bunlar içinde  $NTP^{4-}$  en önemlisi olup,  $Mg^{2+}$  ye afinitesi fazladır. Fizyolojik koşullarda, serbest formdaki  $Mg^{2+}$  ortalama olarak ~0.1-0.5 mM düzeyinde olup, ortamda bulunan  $NTP^{4-}$  ler serbest formdaki mevcut  $Mg^{2+}$  ile doygun hale gelemmez. Bu nedenle nükleotidlerin  $Mg^{2+}$  ye bağlanarak biyolojik olarak aktif olduğu bağlı formu ile ayrı olduğu serbest formu arasında önemli bir denge vardır [17].



Magnezyumun önemli biyokimyasal özelliklerinden biri de, nükleik asitlerle kompleks oluşturabilmesidir. Nükleik asitlerin negatif yüklü şeker-fosfat iskeletinin, birçok metalle etkileşimi kolaylaştıracak oranda afinitesi vardır ( $K_d \sim 10^{-2}-10^{-4}$  M). Nükleik asitlerin afinitesi dışında kompleks oluşturmayı etkileyen diğer faktörler ise; metallerin konsantrasyonu ve yük değerleridir. Hücre içi  $Na^+$  ve  $Ca^{2+}$  konsantrasyonları düşük olduğundan (Tablo 2.1.1), hücre içi konsantrasyonları yüksek olan  $K^+$  ve  $Mg^{2+}$ , nükleik asitlerle kompleks oluşturur. Bununla birlikte yükü  $K^+$  dan daha fazla olan  $Mg^{2+}$  nın,  $K^+$  ya göre nükleik asitlerle kompleks oluşturma yeteneği daha fazladır.

Metaller, nükleik asitlerin fosfat grupları arasındaki elektrostatik itme gücünü azaltarak, baz eşleşmesi ve baz diziliminin daha kararlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlar [20]. Magnezyumun, doğrudan DNA ile etkileşimi olsun ya da olmasın gen anlatımını düzenleyeci bir rolü vardır. Bunun en iyi örneği  $Mg^{2+}$  nın, hücre döngüsünün potansiyel düzenleyicileri olan poliaminlerle yarışmalı olarak DNA'ya bağlanmak üzere rekabete girmesidir.



Magnezyum gerek poliaminlerle rekabete girerek, gerekse de  $Mg.ATP$  formunda önemli kinaz reaksiyonlarını etkileyerek, hücre döngüsünde önemli bir role sahiptir. Ayrıca proteinlerle doğrudan etkileşebilme özelliğinde oluşu nedeniyle de histon proteinlerinin fosforilasyonunda anahtar rol oynayabileceği düşünülmektedir [18].

Magnezyum, yer aldığı mekanizmalara bakıldığında; DNA onarımında eksonukleazlar [21], replikasyonda topoizomeraz II, polimeraz I ve transkripsiyonda ribonukleaz H [22] aktivitelerini düzenleyerek genomik kararlılığının sürdürülmesinde önemlidir.

Ribozomal nükleik asitlere gelince,  $Mg^{2+}$  ve  $K^+$  ribozomun büyük alt birimindeki rRNA ve proteinlere bağlı bulunur.  $Mg^{2+}$  konsantrasyonu 10 mM'nin altına düştüğünde rRNA ve proteinler ayrılır, ardından ribozomu oluşturan büyük ve küçük alt birimler birbirinden ayrılır ve  $Mg^{2+}$  serbest kalır [15].

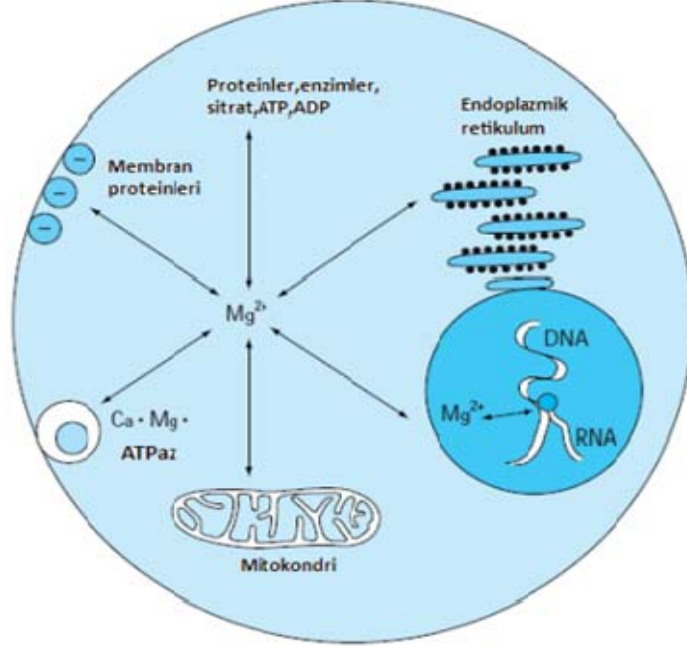
### 2.1.3. Magnezyumun Biyomembranlarla Olan İlişkisi

Prokaryot ve ökaryot hücrelerin hücre membranları ve hücre içi yapılar; lipit, protein, polisakarit ve fosfolipitlerden oluşur. Bununla birlikte birçok yüzey polimeri, polianyonik karboksilat ya da fosfat yapısındadır. Hem  $Ca^{2+}$  hem de  $Mg^{2+}$ , lipidlerin karboksillenmiş ya da fosforillenmiş hidrofilik kısımlarıyla çapraz bağlar yapar ve negatif yüklü yapıları nötralize ederek, membranların kararlılığını sağlarlar. EDTA gibi metallerle şelat yapan bileşikler, membranlara bağlı haldeki  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$ , ya bağlanarak membran yapısının bozulmasına neden olurlar. Membrana bağlanan bu metaller, membranın akışkanlığını ve kararlılığını etkileyerek endositoz ve ekzositoz gibi hücresel olayları düzenlerler. Ayrıca bu metaller, membrandan taşınan çözücü maddelerin osmotik regülasyonuna yardım ederek, membranın suya geçirgenliğini azaltır [17].

## 2.2. MAGNEZYUMUN BİYOLOJİK AÇIDAN ÖNEMİ

Magnezyumun gerek bağlı gerekse de serbest formu ( $Mg^{2+}$ ), her hücre tipinde ve her organizmada mevcut olup, yaşam için gerekli bir mineraldir [23, 24, 25]. Hayvanlarda ve bitkilerde her bir hücre tipi farklı düzeylerde magnezyum içerir [26, 27, 28, 29]. Dolayısıyla her hücre tipi,  $Mg^{2+}$ 'nin taşınmasında farklı mekanizmalara sahiptir ve hücre fonksiyonlarının doğru bir şekilde devam etmesi için  $Mg^{2+}$ 'nin hücreye alınması ve hücre içi yapılara taşınması gerekir [30]. Gerek hayvanlar gerekse de bitkiler için  $Mg^{2+}$ , birçok biyokimyasal reaksiyona hem aracılık eden hem de reaksiyonları teşvik eden, düzenleyici bir sinyaldir. Bitkilerde  $Mg^{2+}$ , insanlardaki demir-hemoglobin ilişkisine benzer şekilde klorofil yapısına katılarak fotosentezde görev alır [31].

Magnezyum, insan vücudunda bulunan miktar açısından dördüncü, hücre içi alanda bulunan miktar açısından potasyumdan sonra ikinci sırada yer alan önemli bir elementtir. Hücre içi magnezyum konsantrasyonu milimolar seviyededir (~15-20 mM) ve büyük çoğunluğu hücre içi yapılara bağlı durumdadır (Şekil 2.2.1), sadece %5'i (0.3-1.2 mM) hücrede serbest halde bulunur [1].



Şekil 2.2.1 Hücre içi magnezyumun dağılımı [32]

### 2.2.1. Magnezyum ve Enerji Metabolizması

Magnezyum, enerji metabolizmasının temeli olan; glikoliz, krebs döngüsü ve elektron transport zincirinde yer alan enzimlerin büyük bir kısmının allosterik düzenleyicisi ya da kofaktörüdür. Ayrıca glukoz transportunu ve glukoz kullanımını da düzenlemektedir [33]. Mg<sup>2+</sup>'nin glukoz transportu ilişkili olduğu, diyabet ve metabolik sendrom olgularında, bozulan Mg<sup>2+</sup> dengesinin hücre içi Mg<sup>2+</sup> düzeyinde azalmaya yol açtığı görülmesiyle ortaya çıkmıştır. Hücre içi Mg<sup>2+</sup>'nin insülin hareketini sağladığı ve insülin aracılı glukoz alımını düzenlediği, Mg<sup>2+</sup> eksikliğinin insülin direnci oluşması altında yatan temel mekanizma olabileceği ileri sürülmüştür [34]. Bu mekanizmanın aydınlatılmasına yönelik çalışmalar yapan Romani ve arkadaşları, in vitro kalp ve kardiyomiyosit kültüründe, glukoz varlığında insülinin, Mg<sup>2+</sup>'nin hücre içine

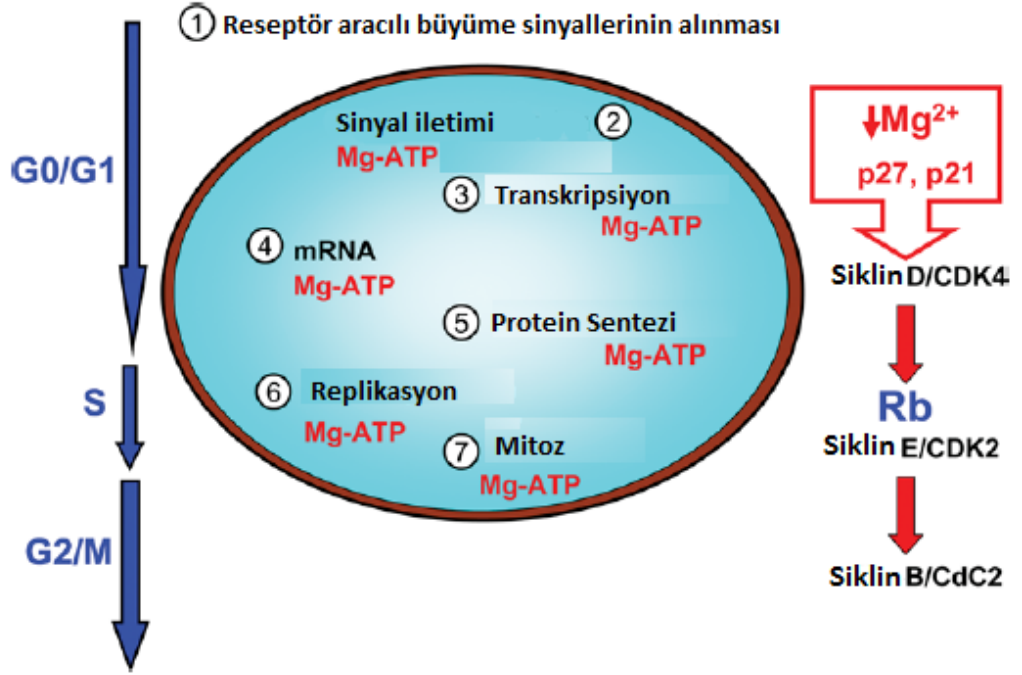
alınmasını teşvik ettiğini göstermiştir [33]. Bununla birlikte, hücre dışındaki ya da hücre içindeki  $Mg^{2+}$  nın doğrudan ya da dolaylı olarak glukoz alımını nasıl düzenlediğini ya da glukozun  $Mg^{2+}$  alımını nasıl teşvik ettiğini açıklayan moleküler mekanizma henüz bilinmemektedir. Ancak  $Mg^{2+}$  nın fosforilasyon/defosforilasyon olaylarını değiştirerek glukoz transportunda etkili olabileceği düşünülmektedir [35].

Magnezyum, fizikokimyasal özelliklerinde belirtildiği üzere; proteinlere, fosfolipidlere ya da nükleik asitlere bağlanır.  $Mg^{2+}$  nın bu hücre içi yapılardan en çok ATP' ye afinitesi vardır ( $K_d$ :  $1 \times 10^{-5}$  M). Bu nedenle ATP,  $Mg^{2+}$  nın şelatörü olarak düşünülür. Glikoliz dışında ATP' nin sentezlendiği yollardan krebs döngüsü ve elektron transport zinciri, mitokondride gerçekleşir. Bu nedenle mitokondri, hücre içi  $Mg^{2+}$  deposu olarak düşünülmektedir. Bu görüşü ispatlayan iki önemli bulgudan birincisi;  $Mg^{2+}$  ye özgün floresan problemlerle yapılan çalışmalarda, mitokondrideki ATP sentezi CCCP (carbonyl cyanide m-chloro phenyl hydrazone) ve FCCP (p-trifluoromethoxy carbonyl cyanide phenyl hydrazone) gibi çeşitli kimyasallarla inhibe edildiğinde, mitokondriden  $Mg^{2+}$  çıkışının olmasıdır [36]. İkinci olarak da, mitokondri membranında  $Mg^{2+}$  ya özgün taşıyıcı proteinlerin varlığıdır. Bunlar; mayada yMrs2 [37] ve insanda hsaMs2p [38] olup, bu proteinlerin anlatımları hayati önem taşır.

Mitokondri dışında endoplazmik retikulumun da  $Mg^{2+}$  açısından zengin olabileceği düşünülmektedir. Bunun nedeni olarak,  $Mg^{2+}$  nın protein senteziyle olan ilişkisi gösterilmekle birlikte [15, 39], endoplazmik retikulumdaki  $Mg^{2+}$  nin yerleşimi ve transportu hakkında yeterince veri bulunmamaktadır. Bu nedenle  $Mg^{2+}$  ya özgün floresan problemler kullanılarak daha fazla deneysel çalışma yapılması gerekmektedir.

### 2.2.2. Magnezyum ve Hücre Bölünmesi

1970 ve 1980'li yıllarda birçok araştırmacı,  $Mg^{2+}$  nın maya ve memeli hücrelerinin çoğalması üzerinde önemli bir rolü olduğunu belirtmişlerdir [5, 6].  $Mg^{2+}$  hücre bölünmesinden önce, reseptör aracılı mitotik sinyallerin alınmasında, protein sentezinde ve DNA'nın replike olmasında, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde, sitokinez öncesi mitotik mikrotübüllerin oluşmasında ve sitokinezde olmak üzere, hücre bölünmesinin birçok farklı aşamasının kontrolünde anahtar bir role sahiptir.



Şekil 2.2.2 Hücre bölünmesinin farklı aşamalarında magnezyumun rolü

Şekil 2.2.2 'de Mg<sup>2+</sup> kısıtlaması yapılmış kültürlerde, hücrelerin sayıca G0/G1 > G2/M > S olmak üzere hücre döngüsünün çeşitli fazlarında tutuklandığı ve Mg<sup>2+</sup> kısıtlamasının moleküler düzeyde hücre döngüsü üzerindeki etkisi gösterilmektedir. Araştırmalardan birinde, Mg<sup>2+</sup> kısıtlaması yapılmış meme epitel hücrelerinde, hücre döngüsü inhibitörlerinden p27'nin anlatımının arttığı [7], kılcal damar endotel hücrelerinde yapılan diğer bir araştırmada ise p21'in anlatımının arttığı gösterilmiştir [8]. Gen anlatım profillemesi yapıldığında, Mg<sup>2+</sup> kısıtlı ortamda p53, jumonji ve numblake gibi hücre döngüsü inhibitörlerinin anlatımında artış olduğu gösterilmiştir [9, 40, 41]. Buna paralel olarak siklin D ve siklin F'nin anlatımında, siklin bağımlı kinazların ve S fazına özgü genlerin anlatımını teşvik ederek hücre döngüsünün ilerleyişini sağlayan transkripsiyon faktörü E2F'nin anlatımında azalış olduğu gösterilmiştir.

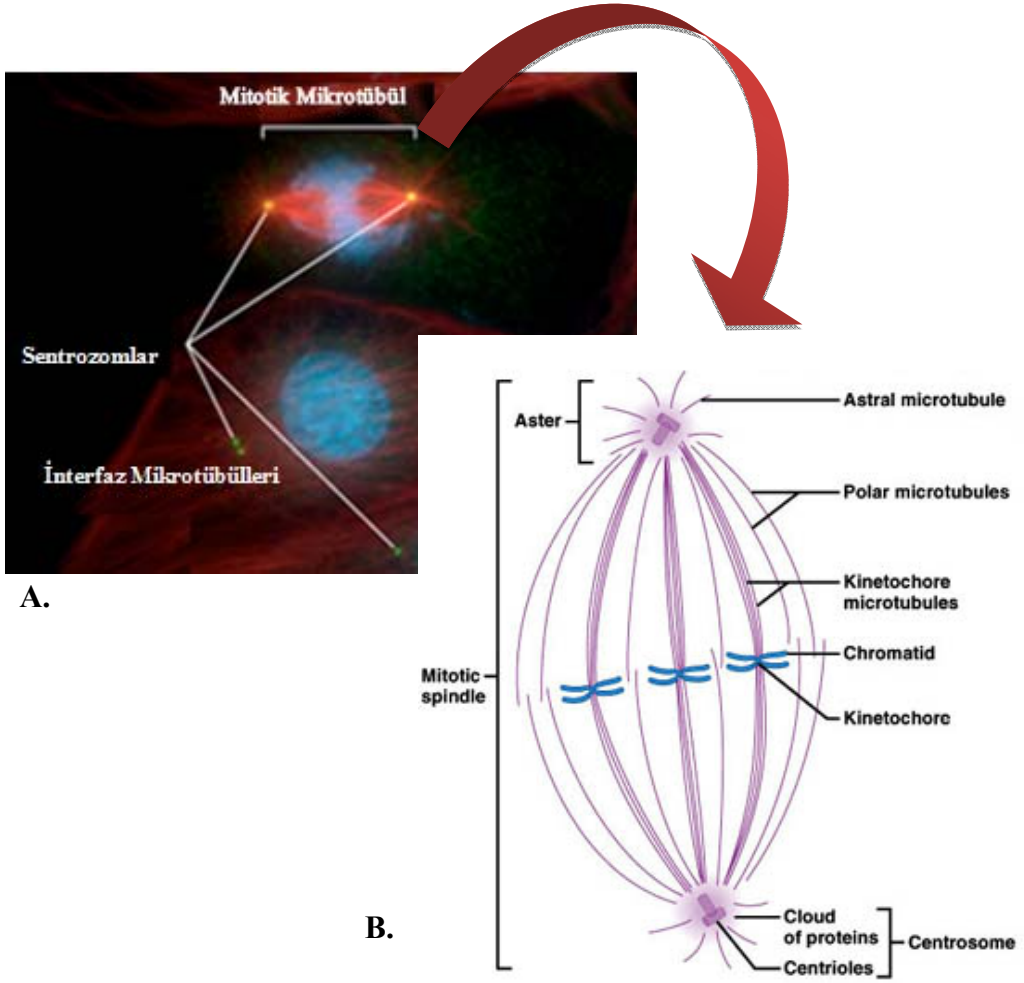
Kültür ortamında Mg<sup>2+</sup> konsantrasyonu artışının, hücre bölünmesini hızlandırdığı [41, 42], ve Mg<sup>2+</sup> kısıtlaması yapılmış ortama Mg<sup>2+</sup> ilave edilmesinin, hücre döngüsünün kaldığı yerden devam etmesini sağladığı gösterilmiştir [43]. Buna rağmen kültür ortamındaki yüksek Mg<sup>2+</sup> konsantrasyonuna adapte olan hücrelerde, ne çoğalmalarında ne de hücre içi Mg<sup>2+</sup> düzeyinde belirgin bir artış olduğu belirtilmiştir [44].



Farklı hücre tipleri, çoğalmak için farklı konsantrasyonda  $Mg^{2+}$  ye gerek duyar. Endotel hücreleri dış ortamdaki  $Mg^{2+}$  konsantrasyonu değişimlerine karşı oldukça hassas olup, dış ortamdaki  $Mg^{2+}$  konsantrasyonu 0.1 mM olduğunda, endotel hücrelerinin çoğalma oranında belirgin bir azalma görülürken, bu değer HC11 memeli epitel hücreleri için 0.05 mM olarak bulunmuştur [7, 45]. Tümör hücreleri dış ortamdaki  $Mg^{2+}$  değişimlerine karşı oldukça direnç gösterir. Örneğin HL-60 lösemi hücreleri, MCF7 meme karsinom ve Ehrlich assit tümör hücreleri, hücre dışı ortamdaki 0.05 mM  $Mg^{2+}$  konsantrasyonuna karşı oldukça dirençlidir [46, 7].

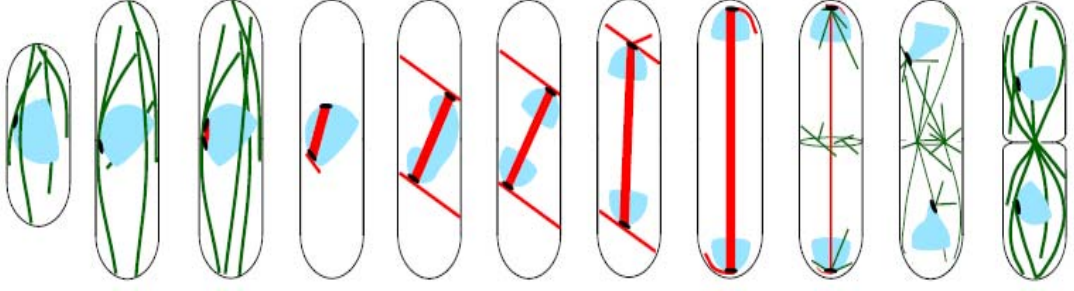
### **2.2.3. Magnezyum ve Mitotik Mikrotübüller**

1879'da Flemming tarafından, kromozomların kasa benzer yapıların kasılmasıyla hareket ettiği iddia edilmiştir [47]. 1950' li yıllarda ise; anafaz kromozomlarının, kinetokorları aracılığıyla, ya kasılabilen fibrillerin ya da kromozoma ait fibrillerin kısılmasıyla mikrotübül oluşturan merkezlere doğru çekildiği yönünde görüşler öne sürülmüştür [48]. 1952' de ise; Mazia ve Dan, mitotik mikrotübül, kromozomlar ve asterlerden oluşan yapıyı izole edip, 'mitotik aygıt' olarak tanımlamışlardır (Şekil 2.2.3) [49].



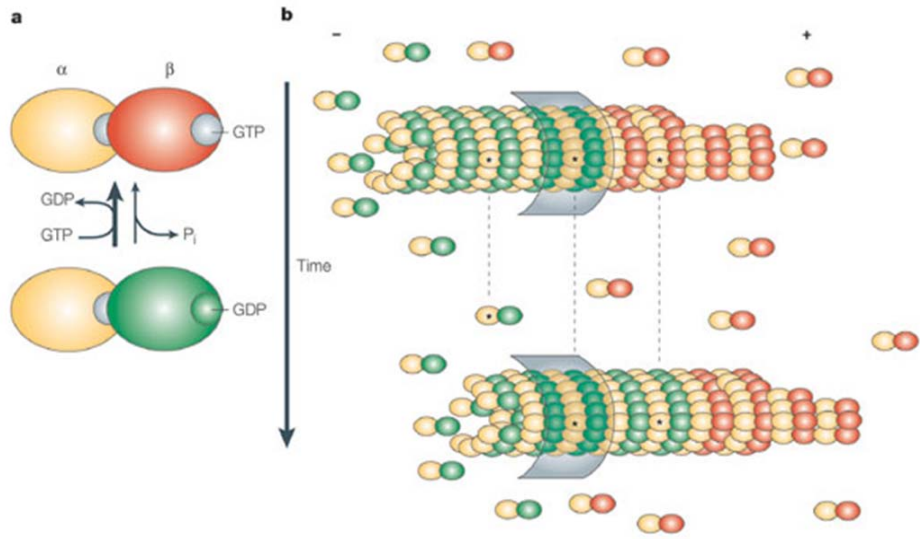
**Şekil 2.2.3** A. Böbrek epitel hücrelerinde interfaz mikrotübülleri ve mitotik mikrotübüller B. Mitotik mikrotübüllerin ayrıntılı olarak şematize edilmesi [50,51]

Bütün ökaryotik organizmalarda mikrotübüller  $\alpha$  ve  $\beta$ -tubulin polimerlerinden oluşur.  $\gamma$ -tubulin ise mikrotübül oluşturan merkezlerde bulunur. G1, S, G2 ve M evreleri belirgin olduğundan hücre döngüsü çalışmaları için ideal olan, tek hücreli ökaryotik mikroorganizma *Schizosaccharomyces pombe*'de ise, 4 tubulin geni; iki  $\alpha$  ( $nda2^+$ ,  $atb2^+$ ), bir  $\beta$  ( $nda3^+$ ) ve bir  $\gamma$  ( $gtb1^+ / tug1^+$ ) vardır [52]. Genetik açıdan manüplasyonu kolay olan *Schizosaccharomyces pombe*'de tubulin genlerinin yeşil floresan proteini (GFP) ile füzyonu sayesinde, mikrotübül hareketleri hücre döngüsünün ilerleyişi ile eş zamanlı olarak gözlenebilir (Şekil 2.2.4) [53, 54].



**Şekil 2.2.4** *Schizosaccharomyces pombe*'de hücre döngüsünün farklı evrelerinde mikrotübüllerin durumu.(İnterfaz mikrotübülleri yeşil, mitotik mikrotübüller kırmızı, kromatin mavi, mikrotübül oluşturan merkezler siyah ile gösterilmiştir) [52].

Mikrotübül yapısının temel bileşeni olan tubulinin başarılı bir şekilde izolasyonundan sonra, magnezyumun tubulin polimerizasyonunda önemli rolü olduğu anlaşılmıştır [11, 55]. *In vitro* koşullarda, yeterli konsantrasyonda tubulin dimeri,  $Mg^{2+}$ , GTP varlığında ve  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de mikrotübül polimerizasyonunun gerçekleştiği gösterilmiş olup, mikrotübüllerin soğuğa ve yüksek hidrostatik basınca karşı duyarlı olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte  $Mg^{2+}$ 'nın, Mg-GTP kompleksi şeklinde tubulinin nükleotid yerleşim bölgesine bağlanarak, polimerizasyonu tek başına GTP'nin yaptığından daha hızlı teşvik ettiği, GDP ile böyle bir etkinin oluşmadığı gösterilmiştir (Şekil 2.2.5) [56, 57, 58].



**Şekil 2.2.5** Mikrotübül polimerizasyonu ve depolimerizasyonu [119]

Magnezyum, GTP varlığında belli bir düzeye kadar mikrotübül polimerizasyonunu teşvik etmektedir, ancak yapılan bir çalışmada  $Mg^{2+}$ 'nin mikrotübül depolimerizasyonundan da sorumlu olabileceği öne sürülmüştür. İlgili çalışmada, hücre döngüsü süresince hücre içi  $Mg^{2+}$  konsantrasyonunun düştüğü, düşen  $Mg^{2+}$  konsantrasyonunun mikrotübül polimerizasyonunu sağladığı, anafaz aşamasında kromozomların ayrılması gerçekleştiğinden sonra, hücreye  $Mg^{2+}$  girişi olduğu ve mitotik mikrotübüllerin depolimerize olarak hücre bölünmesinin gerçekleştiği belirtilmiştir [6]. Çalışmada hipotez; divalent katyon iyonoforu A23187 ile  $Ca^{2+}$  içermeyen ortamda, hücre bölünmesinin sonuna doğru sinyal alınmasıyla test edilmiş ve mevcut sinyalin  $Mg^{2+}$  ye ait olabileceği düşünülmüştür. Ancak çalışmada, deneyin yapıldığı *Schizosaccharomyces pombe*'de  $Mg^{2+}$  transport sisteminin ve Mg-tubulin ilişkisinin aydınlatılması gerektiği vurgulanmıştır. Bununla birlikte A23187 iyonoforu  $Mn^{2+}$  ye,  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  den daha fazla özgünlük göstermektedir [59]. Ayrıca,  $Ca^{2+}$ 'nin mikrotübül polimerizasyonunu engellediği gösterilmiş olup [60], Mg/Ca oranının mikrotübül polimerizasyonunda etkili olabileceği düşünülmüştür [61]. Daha sonra PtK2 (rat kanguru böbrek epitel hücre hattı) ile yapılan bir çalışmada, hücre içi  $Mg^{2+}$  konsantrasyonu 1mM olduğunda, interfaz mikrotübüllerinin geri dönüşümlü olarak depolimerize olduğu ve  $Ca^{2+}$  ile de aynı etkinin olduğu gösterilmiştir [12]. Yine aynı çalışmada, hücre bölünmesi öncesinde  $Mg^{2+}$ 'nin mitotik mikrotübüllerin depolimerizasyonunda nasıl bir etkisi olabileceğine yönelik 3 hipotez önerilmiştir [12];

1.  $Mg^{2+}$ , hücre iskeletinin organizasyonu ve regülasyonu ile ilgili protein kinaz ya da fosfataz gibi birkaç ya da daha fazla enzimi aktive etmektedir.
2.  $Mg^{2+}$  bağımlı nükleotidaz aktivitesi değişmektedir.
3.  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ 'nin hücre içi  $Ca^{2+}$  depolarından (endoplazmik retikulum gibi) salınmasını teşvik etmektedir.

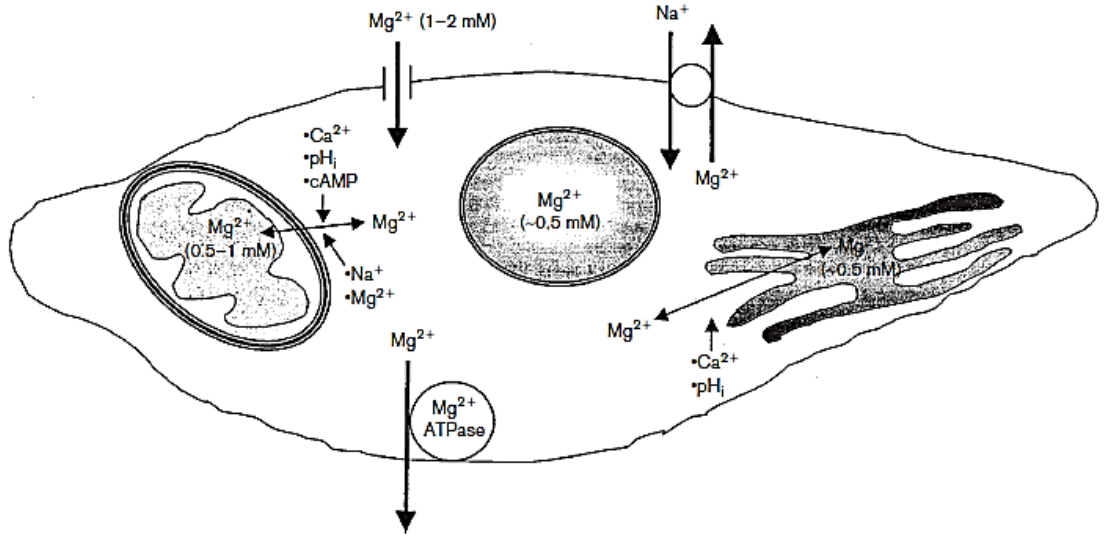
Kalsiyumun mitoz sırasında, özellikle de metafaz/anafaz evrelerinde, hücre içi konsantrasyonundaki değişimler incelenmiştir. Memeli fibroblastları ve epitel hücreleriyle yapılan çalışmada,  $Ca^{2+}$  girişlerinin metafaz evresinden anafaz evresine geçişi sağlayan özgün bir durum olmadığı,  $Ca^{2+}$  girişlerinin metafaz/anafaz evrelerinde sürekli tekrarlandığı gösterilmiştir. Bununla birlikte anafaz evresinin  $Ca^{2+}$  tarafından

düzenlendiği ve aralıksız olarak artan  $Ca^{+2}$ 'nin, mitotik mikrotübüllerin kararlılığını sağlamada önemli olabileceği öne sürülmüştür [62].

### 2.3. HÜCRESEL MAGNEZYUM TRANSPORTU VE HOMEOSTASİSİ

Kofaktör olarak birçok enzimatik reaksiyonda yer alan  $Mg^{2+}$ , nükleik asitlerin ve biyomembranların yapısal olarak kararlılığının sağlanması için önemlidir.  $Mg^{2+}$  aynı zamanda, iyon transportunda görev alan pompaları, taşıyıcı molekülleri ve kanalları kullanarak, sinyal iletimini ve hücre içi kalsiyum ve potasyum konsantrasyonlarını düzenler [63, 64, 65]. Bunu yaparken  $Mg^{2+}$ , hücre için çok önemli iki pompada aktif olarak rol oynar. Bunlardan ilki ' Na-K ATPaz ' pompasıdır. Bu pompa, konsantrasyon gradiyentine karşı Na' yı hücre dışına atarken K' yı hücre içine alır. Pompanın çalışması için enerji yani ATP gerekir. ATP, ancak ortamda  $Mg^{2+}$  iyonu varlığında hidrolize uğrayarak pompa için gerekli enerjiyi sağlar.  $Mg^{2+}$ 'nin görev aldığı diğer pompa ' Ca-ATPaz ' pompasıdır. Bu pompa da hücre içi Ca' yı, konsantrasyon gradiyentine karşı hücre dışına atarken enerji kullanır ve enerji kaynağı olan ATP yine  $Mg^{2+}$  varlığında hidrolize olabilir [66].

Hücre içi serbest  $Mg^{2+}$  konsantrasyonu 0.3-1.2 mM olup, uyarılabilen hücrelerde (sinir ve kas hücreleri gibi) ise daha yüksek düzeyde olabilmektedir. Gerek iyon kanalları gerekse de taşıyıcı proteinler aracılığıyla, hücre içine  $Mg^{2+}$ 'nin alınmasında, negatif iç membran potansiyeli, itici güç oluşturmaktadır. Bununla birlikte her hücre tipi,  $Mg^{2+}$ 'nin hücre içine alınmasında ve hücre dışına atılmasında farklı mekanizmalara sahiptir [67]. Bazı hücre modellerinde,  $Mg^{2+}$ 'nin hücre içine alınmasının,  $Mg^{2+}/Cl^-$  ya da  $Mg^{2+}/HCO_3^-$  kotransportu ile olduğu gösterilmiştir [68,69].



Şekil 2.3.1 Hücre içi Mg<sup>2+</sup> nin regülasyonunda olası mekanizmalar [70]

Hücre içi Mg<sup>2+</sup> konsantrasyonu, plazma membranından ve organellerden Mg<sup>2+</sup> nin transportuyla ve Mg<sup>2+</sup> nin hücre içindeki yapılara bağlanmasıyla düzenlenir. Mg<sup>2+</sup> nin hücre içi yapılardan (mitokondri, endoplazmik/sarkoplazmik retikulum, nukleus) hareketini düzenleyen faktörler Ca<sup>2+</sup>, pH, cAMP, Na<sup>+</sup> ve Mg<sup>2+</sup> 'dir (Şekil 2.3.1) [70]. Mg<sup>2+</sup> nin hücre içine giriş ve çıkışında, hücre içi cAMP etkili olmaktadır. Hücre içi cAMP miktarı arttıkça Mg<sup>2+</sup> hücre dışına çıkarken, cAMP miktarı azaldıkça hücre içine Mg<sup>2+</sup> girişi olur [1].

Mikroorganizmalarda ve memelilerde Mg<sup>2+</sup> transportunun hangi mekanizmalarla gerçekleştiğine yönelik birçok araştırma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda yapısı en çok aydınlatılmış olan, plazma membranındaki Mg<sup>2+</sup> kanal proteini bakterilerdeki CorA'dır. CorA; Mg<sup>2+</sup> ve Co<sup>2+</sup> ve Ni<sup>2+</sup> nin transportundan sorumlu olup, Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> ya da Fe<sup>3+</sup> 'in transportundan sorumlu değildir [71, 72]. CorA'nın ökaryotlardaki homoloğu olan Mrs2 ise, mitokondri iç membranında yer alan kanal proteindir [73, 74]. Bakterilerde Mg<sup>2+</sup> transportundan sorumlu diğer kanal protein olan MgtE ise; Mg<sup>2+</sup> ve Co<sup>2+</sup> transportundan sorumlu olup, Ni<sup>2+</sup> transportundan sorumlu değildir ve Ni<sup>2+</sup>, MgtE kanal proteininin çalışmasını inhibe eder (75, 76) (Tablo 2.3.1).

**Tablo 2.3.1** Prokaryotik ve ökaryotik  $Mg^{2+}$  transport proteinleri (Koyu renkle belirtilenler prokaryotik, diğerleri ökaryotik organizmalarda bulunmaktadır) [77].

Aile	Belirlenen Üyeler	Transportör Tipi
<b>CorA</b>	<b>CorA</b> , ALR1/ALR2, Mrs2/AtMrs2, Lpe10	<b>Kanal</b>
<b>MgtE</b>	<b>MgtE</b> , SLC41A1, SLC41A2	<b>Kanal, Taşıyıcı</b>
TRPM	TRPM6 TRPM7 (LTRPC7, TRP-PLIK)	Kanal/Kinaz
Claudins	Claudin-16 (Paracellin-1) Claudin-19	Claudin
ACDP	ACDP2 (CNNM2)	Putatif Kanal
MagT1	MagT1	Putatif Kanal
<b>Mgt</b>	<b>MgtA, MgtB</b>	<b>P-tipi ATPaz</b>
NIPA1	NIPA1(SPG6)	Putatif Kanal
MMgT	MMgT1, MMgT2	Putatif Kanal

Ökaryotik organizmalardan mayalarda, diğer metallerle kıyasla  $Mg^{2+}$  transportu hakkında bilinenler çok azdır. Bir maya türü olan *Saccharomyces cerevisiae*'de, plazma membranındaki  $Mg^{2+}$  transportundan sorumlu, bakteriyel *CorA* ile homoloji gösteren *ALR1* ve *ALR2* adlı iki gen tanımlanmıştır [3]. Yapılan çalışmada, bu iki genin aşırı anlatım yapmasıyla  $Al^{3+}$  ve  $Ga^{3+}$  iyonlarına karşı direnç oluştuğu, buna karşın  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ve  $La^{3+}$  iyonlarına duyarlılık oluştuğu gösterilmiştir. Ayrıca  $Al^{3+}$ 'nin,  $Mg^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  transportunu inhibe ettiği ve  $Al^{3+}$  toksisitesinin,  $Mg^{2+}$  tarafından giderildiği belirtilmiştir. *S.cerevisiae*'de mitokondri membranında  $Mg^{2+}$  transportundan sorumlu, yine bakteriyel *CorA* ile homoloji gösteren *MRS2* ve *LPE10* genleri tanımlanmıştır [74, 78]. Bununla birlikte, *MRS2*'nin mitokondrideki grupII intronlarının kırılması için gerekli olduğu, *MRS2* geninde delesyon yapıldığında, maya hücrelerinde  $pet^-$  fenotipi oluştuğu gösterilmiştir [74]. *Saccharomyces cerevisiae*'ye kıyasla, bazı genler açısından memelilerle daha çok homoloji gösteren diğer bir maya türü olan *Schizosaccharomyces pombe*'de ise *ALR1* ve *ALR2* genlerinin homoloğu olarak *SPAC17A2.14* ve *SPBC27B12.12c* (tahmini) genleri tanımlanmıştır. Mitokondri membranında ise,  $Mg^{2+}$  transportundan sorumlu *CorA* ile homoloji gösteren *MRS2* kanal proteini bulunmaktadır [113].

$Mg^{2+}$  nin hücre dışına atılması elektrokimyasal gradiente karşı olduğundan,  $Mg^{2+}$  nin hücre dışına atılmasının, sekonder aktif transport aracılığıyla gerçekleştiği ve  $Na^+$  (memelilerde),  $H^+$  (mikroorganizmalarda) gradientinin itici güç oluşturduğu düşünülmüştür [67]. Bu mekanizmanın, memeli hücrelerinde daha çok  $Na^+/Mg^{2+}$  antiportu ile olduğu, bununla birlikte  $Na^+/Ca^{2+}$  [80] ya da  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  [80] antiportu ile de olabildiği gösterilmiştir.

Magnezyum; diğer iyonların transportu, sinyal iletimi, enzim aktiviteleri, enerji metabolizması, nükleik asit ve protein sentezi ve biyolojik membranların korunması gibi birçok önemli hücreyel olayda rol oynadığı için, hücre içi  $Mg^{2+}$  homeostasisinin bozulması tıbbi açıdan birçok hastalığın oluşmasına neden olur.  $Mg^{2+}$  eksikliği (hipomagnezemi),  $Mg^{2+}$  fazlalığı (hipermagnezemi) göre daha sıklıkla görülür. Klinik olarak görülen hipomagnezemi, gastrointestinal sistemden veya böbrekten Mg kaybına bağlı olarak ortaya çıkar. Normal beslenenlerde,  $Mg^{2+}$  eksikliği hemen hemen hiç görülmez [81]. İskemik kalp hastalığı, konjestif kalp yetmezliği, ani ölüm, kardiyak aritmiler, diyabetin komplikasyonları, preeklampsi/eklampsi ve hipertansiyon gibi birçok hastalığın patogeneğinde de  $Mg^{2+}$  eksikliğinin rol oynadığı düşünülmektedir [82].  $Mg^{2+}$  fazlalığı (hipermagnezemi), düşük kas tonusu ile kendini gösterir ve böbrek yetmezliğine bağlı olarak ortaya çıkan hiperkalsemi olmaksızın nadiren görülür. Hipermagnezemi'deki bulgular hipotansiyon, miksiyon güçlüğü, depresyon ve komadır. [83].

#### 2.4. MAGNEZYUMUN ÖLÇÜLMESİ

Çeşitli koşullarda magnezyumun serbest (iyonik) ya da bağlı formlarının ölçülmesinde mevcut teknolojinin sınırlı olması, biyolojik sistemlerdeki öneminin anlaşılmasını güçleştirmektedir. Total magnezyum (serbest-bağlı form) ölçümünde kullanılan metot 'Atomik Absorpsiyon Spektrofotometrisi (AAS)'dir [84, 85]. Ancak bu yöntemin de fazla miktarda örnek gerektirmesi ve ölçüm için gerekli işlemler sırasında kontaminasyon riski taşınması gibi olumsuz yönleri vardır [86]. AAS dışında, klinik laboratuvarlarda serumda bulunan total magnezyumun ölçülmesinde kolorimetrik yöntemler (calmagit, metilthymol blue, formazon boyası, magon gibi) kullanılmaktadır [87, 88]. Hücre içi serbest formda bulunan  $Mg^{2+}$ 'nin ölçümünde ise; floresan prob,



nükleer manyetik rezonans (NMR), iyon selektif mikroeletrod ve metallokromik indikatör yöntemleri gibi birçok yöntem vardır [89]. Ancak bu yöntemlerin bazı olumsuz yanları vardır. Örneğin metallokromik indikatör yönteminde hücre içi kalsiyum, sodyum ve pH,  $Mg^{2+}$ 'nin ölçümünü etkilemektedir [90].

$^{31}P$  NMR spektroskopisi yönteminde, ATP ve ATP'nin  $Mg^{2+}$  ile yaptığı komplekslerin spektrum farkından yararlanarak serbest magnezyum ölçümü yapılmaktadır. Enstrüman gücü aşıldığı takdirde bilinen en özgün serbest magnezyum ölçüm yöntemidir [91].

"Induction Coupled Plasma Mass Spectrometry- (ICP-MS)" yönteminde, magnezyumun izotoplarından yararlanır. Magnezyumun bilinen üç izotopu;  $^{24}Mg$  (%78.7),  $^{25}Mg$  (%10.1),  $^{26}Mg$  (%11.2)'dir. Bu izotoplardan yararlanılarak ICP-MS yöntemiyle membrandan içeriye ve dışarıya  $Mg^{2+}$  hareketi belirlenebilmektedir. Örneğin doğal formdaki  $Mg^{2+}$  ortamında bulunan hücreler, mevcut 3 izotoptan birinin bulunduğu ortama alınıp, ortamdaki magnezyum izotoplarının oranındaki değişim zamana bağlı olarak ölçülerek membrandan geçen serbest magnezyum miktarı belirlenir [92].

Magnezyuma özgü mikroeletrod yönteminde, plazmadan ya da tek bir hücreden doğrudan  $Mg^{2+}$  ölçümü gerçekleştirilir. Magnezyuma özgü mikroeletrodların bilinenleri; ETH5214, ETH7025, AVL988/4 analizörü gibidir. Bu yöntemin de, ölçümün hücre içi  $Ca^{2+}$  ve  $K^+$  gibi diğer iyonlardan etkilenmesi ve küçük hücrelerde ölçüm yapılamaması gibi olumsuz yanları vardır [93, 94].

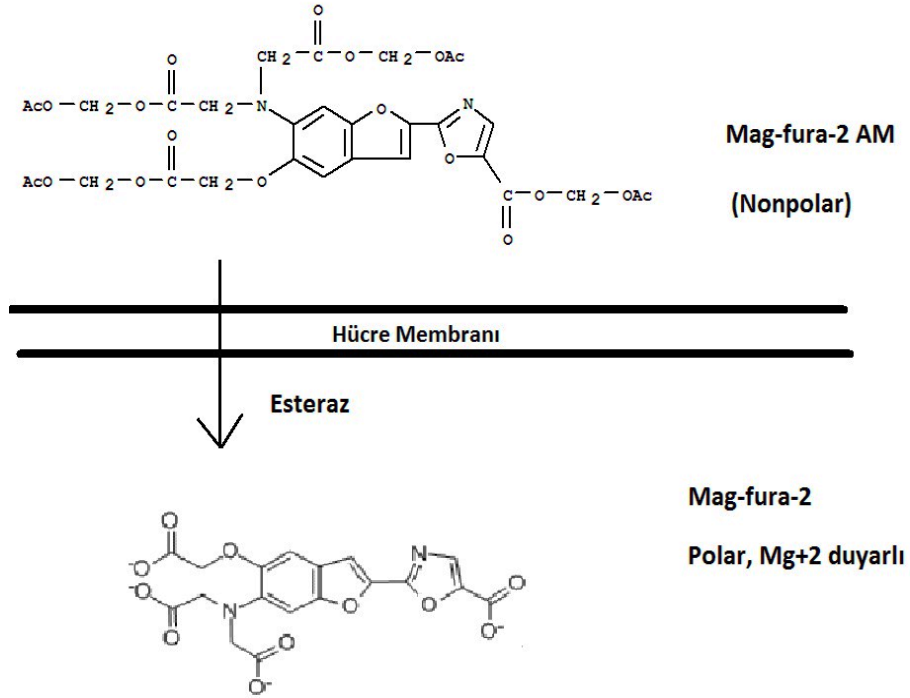
Serbest magnezyum, özgün floresan problemler aracılığıyla spektrofotometrik yöntemle de belirlenebilmektedir.  $Mg^{2+}$ 'ye özgün mevcut floresan problemler, daha önceleri  $Ca^{2+}$  için tasarlanan mag-fura, mag-fluo, mag-indo problemlerinin türevleridir [95, 96]. Floresan problemler aracılığıyla hücre içi serbest magnezyumun belirlenmesinde, hücre döngüsü sırasında poliaminlerin konsantrasyonunda meydana gelen değişimler, ölçümün duyarlılığını oldukça etkilemektedir [97]. Bu nedenle, hücre içi magnezyumun daha doğru bir biçimde belirlenebilmesi için özgün problemlere ihtiyaç vardır ve  $Mg^{2+}$ 'ye özgün floresan problemlerin tasarımına yönelik çalışmalar devam etmektedir.

### 2.4.1. Magnezyuma Özgün Floresan Problar

Magnezyuma özgü floresan problar (Tablo 2.4.1) ; polar (yükü) ve nonpolar (yüksüz) olmak üzere iki formda bulunur. Buna göre, probların hücreye yüklenmesi invazif ve noninvazif olmak üzere iki şekilde olur.

1. İnvazif Olarak (Mikroenjeksiyon yöntemi ile yüklem): hücre membranından geçemeyen polar problar için,
2. Noninvazif Olarak (Kütlesel yüklem): hücre membranından geçebilen nonpolar problar için tercih edilir.

Noninvazif yöntemde, karboksilat grupları, asetoksimetil esterleri olarak türevlenmiş gruplar içeren nonpolar prob, hücre membranından geçer. Hücre içerisinde hücrel esterazlar tarafından hidroliz edilen probun, yükü grupları açığa çıkar ve iyonize  $Mg^{2+}$  ye bağlanır (Şekil 2.4.1).

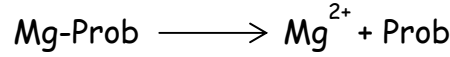


Şekil 2.4.1 Nonpolar mag-fura-2 AM'nin, hücrel esteraz aracılığıyla, hücre içinde  $Mg^{2+}$  ye duyarlı olan polar gruplarının ortaya çıkışı

**Tablo 2.4.1** Magnezyuma özgü floresan probların kimyasal ve spektroskopik özellikleri [104]

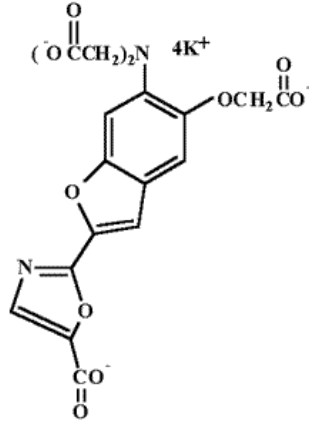
Floresan prob	MW*		Magnezyum (-)			Yüksek Magnezyum Konsantrasyonu			K <sub>d</sub> (Mg <sup>2+</sup> ) (mM)	K <sub>d</sub> (Ca <sup>2+</sup> ) (μM)
	Salt	AM	λ <sub>A</sub> † (nm)	ε <sub>max</sub> ‡ (cm <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	λ <sub>F</sub> § (nm)	λ <sub>A</sub> † (nm)	ε <sub>max</sub> ‡ (cm <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	λ <sub>F</sub> § (nm)		
mag-fura-2	587	723	369	22,000	511	330	24,000	491	1.9	25
mag-fura-5		737	369	23,000	505	332	25,000	482	2.3	28
mag-indo-1	595	731	349	38,000	480	330	33,000	417	2.7	35
mag-fluo-4	682	818	490	74,000	NA**	493	75,000	517	4.7	22
Magnesium Green™	916	1026	506	77,000	531	506	75,000	531	1.0	6
mag-rhod-2		845	547	68,000	NA**	549	69,000	577	ND	70
mag-X-rhod-1		949	575	82,000	NA**	578	82,000	603	10.7	45

Probun magnezyuma olan duyarlılığını belirleyen K<sub>d</sub> (Dissociation=Ayrılma) sabiti olup, bu değer ne kadar düşükse probun Mg<sup>2+</sup> ye o kadar çok afinitesi vardır.

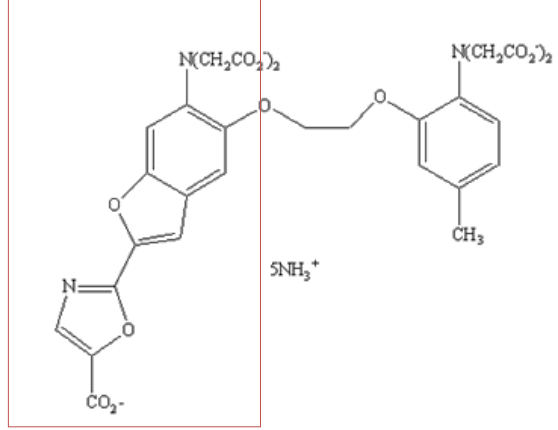


$$K_d = \frac{[\text{Mg}^{2+}][\text{Prob}]}{[\text{Mg-Prob}]}$$

Mg<sup>2+</sup> ye özgü mag-fura 2 probu yapısındaki ‘furaptra’ adı verilen kimyasal gruba Ca<sup>2+</sup> de afinite gösterir (Şekil 2.4.2). Bu nedenle Mag-fura-2, Mg<sup>2+</sup> yanı sıra Ca<sup>2+</sup> ye de bağlanma eğilimindedir. Ancak yapılan bir çalışmada, hücre dışı ortama 10 mM' ye kadar eklenen Ca<sup>2+</sup> nin, mag-fura 2 sinyalini değiştirmedeği gösterilmiştir. Bu nedenle, hücre içi Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonunun, mag-fura 2 tarafından belirlenebilecek düzeyde olmadığı belirtilmiştir [108].



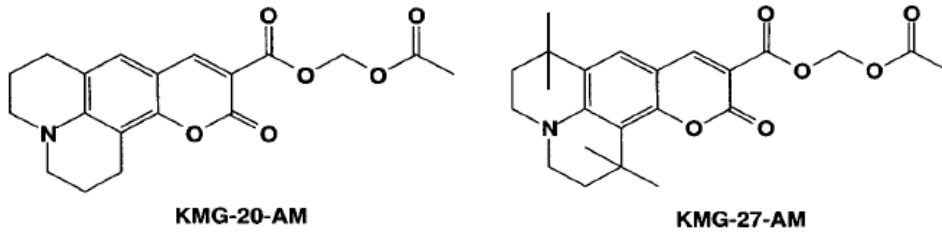
Furaptra, tetrapotasyum tuzu  
(Mag-Fura-2, tetrapotasyum tuzu)



Fura-2, pentaamonyum tuzu

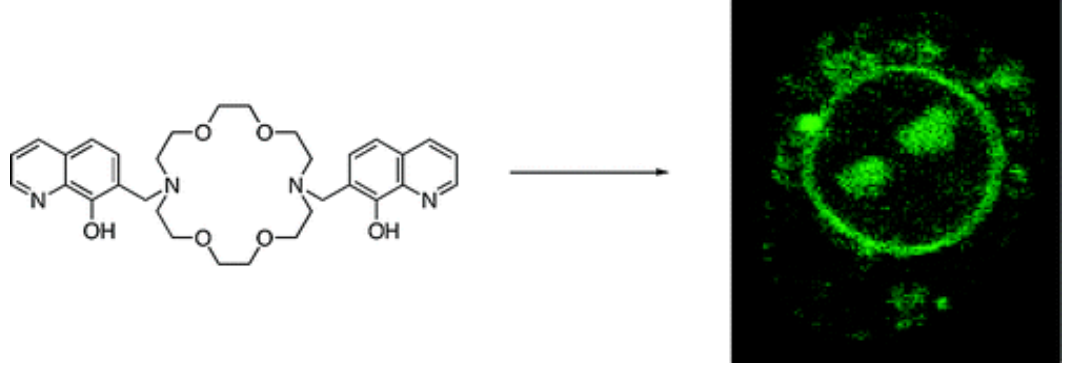
**Şekil 2.4.2.**  $Mg^{2+}$  ye özgü Mag-Fura-2 ve  $Ca^{2+}$  ye özgü Fura-2 problelerinin kimyasal yapılarının karşılaştırılması

Furaptra,  $Mg^{2+}$  ye özgü sentezlenen ilk prob olup,  $K_{Mg}$ : 1.5 mM,  $K_{Ca}$ : 53 uM'dir [98].  $Mg^{2+}$  ye daha duyarlı problelerin tasarlanması yönünde çalışmalar sürmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda sentezlenen problelerden KMG-20-AM ve KMG-27-AM benzopirran sınıfından kumarin türevi olup  $Mg^{2+}$  ye duyarlılığı  $Ca^{2+}$  ye kıyasla, ticari olarak mevcut problelerden 200 kat daha fazladır (Şekil 2.4.3) [99].



**Şekil 2.4.3.**  $Mg^{2+}$  ye özgün kumarin türevli problelerin kimyasal yapısı

Bunların dışında KMG-104  $K_d$ : 2-4 mM [100], DCHQ 1-2 (diza-18-crown-6 hydroxyquinoline) türevleri  $K_{d1}$ : 44 uM ve  $K_{d2}$ : 73 uM olup  $Mg^{2+}$  için tasarlanmış bilinen en özgün problelerdir (Şekil 2.4.4) [101].

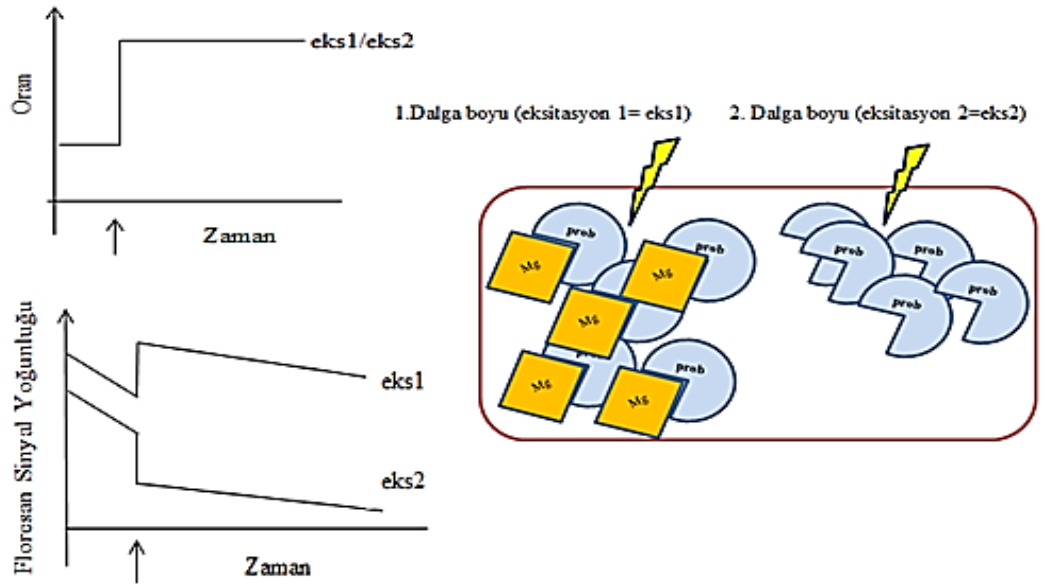


**Şekil 2.4.4.** DCHQ probunun kimyasal yapısı ve HC11 fare meme hücresinde Mg'nin prob aracılığıyla yerleşiminin gösterilmesi

Magnezyuma özgün floresan problar, dalga boyu özelliklerine göre;

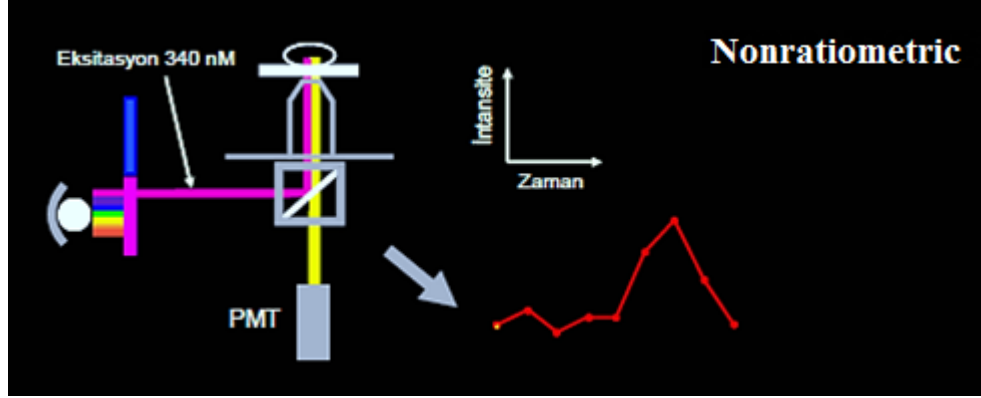
1.Nonratiometric: Tek eksitasyon dalga boyuna sahip olanlar (mag-fluo-4, Magnesium Green™, mag-rhod-2 and mag-X-rhod-1), 2.Ratiometric (Orantısal): İki eksitasyon dalga boyuna sahip olanlar (mag-fura-2 and mag-indo-1) olmak üzere iki çeşittir.

İki dalga boyuna sahip orantısal özellikte olan problarda, birinci dalga boyuna ait sinyal, probun hücre içi serbest magnezyuma bağlanmasıyla oluşan komplekse dolayısıyla serbest Mg<sup>2+</sup> ye, ikinci dalga boyuna ait sinyal ise; magnezyumla kompleks yapmayan serbest durumdaki proba aittir (Şekil 2.4.5, Şekil 2.4.6).

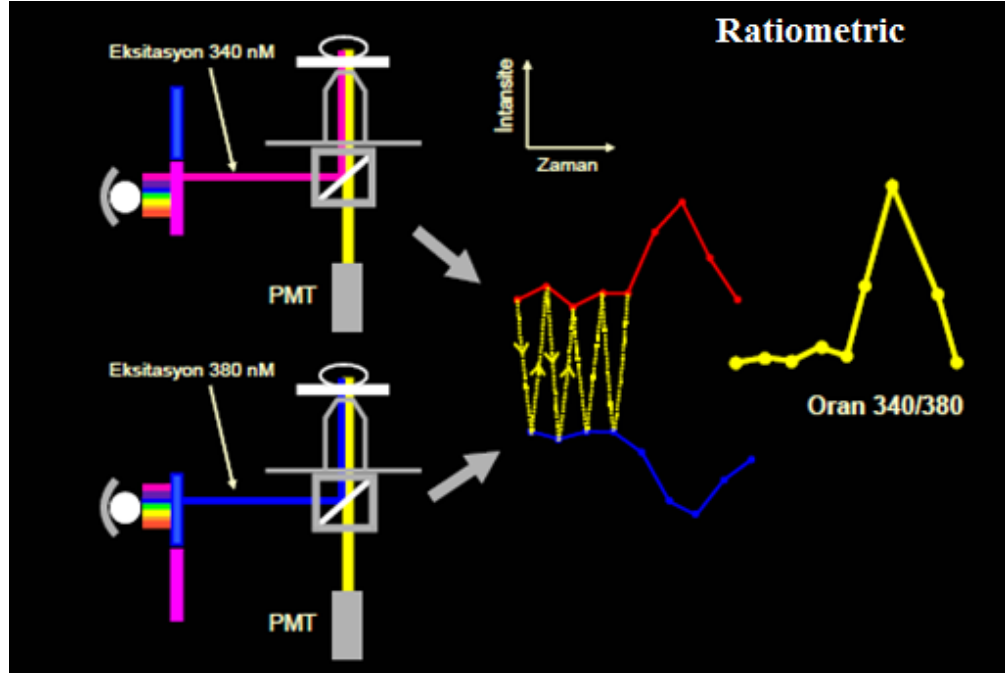


**Şekil 2.4.5** İki eksitasyon dalga boyuna sahip probun Mg<sup>2+</sup> ye bağlı ve serbest olduğu durumlarda floresan yoğunluğunun ve oranının hipotetik olarak gösterilmesi

A)



B)



Şekil 2.4.6. A) Nonratiometric prob ile ölçümü B) Ratiometric prob ile ölçümü

Nonratiometric problarda sinyal şiddeti, ölçülmek istenen iyonun konsantrasyonu kadar, boya konsantrasyonuna ve optik yola da bağlıdır. Dolayısıyla farklı hücrelerin iyon konsantrasyonu karşılaştırılmaz ve mutlak iyon konsantrasyonlarının belirlenmesi zordur [102].

### 2.4.2. Hücre İçi Serbest $Mg^{2+}$ nin Hesaplanması

Noninvazif ya da invazif yollarla hücrelere yüklenen probun, kalibrasyonu yapılarak, ortamda hiç  $Mg^{2+}$ 'nin olmadığı durumdaki minimum ve probun  $Mg^{2+}$ 'ye tamamen doyduğu maksimum floresan yoğunlukları elde edildikten sonra Grynkiewicz ve ark. tarafından [103] geliştirilen formülde sayısal değerler yerine yazılarak hücre içi serbest  $Mg^{2+}$  konsantrasyonu hesaplanır.

İki eksitasyon dalga boyuna sahip orantısal (ratiometric) problemler için;

$$[Mg^{2+}] = K_D \cdot \frac{F_O}{F_S} \cdot \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R}$$

$[Mg^{2+}]$ : Hücre içi serbest  $Mg^{2+}$  konsantrasyonu

$K_D$ : Disosiasyon Sabiti (prob/ $Mg^{2+}$  kompleksine ait)

$F_O/F_S$ :  $Mg^{2+}$ 'nin minimum olduğu ve probun  $Mg^{2+}$ 'ye tamamen doyduğu zamanlarda 2.dalgı boyundaki floresan yoğunlukları oranı

$R$ : Belirli bir zamandaki 1.eksitasyon dalga boyundaki floresan yoğunluğunun 2.eksitasyon dalga boyundaki floresan yoğunluğuna oranı

$R_{min}$ :  $Mg^{2+}$ 'nin minimum olduğu anda, 1.eksitasyon dalga boyundaki floresan yoğunluğunun 2.eksitasyon dalga boyundaki floresan yoğunluğuna oranı

$R_{max}$ : Probun  $Mg^{2+}$ 'ye tamamen doyduğu anda 1.eksitasyon dalga boyundaki floresan yoğunluğunun 2.eksitasyon dalga boyundaki floresan yoğunluğuna oranı

Tek eksitasyon dalga boyuna sahip problemler için;

$$[Mg^{2+}] = K_d \frac{(F - F_{min})}{(F_{max} - F)}$$

$[Mg^{2+}]$ : Hücre içi serbest  $Mg$  konsantrasyonu

$K_d$ : Disosiasyon Sabiti (prob/ $Mg^{2+}$  kompleksine ait)

$F$ : Belirli bir zamandaki eksitasyon dalga boyundaki floresan yoğunluğu

$F_{min}$ :  $Mg^{2+}$ 'nin minimum olduğu anda, eksitasyon dalga boyundaki floresan yoğunluğu

$F_{max}$ : Probun  $Mg^{2+}$ 'ye tamamen doyduğu anda eksitasyon dalga boyundaki floresan yoğunluğu

### 3.MALZEME VE YÖNTEM

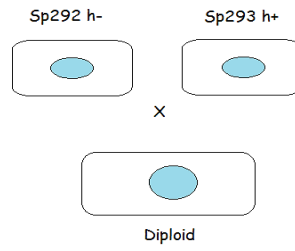
#### 3.1. KULLANILAN IRKLAR VE PLAZMİT

##### 3.1.1. Kullanılan Irklar

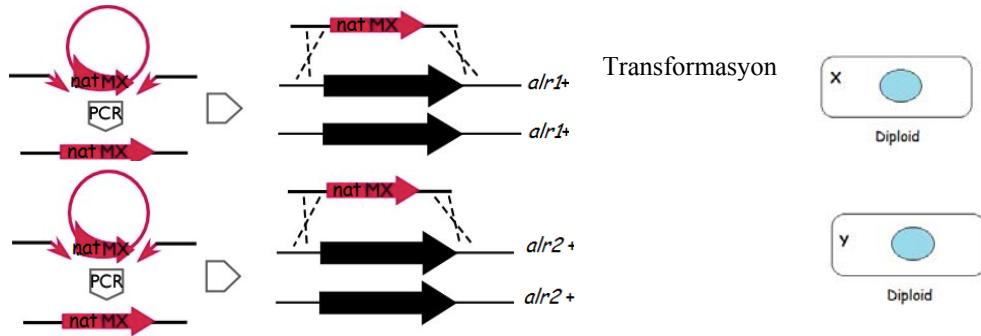
Çalışmada, İ.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonunda bulunan *Schizosaccharomyces pombe*'nin Sp292 ırkı, magnezyum transport sistemine sahip olduğundan kontrol olarak kullanılmıştır. Magnezyum transport sistemi kaldırılmış ikili mutant ırk ise; Dr. Gökhan Akman tarafından, plazma membranında bulunan, magnezyum transportundan sorumlu iki kanal proteini kodlayan, *Saccharomyces cerevisiae*'deki *ALR1* ve *ALR2* genlerinin *Schizosaccharomyces pombe*'de homoloğu olarak bilinen *SPAC17A2.14* ve *SPBC27B12.12c* genlerinin, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli delesyon yapılmasıyla elde edilmiştir. İkili mutant ırkın elde edilmesinde, haploid ırkta yapılacak delesyonun yaşarla bağdaşmayabileceği düşüncesiyle, öncelikle Sp292 ırkı ile Sp293 ırkı çaprazlanıp diploid hücreler elde edilmiştir. Daha sonra, delesyon yapılacak iki gen bölgesinin 5' ve 3' uçlarına homolog diziler içeren ve markır olarak da nourseoseothricin antibiyotik direnç genini içeren primerlerle kasetler sentezlenip, diploid ırka aktarılmıştır. Diploid haldeki transformantlardan, ayrı ayrı iki gen bakımından delesyonlu haploid ırklar elde edilip birbiriyle çaprazlandıktan sonra, tetrat diseksiyonu yapıp, rastgele sporlar alınarak farklı konsantrasyonlarda  $Mg^{2+}$  içeren YEA besiyeri ortamlarında, tetrat analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen haploid ikili mutant ırkın (Şekil 3.1.1), YEA besiyeri ortamında optimum üreyebildiği  $Mg^{2+}$  konsantrasyonu 200 mM  $Mg^{2+}$  olarak bulunmuştur.



## 1. Diploid hücrenin elde edilmesi



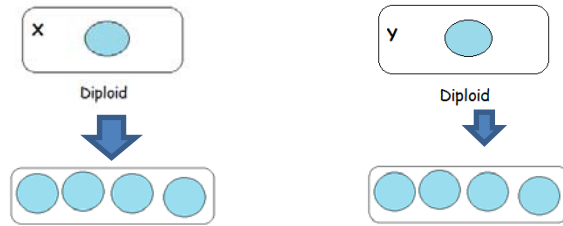
## 2. Delesyonda kullanılacak kasetlerin sentezi ve transformasyon



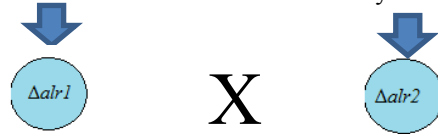
## 3. Diploid Transformantlar

Sporilasyon Ortamı

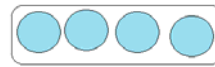
Tetradlar

4. Farklı konsantrasyonlarda  $Mg^{2+}$  içeren YEA ortamlarında tetrad diseksiyonuTek gen bakımından  
delesyonlu haploid  
ırkların elde edilmesi

Çaprazlama



## 5.

6. Rastgele olarak sporların 200 mM  $Mg^{2+}$  içeren YEA besi ortamına ekilmesiİki gen bakımından delesyonlu  
haploid ırk

Şekil 3.1.1. Plazma membranındaki  $Mg^{2+}$  transportundan sorumlu genler bakımından, PZR temelli delesyon yapılarak elde edilen ikili mutant ırkın elde edilmiş aşamaları

Çalışmada kullanılan ırklar ve plazmitler Tablo 3.1.1.'de gösterilmektedir.

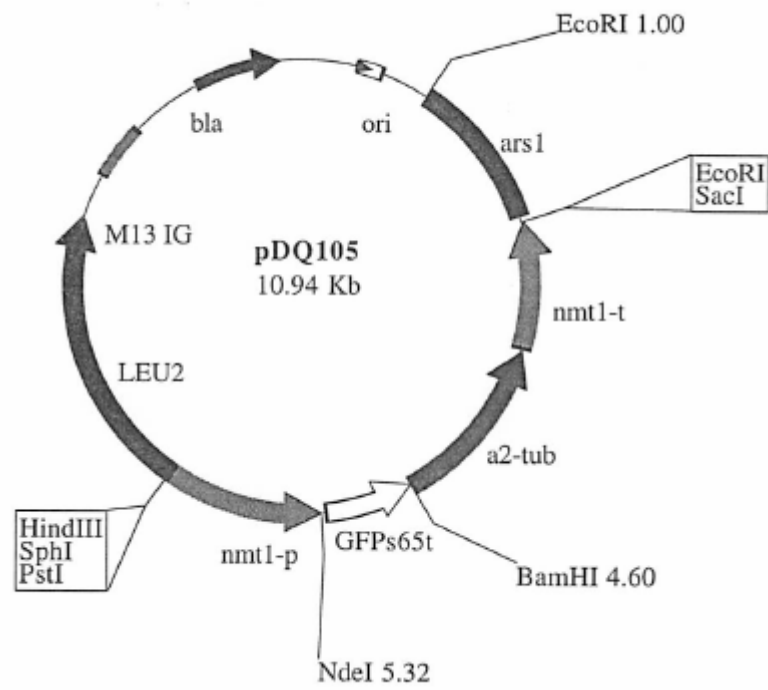
**Tablo 3.1.1** Çalışmada kullanılan ırklar ve plazmit

<b>İrklar ve Plazmit</b>	<b>Kullanım Amacı</b>
<i>Schz. pombe</i> Sp292 ( <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 h<sup>-</sup></i> )	Hem diploid ırkın elde edilmesinde kullanılmış olup, hem de çalışmamızda kontrol ırk olarak kullanılmıştır.
<i>Schz. pombe</i> Sp293 ( <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 h<sup>+</sup></i> )	Diploid ırkın elde edilmesinde kullanılmıştır.
<i>Schz. pombe</i> İkili Mutant ( $\Delta SPAC17A2.14 \Delta SPBC27B12.12$ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 kan<sup>r</sup></i> )	Bilinen iki Mg transport kanal proteinini kodlayan genler bakımından delesyonlu ırk olup Mg'nin dış ortamdan alınmadığı duruma model teşkil etmektedir.
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$	pDQ105 plazmitinin çoğaltılmasında kullanıldı.
plazmit pDQ105	GFP işaretli $\alpha 2$ -tubulin geni taşıyan plazmit, kontrol ve mutant ırkın mikrotübüllerinin floresan mikroskopunda görünür hale gelmesi amacıyla kullanıldı.

### 3.1.2. Plazmit

pDQ105 plazmidi, Dr. Da-Qiao Ding tarafından tasarlanmış olup, Japonyadaki araştırma merkezi [National Bioresource Project Yeast Genetic Resource Center Japan (YGRC/NBRP)] aracılığıyla elde edildi.

pDQ105, *Schz. pombe*'nin, tiamin ile kontrol edilen yabancı tip 'nmt1' promotörü içeren anlatım vektörü 'pREP1'den elde edilmiştir. Bu anlatım vektörüne daha sonra bir çeşit yeşil floresan proteini olan 'GFP-S65T'nin kodlama yapan bölgesi (ORF) ve *Schz. pombe*'nin  $\alpha 2$ -tubulin geninin (*NDA2-2*) kodlama yapan bölgesi, pREP1 plazmitinin nmt1 promotörünün devamı olacak şekilde klonlanıp, pDQ105 plazmiti tasarlanmıştır. pDQ105 plazmitinin genetik haritası Şekil 3.1.2' de verilmiştir.



Şekil 3.1.2 pDQ105 plazmidinin genetik haritası

### 3.2. BESİ ORTAMLARI

Çalışmada, organizmaların üretilmesinde ve transformasyon sonrası transformantların seçilmesinde kullanılan besi ortamlarının içerikleri Tablo.3.2.1, Tablo.3.2.2 ve Tablo 3.2.3' te verilmiştir.

**Tablo 3.2.1** *Schz. pombe*'nin üretiminde kullanılan besi ortamları (Stok A2, 3a ve 3b'nin içerikleri Tablo.3.2.2'de verilmiştir.)

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
**Minimal sıvı besi ortamı (MML)	Stok A <sub>2</sub> 100 ml/l Stok 3a 1 ml/l Stok 3b 1 ml/l Glukoz 10 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O 1 g/l
**Minimal katı besi ortamı (MMA)	MML besi ortamına agar eklendi 20 g/l

\* İkili mutantın katı ve sıvı besiyerinde üreyebildiği optimum Mg<sup>2+</sup> konsantrasyonları belirlendikten sonra, YEL için final konsantrasyonu 75 mM MgCl<sub>2</sub>, YEA için 200 mM MgCl<sub>2</sub> olacak şekilde, 2.5 M olarak hazırlanan stok MgCl<sub>2</sub> çözeltilisinden eklendi.

\*Ağır metal içeren YEA besi ortamı için, NiSO<sub>4</sub> (1M), ZnCl<sub>2</sub> (1M), CoCl<sub>2</sub> (1M), CdCl<sub>2</sub> (0.1M), CuSO<sub>4</sub> (1M), AlCl<sub>3</sub> (1M) stok çözeltileri hazırlandı ve belirli konsantrasyonlarda eklendi.

\*\* *LEU2* markırı içeren pDQ105 plazmitini alan, transformant kontrol ırkın seçimi için, seçici MML ve MMA ortamlarına final konsantrasyonu 225 mg/l olacak şekilde adenin ve urasil aminoasitleri eklendi. Transformant olan ikili mutant hücrelerin seçiminde ise; kontrol ırkın seçici ortamından farklı olarak MMA için 200 mM MgCl<sub>2</sub>, MML için 75 mM MgCl<sub>2</sub> ilave edildi. Adenin (5 mg/ml) ve urasil için (3.75 mg/ml) belirlenen konsantrasyonlarda stoklar hazırlandı.

**Tablo 3.2.2** MML ve MMA besi ortamında kullanılan stok çözeltiler

Stok adı	İçerik
A1	H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub> 5.4 mg/l
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O 0.4 mg/l
	KCl 1 mg/l
	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O 2 mg/l
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O 5.3 mg/l
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O 1.95 mg/l
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 4 mg/l
A <sub>2</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mg/l
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 50 mg/l
	NaCl 10 mg/l
	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 15 mg/l
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 500 mg/l
	Stok A <sub>1</sub> 0.1 ml/l
3a	Kalsiyum pantotenat 10 mg/l
	Nikotinik asit 100 mg/l
	Mezo-inositol 100 mg/l
3b	Biotin 100 mg/l
	%50 Etil Alkol 1 l

**Tablo 3.2.3** *E. coli*'nin üretiminde kullanılan besi ortamları

Besi Ortamı	İçerik
*'Luria Bertani' sıvı besi ortamı (LB)	Tryptone % 1 (w/v) Yeast Extract % 0.5 (w/v) NaCl % 1 (w/v)
*'Luria Bertani' katı besi ortamı (LBA)	LB besi ortamı Agar % 1.5 (w/v)

\* Amp<sup>r</sup> markırını taşıyan pDQ105 plazmitini alan transformant *E.coli* hücrelerinin seçimi için LB ve LBA besi ortamlarına final 100 ug/ml olacak şekilde ampisilin eklendi.

### 3.3. *Schz. pombe* IRKLARINDA ÜREME EĞRİLERİNİN ÇIKARILMASI

Üreme eğrileri çıkarılacak ırklardan Sp292 (Kontrol) YEA besi ortamında, ikili mutant ise YEA+200 mM MgCl<sub>2</sub> besi ortamında 30 °C' de 3 gece üremeye bırakıldı. Kültürdeki hücreler 5 ml steril distile su ile süspansiyon hale getirildikten sonra, ikili mutantın YEL besi ortamında üreyebildiği optimum Mg<sup>2+</sup> konsantrasyonunun bulunması amacıyla 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200 ve 250 mM MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarında, 1x10<sup>6</sup> hücre/ml olacak şekilde ekim yapılarak, 30 °C' de 180 devir/dakika hızdaki çalkalamalı etüvde üremeye bırakıldı. Aynı şekilde kontrol ırkın da hem YEL besi ortamında hem de üremesinde toksik etki oluşturabilecek Mg<sup>2+</sup> konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200 ve 250 mM MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarında, 1x10<sup>6</sup> hücre/ml olacak şekilde ekim yapılarak 30 °C' de 180 devir/dakika üremeye bırakıldı.

Kültürlerdeki hücre sayısındaki artış, belli zaman aralıklarında spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda, optik yoğunluğun (O.D.) ölçülmesiyle belirlendi. O.D= 0.5' e ~1x10<sup>7</sup> hücre/ml denk gelmesi prensibinden yararlanarak, O.D. cinsinden elde edilen değerler orantı yoluyla hücre/ml cinsine çevrildi ve üreme eğrileri elde edildi. Ayrıca hücre kültürleri, 'Cedex HiRes' hücre analiz cihazıyla 100 kat sulandırılmalar yapıp 300

µl hacimlerde, hücre sayısı, % canlılık ve hücre çapındaki değişimler bakımından da analiz edildi. Ölçümler en az üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

### 3.3.1. Generasyon Süresinin ve Generasyon Sayısının Hesaplanması

Logaritmik üreme sırasında hücrelerin kaç bölünme geçirdiğinin, yani generasyon sayısının hesaplanması için aşağıdaki formülden yararlanıldı [109].

$$\text{Generasyon Sayısı (n)} = \frac{\text{Log}N_2 - \text{Log}N_1}{\text{Log}2}$$

$N_2$  = logaritmik üreme sonundaki hücre sayısı

$N_1$  = kültürde üremenin başlangıcındaki hücre sayısı

Hücrelerin logaritmik üreme sırasında iki katına çıkmaları için gerekli süre olan generasyon süresinin ( $S_t$ ) hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı [110].

$$S_t = (T_2 - T_1) / n$$

$T_2$  = logaritmik üremenin bitiş zamanı

$T_1$  = logaritmik üremenin başlama zamanı

n = Generasyon sayısı

### 3.4. KONTROL VE İKİLİ MUTANT İRKTA BAZI METALLERİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Grubumuzun önceki çalışmasında *S. pombe* GA1 ırkının  $Ni^{2+}$  dışında  $Zn^{2+}$  ye karşı da dirençli olduğu ve bu direncin  $Mg^{2+}$  transportunu sağlayan CorA sistemine homoloji gösteren gen bölgesindeki nokta mutasyonundan kaynaklandığını dolayısıyla  $Ni^{2+}$  direncinin Mg transport sistemiyle ilgili olabileceği gösterildi [4]. Dolayısıyla çalışmada, CorA sistemine homoloji gösteren gen bölgesi delesyon yapılarak tamamen kaldırılmış, ikili mutant ırkta  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  metallere etkisi araştırıldı. Bunun için kontrol ırkın YEA' da, ikili mutant ırkın YEA+250 mM  $MgCl_2$ 'daki 3 günlük kültürleri steril distile su ile süspansiyon hale getirildikten sonra, mililitresinde  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$  ve  $1 \times 10^5$  hücre içeren sulandırılmalar yapıldı. Bu sulandırmalardan 10 ul alınarak \*Tablo 3.4.1' de gösterilen konsantrasyonlarda  $NiSO_4$ ,  $CdCl_2$ ,  $CoCl_2$  ve  $ZnCl_2$  içeren YEA besi ortamlarına, aynı ırkın seri sulandırmaları yan yana gelecek şekilde sırayla;  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$  ve  $1 \times 10^3$  hücre/ml ekim yapıldı. 4 gün  $30^\circ C$ ' de üremeye bırakıldı.

**Tablo 3.4.1** Farklı konsantrasyonlarda ağır metaller içeren besi ortamları

Besi Ortamı	Konsantrasyonlar
YEA+ $NiSO_4$ / YEA+ $NiSO_4$ +250 mM $MgCl_2$	5 mM-6 mM-7 mM
YEA+ $CdCl_2$ / YEA+ $CdCl_2$ +250 mM $MgCl_2$	150 $\mu M$ -250 $\mu M$ -500 $\mu M$
YEA+ $CoCl_2$ / YEA+ $CoCl_2$ +250 mM $MgCl_2$	1 mM-2 mM-3 mM
YEA+ $ZnSO_4$ / YEA+ $ZnCl_2$ +250 mM $MgCl_2$	4 mM-5 mM

\*İlgili metaller için araştırılacak konsantrasyonlar önceki çalışmalardan elde edilen verilere göre belirlenmiştir (Yayımlanmamış veri).



### 3.5. *E. coli*'ye PLAZMİT TRANSFORMASYONU

#### 3.5.1. *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) Hücrelerinin CaCl<sub>2</sub> Aracılığıyla Kompetent (Yeterli) Hale Getirilmesi

- Önceden 1/1 (w/w) olarak hazırlanan -70°C' deki DH5 $\alpha$  hücrelerinin gliserol stoğundan 500  $\mu$ l alınarak 5 ml LB besiyerinde 37 °C'de 180 devir/dakika hızdaki çalkalamalı etüvde gece boyu üretildi. DH5 $\alpha$  suşu Amp<sup>r</sup> markırı içermediği için, bir örnek de kontaminasyon kontrolü olarak 5 ml LB besi ortamına final konsantrasyonu 50  $\mu$ g/ml olacak şekilde ampisilin eklenerek hazırlandı.
- Gece boyu üremenin olduğu kültürden 500  $\mu$ l alarak 50 ml LB besi ortamına eklendi ve O.D.(600 nm) 0.4 olana kadar (1.5-3 saat) 37 °C'de 180 devir/dakika hızdaki çalkalamalı etüvde üretildi. O.D.(600 nm) 0.4 olunca kültür 10 dakika buzda bekletildi.
- Hücreler, 12000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek toplandı. Pellet üzerine 4 °C'deki 0.1 M CaCl<sub>2</sub>' den 10 ml eklenip ve buzda 30 dakika bekletildi.
- Hücreler tekrar 12000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek toplanıp ve pellet üzerine 2 ml 0.1 M CaCl<sub>2</sub>' den eklenerek süspanse edildi.

#### 3.5.2. Transformasyon Aşaması

- CaCl<sub>2</sub> aracılığıyla kompetent hale getirilen DH5 $\alpha$  hücre süspanسیونundan 200  $\mu$ l alınıp, pDQ105 plazmitinden 2  $\mu$ l (~1ng/ $\mu$ l olacak şekilde) eklenip, 30 dakika buzda bekletildi. Aynı işlem plazmidin eklenmediği negatif kontrole de uygulandı.
- Daha sonra 42 °C' deki su banyosunda 90 saniye bekletildi ve tekrar 2 dakika buzda bekletildi.
- Üzerine 37 °C'deki LB' den 800  $\mu$ l eklenip hafifçe karıştırıldı ve 60 dakika 37 °C' deki çalkalamalı etüvde bekletildi.
- Süre bitiminde daha önceden hazırlanan LBA ve LBA+Ampisilin içeren besi ortamlarına 100  $\mu$ l hücre süspanسیونundan eklenip, cam baget aracılığıyla yayma ekim yapıldı. 37 °C'de 1 gün bekletildi.

- Besi ortamlarından LBA, hücre canlılığını test etmekte kullanılırken, amp<sup>r</sup> markırı taşıyan plazmiti alan (transformant) hücrelerin seçimi için LBA+Ampisilin besi ortamı kullanıldı. Transformasyon için gerekli malzemeler Tablo 3.5.1.'de verilmiştir.

**Tablo 3.5.1** *E.coli*' ye Transformasyon için gereken çözelti ve besi ortamları

<b>Transformasyon İçin Gerekenler</b>
0.1 M CaCl <sub>2</sub> (4°C)
LB
LBA ve LBA+Ampisilin (100 mg/l) besi ortamları

### 3.6. *E.coli*' den PLAZMİT İZOLASYONU

İzolasyon, fermentas (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit) plazmit izolasyon kitiyle gerçekleştirildi. İzolasyonda kullanılan kit içerisindeki solüsyonların içeriği Tablo 3.6.1.'de verilmiştir.

- Ampisilin direnç geni taşıyan pDQ105 plazmitini alan, LBA+Ampisilin besi ortamından rastgele seçilen kolonilerden bir tanesi 5 ml ampisilinli LB besi ortamı içeren tüplerde 37 °C' deki çalkalamalı (180 devir/dakika) etüvde bir gece boyunca üretildi.
- Bir gece boyunca üretilen kültürden 1.5 ml alınıp mikrotüpe aktarıldı ve 7000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü.
- Pellet üzerine 250 µl solüsyon 1 (resuspension solution) eklendi ve süspansiyon hale getirildi.
- Üzerine 250 µl solüsyon 2 (lysis solution) eklenir ve alt-üst şeklinde çevrilerek viskoz ve hafifçe berrak hale gelene kadar (4-6) kere karıştırıldı.
- Süspansiyona 350 µl solüsyon 3 (neutralization solution) eklenir ve 4-6 kere alt-üst şeklinde çevrilerek karıştırıldı.

- Süspansiyon 12000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilerek, hücre parçalarının ve kromozomal DNA' nın çökmesi sağlandı.
- Üst sıvı filtreli tüplere (GeneJET™ spin column) aktarıldı. 12000 rpm' de 1 dakika süreyle santrifüj edilerek, toplama tüpünde (collection tube) biriken sıvı döküldü. Filtreli kısım tekrar tüpün üzerine kondu.
- Filtreli tüpün üzerine 500 ul solüsyon 4 (wash solution) eklenip ve 12000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüj edildi. toplama tüpündeki sıvı döküldükten sonra aynı işlem bir kere daha tekrarlandı.
- Daha sonra filtreli kısım, yeni bir mikrotüp üzerine konularak, üzerine 50 ul solüsyon 5 (elution buffer) eklenip, 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Filtredeki plazmit DNA'sının filtreden ayrılması sağlandı. Plazmit DNA' sını içeren mikrotüp daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere 4°C' de saklandı.

**Tablo 3.6.1** Plazmit izolasyonunda kullanılan kitin bileşenleri

GeneJET™ Plazmid Miniprep Kit	#K0502 50 preps	#K0503 250 preps
Resuspension Solution (Solüsyon 1)	15 ml	70 ml
Lysis Solution (Solüsyon 2)	15 ml	70 ml
Neutralization Solution* (Solüsyon 3)	20 ml	100 ml
Wash Solution (concentrated) (Solüsyon 4)	20 ml	100 ml
RNase A	0.15 ml	0.7 ml
Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5)	4 ml	30 ml
GeneJET™ Spin Columns	50	250
Collection Tubes (2 ml)	50	250

### 3.6.1. Plazmit DNA'sının Miktarı ve Saflığının Ölçülmesi

*E.coli*' den izole edilen plazmit DNA' sının miktarı ve saflığı, nanodrop spektrofotometre cihazıyla, örnekten 1 µl kullanılarak belirlendi. Plazmit DNA' sının saflık derecesi 260nm/280nm ve 260nm/230nm absorbans değerlerine göre belirlendi.

### 3.7. PLAZMİT DNA' SININ HINDIII RESTRİKSİYON ENDONUKLEAZI İLE KESİMİ

*E.coli*' den izole edilen plazmit DNA' sının, elde etmek istediğimiz plazmit DNA' sı olup olmadığını anlamak amacıyla, HindIII restriksiyon enzimi ile ana stoktaki plazmit DNA' sı ile karşılaştırmalı olarak kesim yapıldı. Reaksiyon bileşenleri tablo 3.7.'de verilmiştir.

**Tablo 3.7** HindIII enzim kesimi reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Final Hacim
ultra saf su	16 µl
10X Buffer R (10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA)	2 µl
plazmit DNA (0.5-1 µg/µl)	1 µl
HindIII (10 u/ul)	1 µl
	<hr/> Toplam Hacim= 20 µl

Tablo 3.7.'de belirtilen reaksiyon bileşenleri su, tampon, DNA ve enzim sırasıyla mikrotüpe eklendikten sonra hafifçe karıştırıldı ve 37°C' de 1 saat bekletildi. Enzim kesiminin gerçekleşip gerçekleşmediği agaroz jelde bakılarak değerlendirildi.

### 3.8. AGARUZ JEL HAZIRLANIŞI VE ELEKTROFOREZ

Ana stoktaki plazmit DNA' sı ve izolasyon sonucu elde edilen plazmit DNA' sının HindIII enzimi ile kesimi yapıldıktan sonra elektroforetik analiz için % 0.8 lik agaroz jel kullanıldı. %0.8 (w/v)' lik agaroz içeren 1X TAE tamponu, agarozun erimesi için mikrodalga fırında 2 dakika süreyle ısıtıldı. 55-60 °C' ye kadar soğutulduktan sonra 0.5 ug/ml olacak şekilde etidyum bromür (EtBr) eklendi. Jel karışımı yatay jel kasetine döküldü ve polimerizasyon için beklendi. Elektroforetik analiz için kullanılan tampon ve çözeltilerin listesi Tablo 3.8.' de verildi. 6X yükleme tamponundan 2 µl ve enzim kesimi yapılmış DNA örneklerinden 10 µl alınarak karıştırıldı ve jele uygulandı. Bununla birlikte sonuçların analizi için, 10 kb' lik Amresco DNA standardından 2 µl jele yüklendi. Elektroforez işlemi, 1XTAE tamponu içeren yatay elektroforez tankında

yaklaşık 30-45 dakika 80V akımda gerçekleştirildi. Elektroforez sonuçları, jel görüntüleme sisteminde jelin çekilen fotoğrafları üzerinde değerlendirildi.

**Tablo 3.8** Agaroz jel elektroforezinde 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 (pH 8.0) 100 ml Distile su ile hacim 1 litreye tamamlanır.
Yükleme tamponu (bromo phenol blue 10X)	Üre 4 M EDTA (pH 8.0) 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

### 3.9. pDQ105 PLAZMİNİN *Schz. pombe'* ye TRANSFORMASYONU

GFP işaretli  $\alpha 2$ -tubulin geni taşıyan pDQ105 plazmitinin hem kontrol ırka hem de ikili mutanta transformasyonunda Moreno, Klar ve Nurse (1991) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı [105]. Bu amaçla;

- kontrol ırkın YEA' da, ikili mutantın YEA+200 mM  $MgCl_2$  besi ortamlarında üretilen 3 günlük kültürlerinden öze ile, 10 ml YEL (kontrol ırk) ve YEL+75 mM  $MgCl_2$  (ikili mutant) sıvı besi ortamlarına ekim yapıldı ve bir gece üremeye bırakıldı.
- Ertesi gün bir gecelik kültürlerden 1' er ml olacak şekilde, 100 ml YEL (kontrol ırk) ve 100 ml YEL+75 mM  $MgCl_2$  (ikili mutant) sıvı besi ortamlarına eklenip,  $O.D_{(600\text{ nm})} = 0.5$  ( $\sim 1 \times 10^7$  hücre/ml) olana kadar hücreler üretildi.
- $O.D_{(600\text{ nm})} = 0.5$  olduğunda, 50 ml' lik falkon tüplerde 2000 rpm' de 3 dakika süreyle bütün hücreler santrifüjlenerek çöktürüldü.

- Hücreler 2 kere steril distile su ile, 1 kere de 1xLiAc/TE tamponu ile yıkandı. Bununla birlikte, YEL+75 mM MgCl<sub>2</sub> ortamda üretilen ikili mutanta ait hücreler ortamdaki Mg<sup>2+</sup> nin uzaklaştırılması için 1 kere 0.25 M EDTA ile yıkandı sonra distile su ve 1 kere de 1xLiAc/TE tamponu ile yıkandı (Transformasyonda kullanılan tampon ve çözeltiler Tablo 3.9.' da verildi.)
- Hücreler ~1x10<sup>9</sup> hücre/ml olacak şekilde 1 ml 1xLiAc/TE tamponunda süspansiyon edildi.
- Bu süspansiyondan 100 µl alınıp, üzerine 2 µl salmon sperm DNA (taşıyıcı DNA) ve 5 µl plazmit DNA' sı eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Ayrıca plazmit DNA' sı eklenmeyen bir örnek de negatif kontrol olarak hazırlandı.
- Karışımın üzerine 260 µl 1xPEG/LiAc/TE eklendi ve hafifçe karıştırılıp, 30 °C' de 1 saat bekletildi.
- Üzerine 43 µl DMSO eklendi ve 42 °C' deki sıcak su banyosunda 5 dakika süreyle ısı şoku uygulandı.
- Hücreler çöktürülüp (2000 rpm' de 3 dakika), 1 kere steril distile su ile yıkandı ve 250 µl steril distile suda süspansiyon edilip, süspansiyonun tamamı, \*seçici besiyeri içeren 1 petriye cam baget aracılığıyla yayma ekim yapıldı.
- 30 °C' deki etüvde 4-5 gün koloni oluşması için beklendi.

\* Transformant kontrol ve ikili mutantın seçimi için gerekli seçici besi ortamları Tablo 3.2.1' de verildi.

**Tablo 3.9** Transformasyonda kullanılan tampon ve çözeltiler

Tampon ve Çözeltiler	İçerik
10x LiAc (pH 7.5)—Ana Stok	1 M LiAc
10xTE—Ana Stok	100 mM Tris-HCl (pH 7.5) 10 mM EDTA
PEG/LiAc/TE—PEG Ana Stok	8 g PEG 4000 2 ml 10xTE 2 ml 10xLiAc 9.75 ml steril distile su
1xLiAc/TE	5 ml LiAc (ana stoktan) 5 ml TE (ana stoktan) 40 ml steril distile su
1xLiAc/TE/PEG	8 ml PEG (ana stoktan) 1 ml LiAc (ana stoktan) 1 ml TE (ana stoktan)

### 3.10. HÜCRE İÇİ SERBEST MAGNEZYUM İYONUNUN MAG-FURA 2 AM (CELL PERMEANT) FLORESAN PROBU ARACILIĞIYLA ÖLÇÜLMESİ (MAG-FURA 2 IMAGING)

Mag-fura 2 floresan probu ile, hücre içi yapılara bağlı olmayan, serbest haldeki  $Mg^{2+}$ 'nin kantitatif analizini sağlamak, aynı zamanda GFP işaretli  $\alpha 2$ -tubulinden yararlanarak mikrotübül hareketini gözlemlemek amacıyla, transformant Sp292 h<sup>-</sup> ırkı (leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 h<sup>-/+</sup> GFP-NDA2-2 LEU2) ve hücre membranındaki magnezyum transportundan sorumlu proteinleri kodlayan genler bakımından delesyonlu transformant ırk ( $\Delta$ SPAC17A2.14  $\Delta$ SPBC27B12.12c leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 kan<sup>r</sup> /+ GFP-NDA2-2 LEU2) kullanıldı.

Ölçüm daha önceden 'İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarı' nda uygun filtreler kullanılarak, spektrofotometrik olarak denendi. Ancak sayısal olarak anlamlı veriler elde edilemedi. Bu nedenle ölçüm, mag-fura 2 probu için

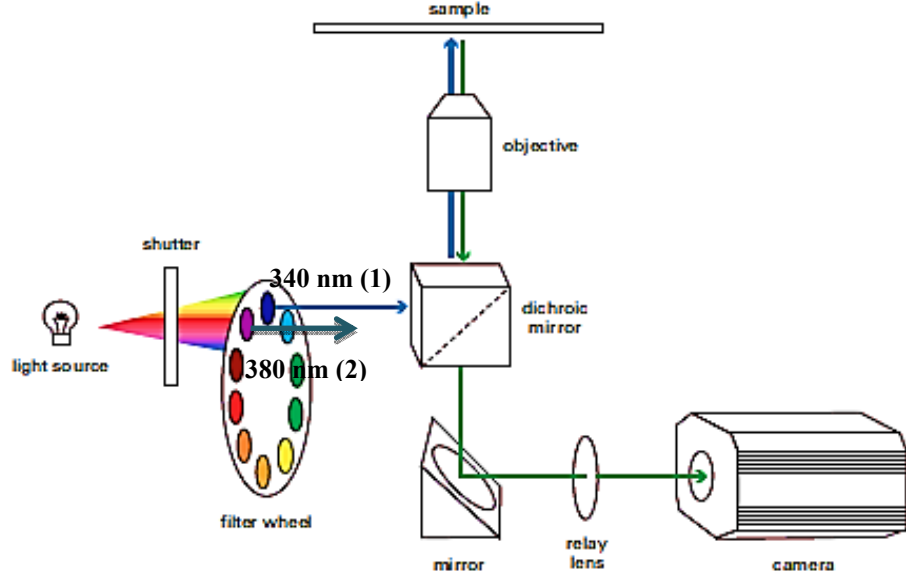
uygun floresan görüntüleme donanımına ve yazılımına sahip, 'Newcastle University Institute for Cell and Molecular Bioscience' laboratuvarında gerçekleştirildi.

Mag-fura 2' nin membrandan geçebilen AM (asetoksi metil ester) formu, konsantrasyonu 1.4 mM olacak şekilde DMSO içerisinde hazırlandı. Yükleme tamponu olarak Tris-HCl tamponu kullanıldı ve probun hücre içine girmesini, hücre içi dağılımını kolaylaştırması açısından Pluronic F-127 kullanıldı. *Schz. pombe*' de Mag-fura 2 aracılığıyla hücre içi serbest  $Mg^{2+}$ 'nin ölçümü için oluşturulan protokol, daha önceden A.Zhang ve B. M. Altura (1997) ve Elisabeth M. Forschauer ve Martin Kolisek (2004) tarafından yapılan çalışmalardan yararlanılarak oluşturuldu [107, 108]. Ölçümde kullanılan tampon, çözeltiler Tablo 3.10.1' de verildi. Bununla birlikte floresan görüntüleme (fluorescence imaging) için kullanılan sistemin özellikleri de Tablo 3.10.2' de belirtildi. Mag-fura 2 AM probunun hücreye yüklenmesi aşamasında;

- Logaritmik fazın ortasındaki hücreler,  $1.10^7$  hücre/ml olacak şekilde iki kere Tris-HCl yükleme tamponuyla yıkandıktan sonra 1ml Tris-HCl yükleme tamponunda süspanse edildi.
- Önce pluronic F-127  $15\mu M$  olacak şekilde eklenip karıştırıldıktan sonra mag-fura 2 final hacimde  $5\mu M$  olacak şekilde eklendi.
- $30C^{\circ}$ 'de çalkalamalı etüvde (180 devir/dakika) 2 saat süreyle inkübe edildi ve Tris-HCl tamponuyla iki kere yıkama yapıldıktan sonra probun hücre içi hidrolizini sağlamak amacıyla 1 saat daha  $30C^{\circ}$ 'de çalkalamalı etüvde inkübe edildi.
- Ölçüm öncesi hücrelerin kültür kabına yapışması için, konkanavalin A (Con A: 1 mg/ml ) 'den 1 ml alınarak cam kültür kabına, yüzeyi kaplayacak şekilde eklendi ve 10 dakika bekletildikten sonra, konkanavalin A kültür kabından pipet aracılığıyla uzaklaştırıldı.
- Mag-fura 2 probu ile inkübe edilen hücre süspanسیونundan 1 ml alınarak, konkanavalin A ile muamele edilmiş cam kültür kabına eklendi.
- Epifloresan mikroskobu ile 100X büyütme objektif kullanılarak 1000X büyütme oranı ile yapılan gözlemler 1-2 saat sürmüş olup, optimizasyon



sonucunda 340 nm eksitasyon filtresi için exposure süresi 200 ms ve 380 nm eksitasyon filtresi için 30 ms olarak belirlendikten sonra, 2 dakika aralıklarla veriler toplanarak ölçüm işlemi gerçekleştirildi. Orantısal görüntüleme temel prensip Şekil 3.10.1.' de gösterildi.

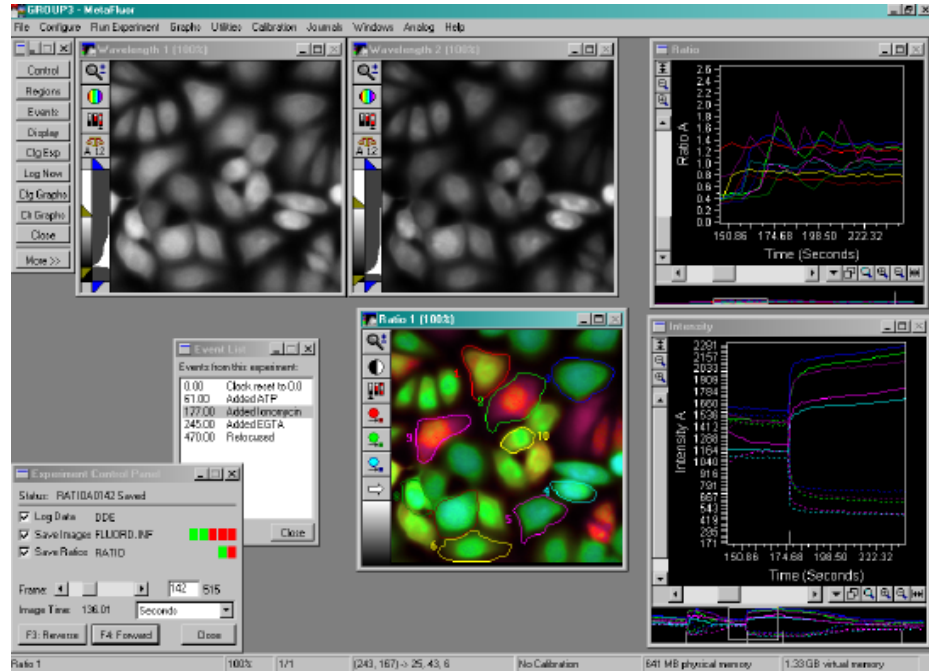


Şekil 3.10.1 Orantısal görüntüleme temel prensibi

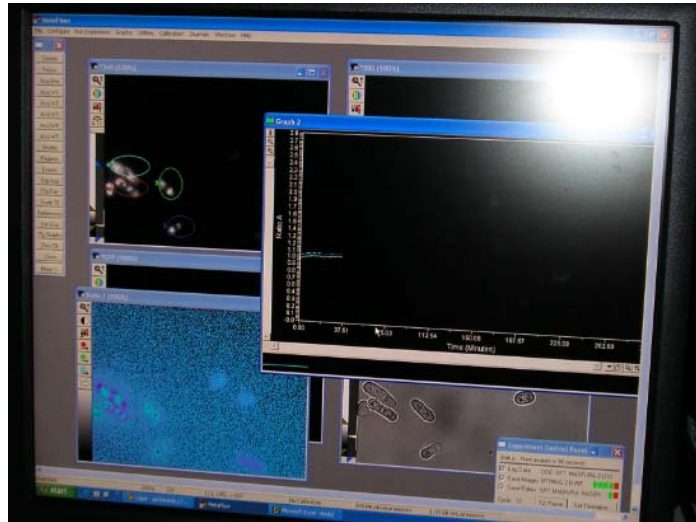
- Orantısal görüntüleme (ratio imaging), MetaFluor yazılımı ile, probun yüklenmiş olduğu hücreler seçilerek yapıldı. Probun yüklenmiş olduğu hücrelere 340 nm ve 380 nm eksitasyon filtrelerinden gelen ışığın, 509 nm emisyon filtresinde toplanmasıyla elde edilen floresan yoğunlukları ayrı ayrı ve R:340/380 oranı alınarak değerlendirildi. Bununla birlikte GFP filtresi de kullanılarak hem mag-fura probu hem de GFP işaretli mikrotübüllerden gelen sinyaller değerlendirildi. Şekil 3.10.2.' de MetaFluor yazılımı ile ölçümün nasıl yapıldığı gösterildi.
- Mag-fura 2 AM probunun optimizasyonunda,  $R_{max}$  değerini elde etmek amacıyla dış ortama sırayla 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 ve 100 mM olacak şekilde  $MgCl_2$  eklendi. Aynı şekilde  $R_{min}$  değerini elde etmek amacıyla dış ortama 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 180 mM EDTA eklendi.
- Her iki ırktan 10 hücre seçilerek elde edilen R değerleri karşılaştırılıp, istatistik olarak anlamlılık değerleri 'unpaired t test' aracılığıyla belirlendi. İstatistiksel

hesaplamalar GraphPad Software Inc. tarafından online olarak sunulan hizmetten yararlanılarak yapıldı [106].

A)



B)



Şekil 3.10.2 A). MetaFluor yazılımı kullanılarak yapılan örnek bir ölçüm B) *Sch. pombe*' de mag-fura 2 ile yapılan ölçüm

**Tablo 3.10.1** Mag-fura 2 aracılığıyla hücre içi serbest  $Mg^{2+}$  nin ölçümü için gerekli tampon, çözeltiler

Tampon, çözelti ve kimyasallar	İçerik/Konsantrasyonlar
Yükleme Tamponu (Tris-HCl tamponu)	10 mM glukoz, 135 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.6
Mag-fura 2 AM (20 × 50 µg) (50 ul DMSO içerisinde 1.4 mM ana stok hazırlandı.)	5 µM/ml (final konsantrasyon)
Pluronic F-127 ( %10: 72 mM ana stok)	15 µM/ml (final konsantrasyon)
Konkanavalin A (PBS içerisinde hazırlandı.)	1 mg/ml
EDTA	0.25 M

**Tablo 3.10.2.** Floresan görüntüleme (fluorescence imaging) için kullanılan sistemin özellikleri

Olympus 1x71 Inverted Epifluorescent Microscope
CCD camera Photometrics Coolsnap HQ
350/50x (Exciter) (Mag-fura 2 ölçümünde kullanılan filtre) 460/50m (Emitter)
470/40x (Exciter) ( GFP filtresi) 525/50m (Emitter)
MetaFluor 6.2r4 (Software)



Şekil 3.10.3 Floresan görüntüleme (fluorescence imaging) sistemi

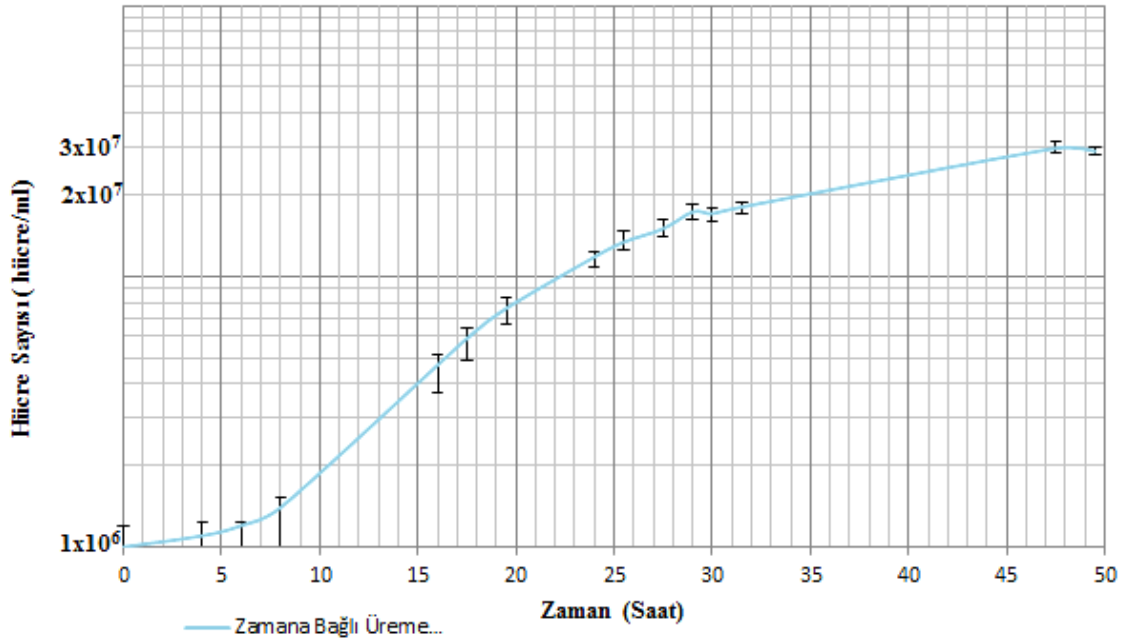
### 3.11. HOECSHT 33342 İLE GENOMİK MATERYALİN BOYANMASI

Canlı hücrelerin genomik materyalinin incelemesinde, DAPI' ye göre daha lipofilik olduğu ve dolayısıyla hücre membranından daha kolay geçtiği için Hoechst 33342 tercih edildi. DMSO içerisinde 10 mg/ml olarak hazırlanan stoktan, son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde hücre süspansiyonuna eklendi ve 30 dakika süreyle hücrelerin bulunduğu 30°C' deki çalkalamalı etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler, floresan mikroskopunda DAPI filtresi altında gözlemlendi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. KONTROL İRK (SP292) VE İKİLİ MUTANT İRKİN ÜREMELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

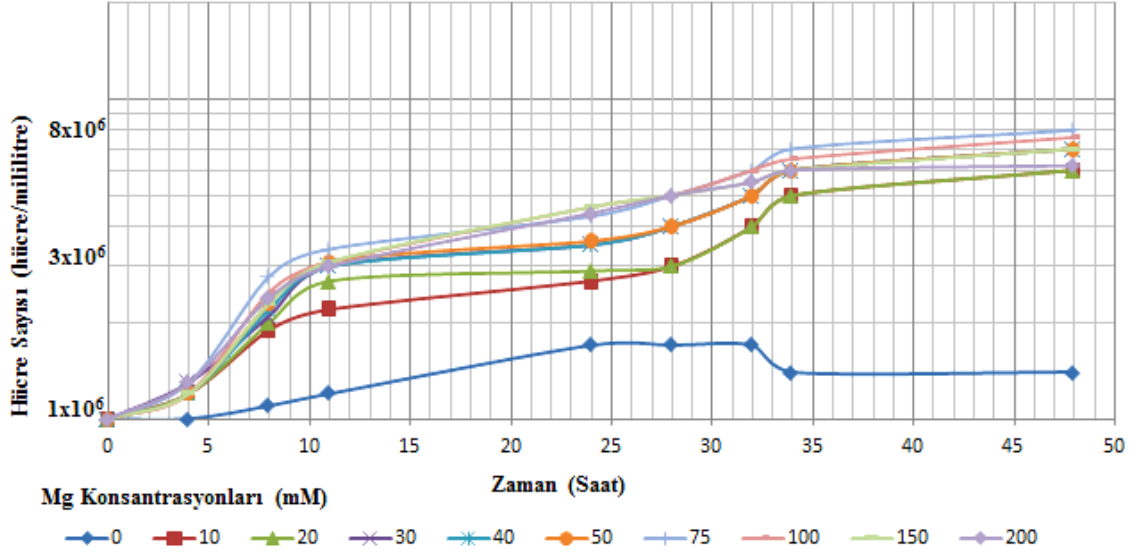
Kontrol ırkın YEL besi ortamında üremesi, belli zaman aralıklarında alınan örneklerin spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle değerlendirildi (Şekil 4.1.1).



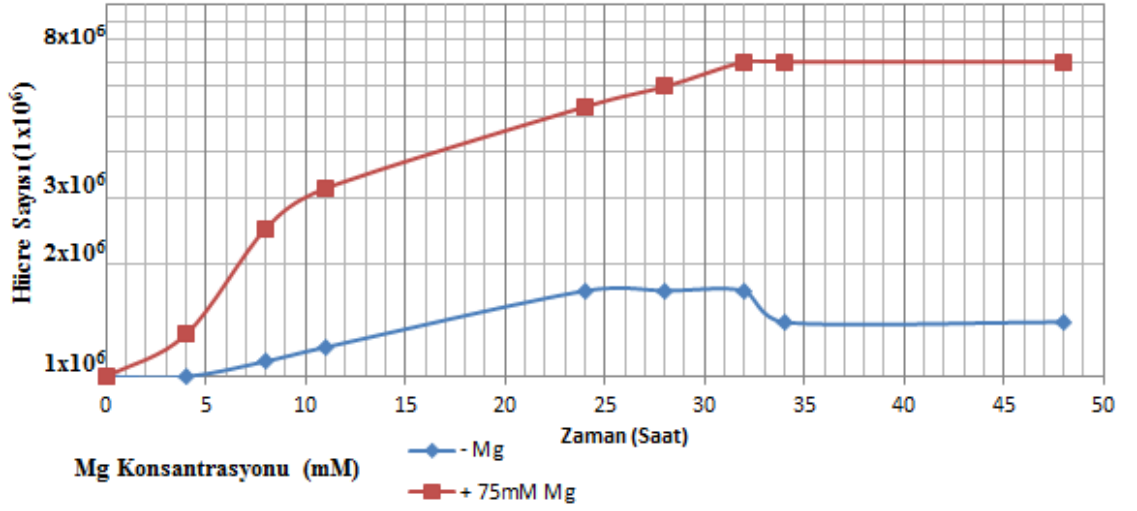
Şekil 4.1.1. Sp292 ırkının YEL besi ortamındaki üreme eğrisi

Kontrol ırkın ve ikili mutant ırkın zengin besi ortamındaki generasyon sayıları ve generasyon süreleri, Malzeme ve Yöntem 3.3.1' de belirtilen formüllere göre hesaplanmış olup, Tablo 4.1.' de gösterildi.

Mg<sup>2+</sup> transport sistemi kaldırılmış ikili mutant ırkın, Mg<sup>2+</sup> içermeyen ve 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200 ve 250 mM konsantrasyonlarında MgCl<sub>2</sub> içeren YEL besi ortamlarında üremesi izlendi (Şekil 4.1.2). İkili mutantın üreyebildiği optimum Mg<sup>2+</sup> konsantrasyonu 75 mM olarak bulundu. İkili mutantın Mg<sup>2+</sup> içermeyen ve üreyebildiği optimum Mg<sup>2+</sup> konsantrasyonundaki üreme eğrisi Şekil 4.1.3.' de ayrıntılı olarak gösterildi.



Şekil 4.1.2. İkili mutantın farklı  $Mg^{2+}$  konsantrasyonlarındaki YEL besi ortamlarında üreme eğrilerinin karşılaştırılması



Şekil 4.1.3. İkili mutantın magnezyum içermeyen ve üreyebildiği optimum  $Mg^{2+}$  konsantrasyonuna sahip YEL besi ortamında üreme eğrilerinin karşılaştırılması

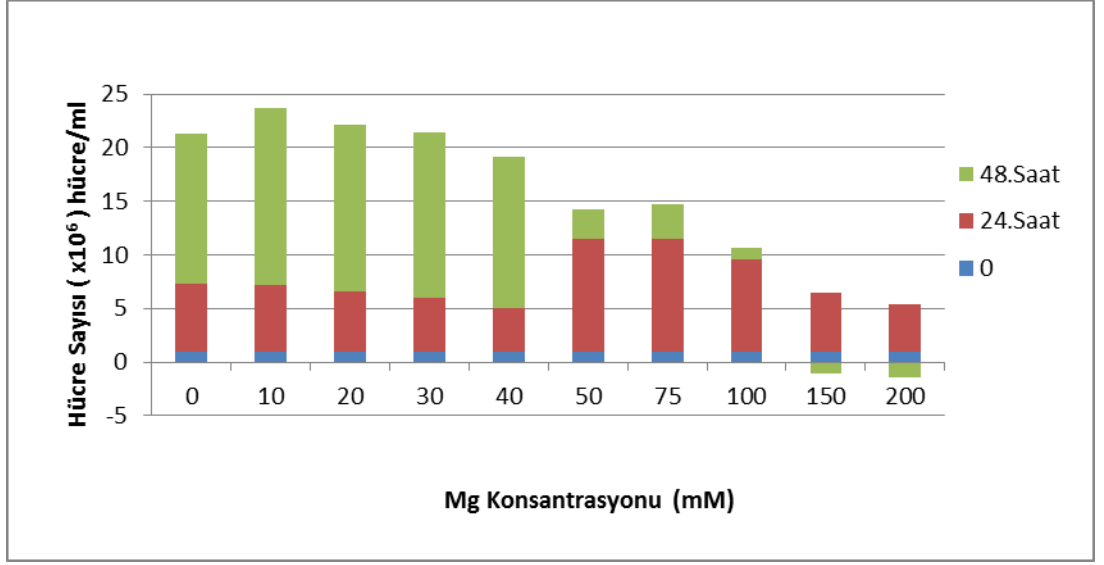
**Tablo 4.1** Kontrol ırkın YEL, ikili mutantın YEL ve optimum ürettiği YEL+75 mM MgCl<sub>2</sub> besi ortamlarında, generasyon sayıları ve süreleri

	Kontrol (YEL)	İkili Mutant (YEL+ 75 mM MgCl <sub>2</sub> )	İkili Mutant (YEL)
Generasyon Sayısı	3.6	1.4	0.7
Generasyon Süresi (Saat)	6	18.5	24.2

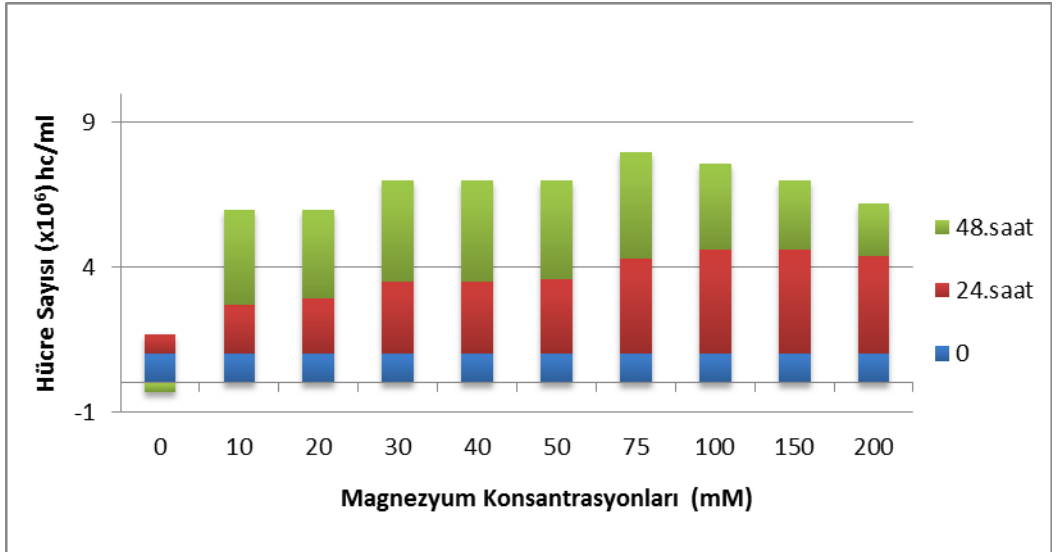
Tablo 4.1' de görüldüğü üzere Mg<sup>2+</sup> transport sistemi kaldırılmış ikili mutantın, YEL besi ortamına optimum ürettiği konsantrasyonda Mg<sup>2+</sup> eklendiğinde, generasyon sayısı artarken, generasyon süresi kısalmaktadır. Ancak kontrole göre, generasyon sayısı daha az olup, buna karşılık generasyon süresi daha uzundur.

#### **4.2. MAGNEZYUM KONSANTRASYONUNDAKİ ARTIŞIN, KONTROL IRK VE İKİLİ MUTANT IRKTA, HÜCRE SAYISI, CANLILIK VE HÜCRE ÇAPI ÜZERİNE ETKİSİ**

Hem kontrol hem de ikili mutant ırkta, YEL besi ortamındaki farklı Mg<sup>2+</sup> konsantrasyonlarının, 24. ve 48. saatlerde hücre sayısı üzerindeki etkisi spektrofotometrik olarak araştırıldı. Şekil 4.2.1 ve Şekil 4.2.2 'de gösterildiği üzere, gerek kontrol gerekse de ikili mutant için, farklı Mg<sup>2+</sup> konsantrasyonlarının 24. ve 48. saatlerde, hücre sayısı dolayısıyla hücre bölünmesi üzerindeki etkilerinin farklı olduğu görüldü. Kontrol ırkta ilk 24 saat için, 50 mM-100 mM Mg<sup>2+</sup> içeren ortamlarda hücre sayısı daha fazla artarken, 48. saatte hücre sayısındaki artışın en çok 10 mM Mg<sup>2+</sup> içeren ortamda gerçekleştiği, 40 mM' den itibaren hücre sayısında azalma olduğu görüldü (Şekil 4.2.1). İkili mutant için ilk 24 saatte, 10 mM-200 mM Mg<sup>2+</sup> içeren ortamlarda Mg<sup>2+</sup> konsantrasyonundaki artışla orantılı olarak hücre sayısı artarken, 48.saatte en fazla artışın 75 mM Mg<sup>2+</sup> içeren ortamda gerçekleşmiş olduğu, 100 mM' den itibaren hücre sayısında azalma olduğu görüldü (Şekil 4.2.2).



**Şekil 4.2.1.** Farklı  $Mg^{2+}$  konsantrasyonlarının kontrol ırkın hücre sayısı üzerine etkisi (Mavi renk deneyin başlatıldığı, ilk ölçüm anındaki hücre sayısını, kırmızı renk 24 saat içerisinde hücre sayısında meydana gelen artışı, yeşil renk ise; 24.-48. saatler arasında hücre sayısında meydana gelen artışı göstermektedir.)

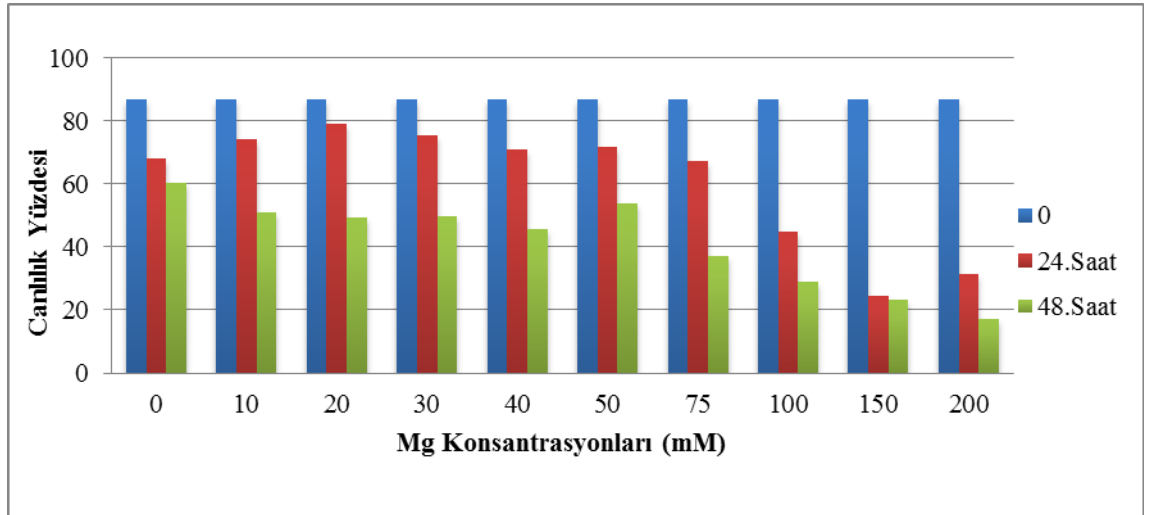


**Şekil 4.2.2.** Farklı  $Mg^{2+}$  konsantrasyonlarının ikili mutant ırkın hücre sayısı üzerine etkisi (Mavi renk deneyin başlatıldığı, ilk ölçüm anındaki hücre sayısını, kırmızı renk 24 saat içerisinde hücre sayısında meydana gelen artışı, yeşil renk ise; 24.-48. saatler arasında hücre sayısında meydana gelen artışı göstermektedir.)

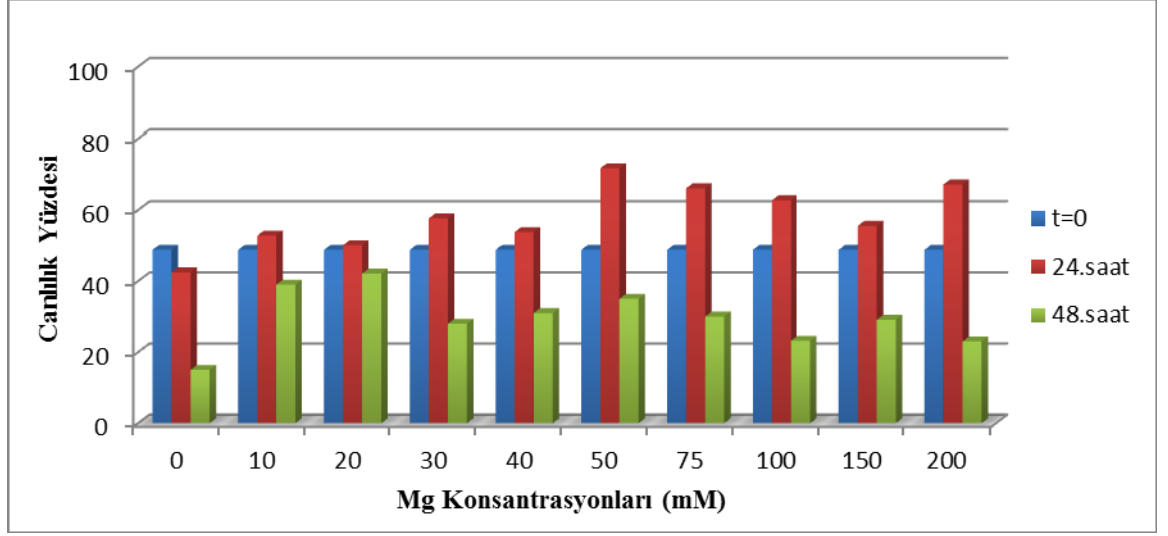


48 saatlik verileri özetleyecek olursak, kontrol ırkta zengin besi ortamına 10 mM Mg ilavesi, hücre bölünmesini en fazla teşvik ederken, 40 mM ve sonrası hücre bölünmesi üzerinde toksik etki oluşturmaktadır. İkili mutant için, 75 mM Mg<sup>2+</sup> ilavesi hücre bölünmesini en fazla teşvik ederken, 100 mM ve sonrası hücre bölünmesi üzerinde toksik etki oluşturmaktadır.

Farklı Mg<sup>2+</sup> konsantrasyonlarının canlılık üzerine etkisi Şekil 4.2.3 ve Şekil 4.2.4' te gösterilmektedir. 24. saatte kontrol ırkta; 100 mM' ye kadar olan Mg<sup>2+</sup> ilavesi, Mg<sup>2+</sup> ilave edilmemiş ortamla kıyaslandığında canlılık yüzdesini artırırken, 48. saatte 10 mM' den itibaren canlılık yüzdesinin azaldığı görüldü (Şekil 4.2.3). İkili mutantta ise; 24. saatte, 10 mM'den itibaren canlılık yüzdesi artarken, en fazla artışın 50mM Mg<sup>2+</sup> içeren ortamda olduğu. 48. saatte 10-20 mM Mg<sup>2+</sup> içeren ortamlara kıyasla, 30 mM' den itibaren canlılık yüzdesinin azaldığı görüldü (Şekil 4.2.4).

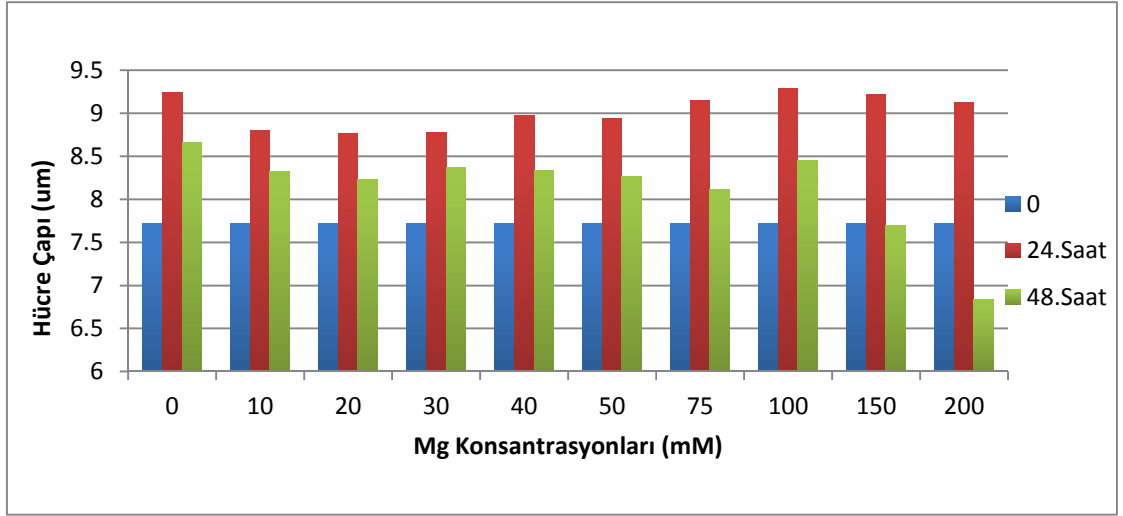


**Şekil 4.2.3.** Artan Mg<sup>2+</sup> konsantrasyonunun, kontrol ırkta canlılık üzerine etkisi (Mavi renk sütun deneyin başlatıldığı andaki canlılık yüzdesini, kırmızı renk sütun 24. saatteki canlılık yüzdesini, yeşil renk sütun 48. saatteki canlılık yüzdesini göstermektedir.)



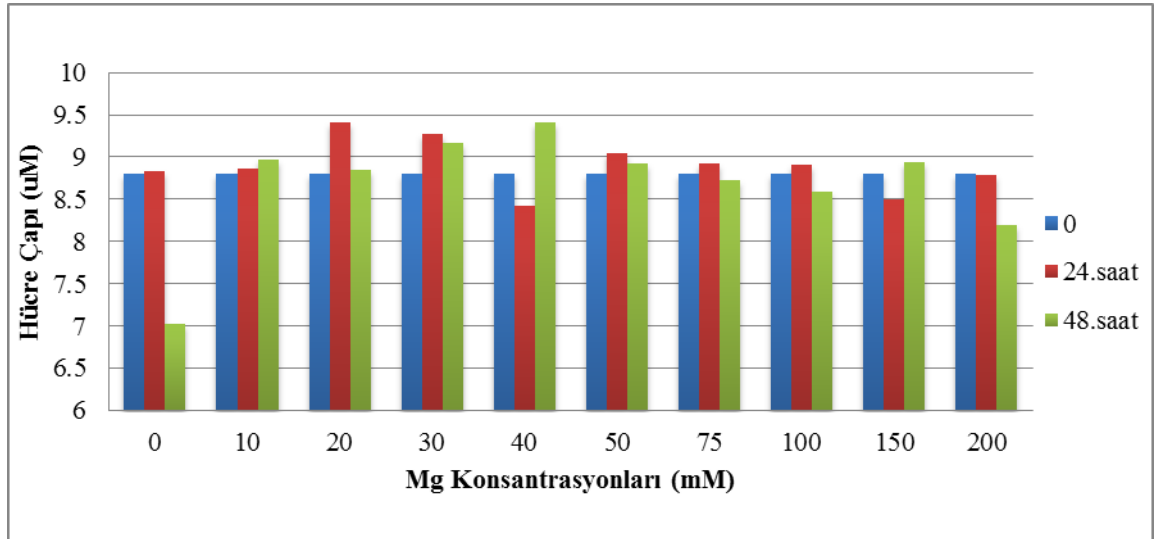
**Şekil 4.2.4.** Artan  $Mg^{2+}$  konsantrasyonunun, ikili mutant ırkta canlılık üzerine etkisi (Mavi renk sütun deneyin başlatıldığı andaki canlılık yüzdesini, kırmızı renk sütun 24. saatteki canlılık yüzdesini, yeşil renk sütun 48. saatteki canlılık yüzdesini göstermektedir).

Magnezyumun her iki ırkta, hücre büyümesinin bir göstergesi olan hücre çapı üzerine etkisi Şekil 4.2.5 ve Şekil 4.2.6.' da gösterilmektedir. Başlangıçta, ikili mutant ırkın hücre çapının ( $8.8 \mu m$ ), kontrol ırkın hücre çapından ( $7.6 \mu m$ ) daha fazla olduğu görüldü. Kontrol ırkın hücre çapının 24.saatte, ortamların hepsinde artmış olduğu görüldü (Şekil 4.2.5). 48. saatte ise, bütün ortamlarda hücre çapında azalma meydana geldiği ve en belirgin azalmanın 150 mM ve 200 mM  $Mg^{2+}$  içeren ortamlarda olduğu saptandı.



**Şekil 4.2.5.** Artan  $Mg^{2+}$  konsantrasyonunun, kontrol ırkta hücre çapı üzerine etkisi (Mavi sütun, deneyin başlatıldığı ilk andaki hücre çapını, kırmızı sütun 24. saatteki ve yeşil sütun 48. saatteki hücre çapını göstermektedir).

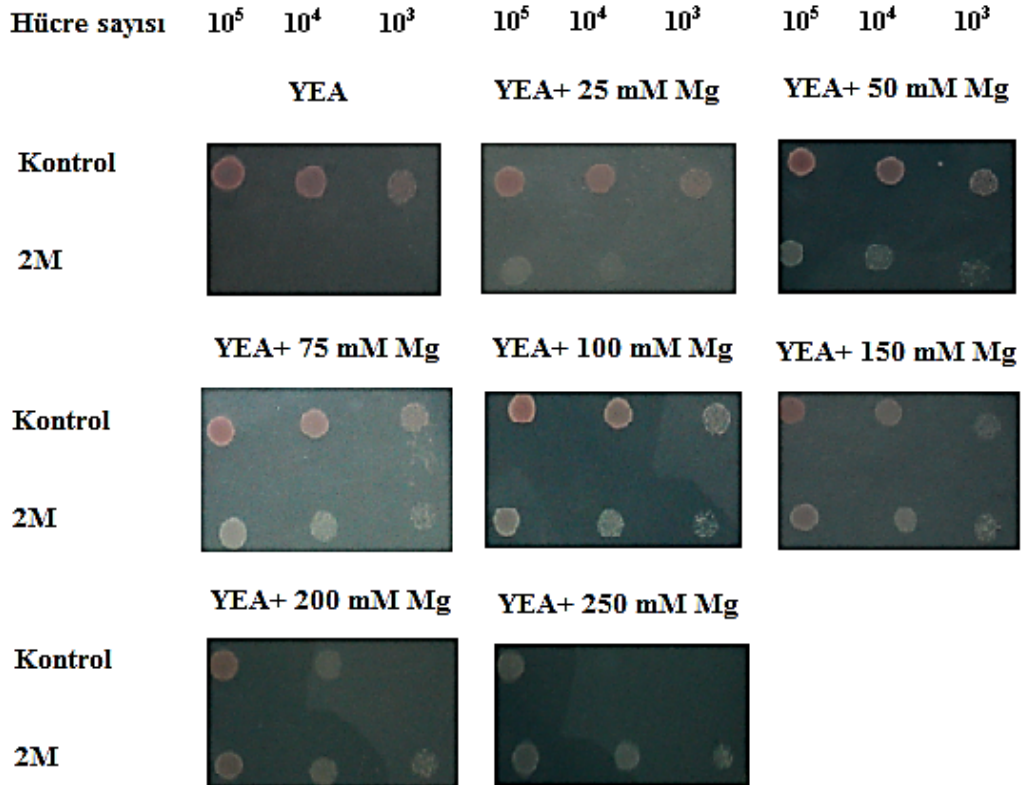
İkili mutantta ise 24. saat verilerine göre; 20 mM-30 mM  $Mg^{2+}$  destekli ortamlarda hücre çapının, diğer ortamlara göre artmış olduğu, 48. saatte ise, 30 mM-40 mM  $Mg^{2+}$  destekli ortamlarda hücre çapının arttığı görüldü (Şekil 4.2.6).



**Şekil 4.2.6.** Artan  $Mg^{2+}$  konsantrasyonunun, ikili mutant ırkta hücre çapı üzerine etkisi (Mavi sütun, deneyin başlatıldığı ilk andaki hücre çapını, kırmızı sütun 24. saatteki ve yeşil sütun 48. saatteki hücre çapını göstermektedir).

### 4.3. FARKLI MAGNEZYUM KONSANTRASYONLARININ KATI BESİYERİNDE KONTROL VE İKİLİ MUTANT İRKİN ÜREMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Plazma membranındaki magnezyum transportundan sorumlu iki kanal proteinini kodlayan genler bakımından delesyonlu ırkın (2M), YEA besi ortamında üreyebildiği optimum  $Mg^{2+}$  konsantrasyonunu bulabilmek amacıyla kontrol ırk ile karşılaştırmalı olarak  $10^5$ ,  $10^4$  ve  $10^3$  hücre olacak şekilde nokta ekimler yapıldı. Şekil 4.3.' te görüldüğü üzere, ikili mutant ırk,  $Mg^{2+}$  desteksiz YEA ortamında üreyememektedir. YEA besi ortamına 200 mM' ye kadar  $Mg^{2+}$  ilave edilmesi, ikili mutantın üremesini artırmakla birlikte, 250 mM' den itibaren duyarlılık oluşmaya başlamaktadır. Kontrol ırkta ise; YEA ortamına 150 mM  $Mg^{2+}$  ilave edilmiş ortamdan itibaren duyarlılık oluştuğu görülmektedir.

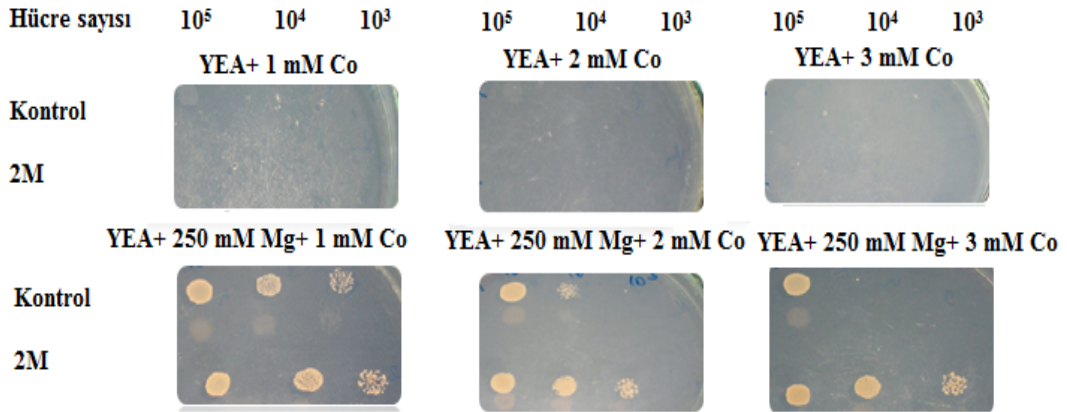


Şekil 4.3. Farklı  $Mg^{2+}$  konsantrasyonlarının katı besiyerinde kontrol ve ikili mutant ırkta üreme üzerine etkisi (Kontrol: Sp292, 2M: İkili Mutant Irk)

#### 4.4. KONTROL VE İKİLİ MUTANT İRKTA BAZI METALLERİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

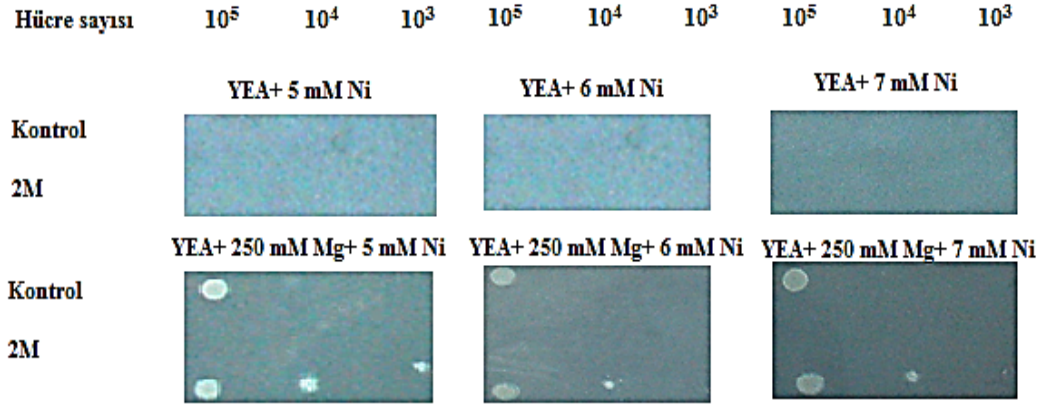
Kontrol ırkın (Sp292 h<sup>-</sup>) ve ikili mutantın (2M) üremeleri üzerine Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> metallerin etkilerini araştırmak için farklı konsantrasyonlarda bu ağır metalleri içeren zengin besi ortamları (YEA) Malzeme ve Yöntem 3.4' te açıklanan yöntemle hazırlandı.

Kobalt içeren besi ortamlarında, Mg<sup>2+</sup> desteği olmadan kontrol ve ikili mutant ırkın üreyemediği görüldü. Ancak 1 mM, 2 mM ve 3 mM CoCl<sub>2</sub> içeren ortamlara, ikili mutantın çoğalabilmesi amacıyla 250 mM Mg<sup>2+</sup> ilave edildiğinde, ikili mutantın üreme gösterdiği, kontrol ırkın 1mM Co<sup>2+</sup> de üreyebildiği, ancak 2 mM' den itibaren duyarlılık olduğu görüldü (Şekil 4.4.1).



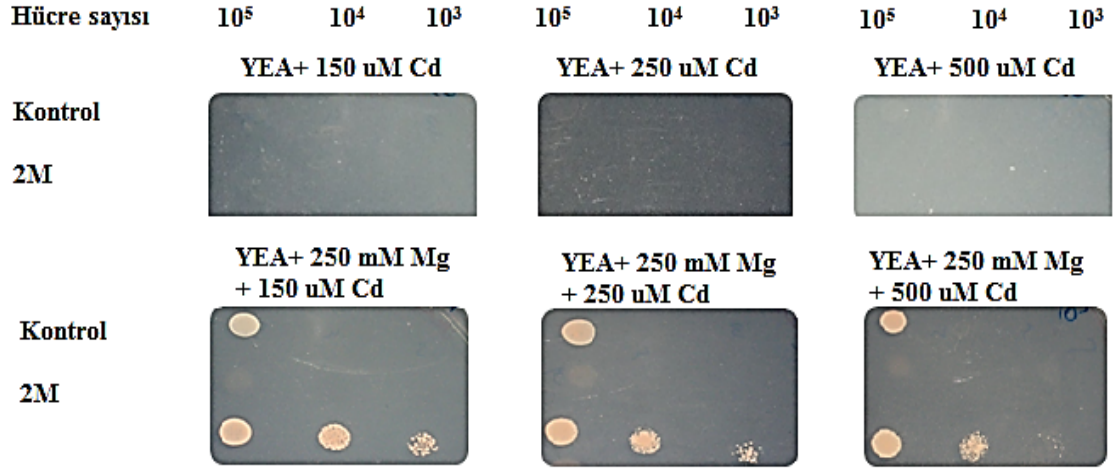
**Şekil 4.4.1.** YEA besi ortamında 1 mM- 2 mM- 3 mM CoCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarının kontrol ve ikili mutant ırkın üremesi üzerine etkisi ( Kontrol: Sp292, 2M: İkili Mutant )

Nikel içeren besi ortamlarında, Mg<sup>2+</sup> desteği olmadan kontrol ve ikili mutant ırkın üreyemediği görüldü. Ancak 5 mM, 6 mM ve 7 mM NiSO<sub>4</sub> içeren ortamlara, Mg<sup>2+</sup> ilave edildiğinde, kontrol ırk tolerans gösterirken, ikili mutant ırkın kontrole göre daha dirençli olduğu görüldü (Şekil 4.4.2).



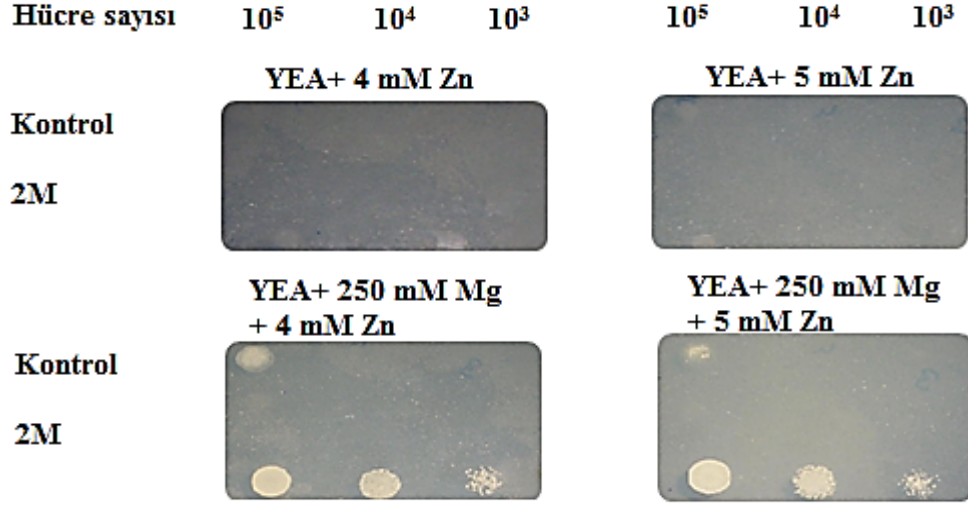
Şekil 4.4.2 YEA besi ortamında 5 mM- 6 mM-7 mM NiSO<sub>4</sub> konsantrasyonlarının kontrol ve ikili mutant ırkın üremesi üzerine etkisi

Kadmiyum içeren Mg<sup>2+</sup> desteksiz besi ortamlarında, kontrol ve ikili mutant ırkta üreme görülmemektedir. 150 µM, 250 µM ve 500 µM CdCl<sub>2</sub> içeren ortamlara Mg<sup>2+</sup> ilave edildiğinde, kontrol ırk tolerans gösterirken, ikili mutant ırk direnç göstermiş olup, 500 µM' den itibaren duyarlılık göstermeye başlamıştır (Şekil 4.4.3).



Şekil 4.4.3. YEA besi ortamında 150 µM- 250 µM- 500 µM CdCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarının kontrol ve ikili mutant ırkın üremesi üzerine etkisi

Çinko içeren besi ortamlarında, Mg<sup>2+</sup> desteği olmadan iki ırkta da üreme görülmedi. 4 mM ve 5 mM ZnCl<sub>2</sub> içeren ortamlara Mg<sup>2+</sup> ilave edildiğinde, kontrol ırkın 4 mM Zn<sup>2+</sup> içeren ortama tolerans gösterdiği, 5 mM Zn<sup>2+</sup> içeren ortamda duyarlı hale geldiği, ikili mutant ırkın ise, bu ortamlarda dirençli olduğu görüldü (Şekil 4.4.4).



Şekil 4.4.4 YEA besi ortamında 4 mM-5 mM ZnCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarının, kontrol ve ikili mutant ırkın üremesi üzerine etkisi

CorA Mg<sup>2+</sup> transport sistemine homoloji gösteren gen bölgesi, delesyon yapılarak tamamen kaldırılmış ikili mutant ırktan yararlanarak, Mg<sup>2+</sup> taşıma sistemi ile Mg<sup>2+</sup> den başka Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> gibi metallerin taşınabilirliğini anlamak üzere yaptığımız çalışmada ikili mutant ırkın; Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> ve Cd<sup>2+</sup> nin belli konsantrasyonlarına karşı dirençli olduğu görüldü.

Mg<sup>2+</sup> taşıma sistemine sahip kontrol ırkın, magnezyumca desteklenmemiş katı besiyerinde Co<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> nin yüksek konsantrasyonlarına karşı duyarlı olduğu, ancak magnezyum destekli katıbesiyerinde Co<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup> nin yüksek konsantrasyonlarına karşı belirli oranda tolerans gösterdiği gözlemlendi.

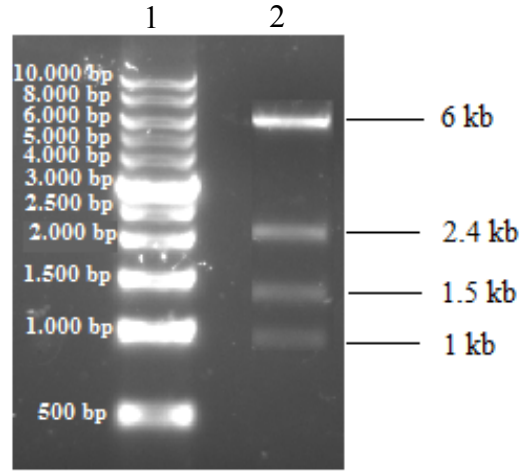
#### 4.5. PLAZMİT İZOLASYONU, MİKTAR TAYİNİ VE SAFLIK KONTROLÜ

GFP işaretli  $\alpha$ 2-tubulin geni taşıyan pDQ105 plazmidinin çoğaltılması amacıyla *E.coli* 'nin DH5 $\alpha$  suşuna transformasyonu, sonrasında da çoğaltılan plazmitin tekrar *E.coli* 'den izolasyonu Malzeme ve Yöntem 3.5.' te belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. İzolasyon sonucu plazmit DNA'sının miktarı ve saflığı nanodrop cihazında ölçülerek belirlendi (Tablo 4.5.). İzolasyon sonucu elde edilen plazmitin kontrolü için, HindIII enzimi ile kesim yapıldı ve enzim kesimi sonucu jel elektroforezi ile analiz edildi. Kesim

sonucunda, 6 kb, 2.4 kb, 1.5 kb ve 1 kb boyutlarında bantların oluşmasıyla pDQ105 plazmitinin boyutunun 10.9 kb olduğu gösterildi (Şekil 4.5).

**Tablo 4.5.** Plazmit DNA'sının spektrofotometrik analizi

Konsantrasyon	Safılık
35 ng/ µl	260/280= 1.87 260/230= 0.70



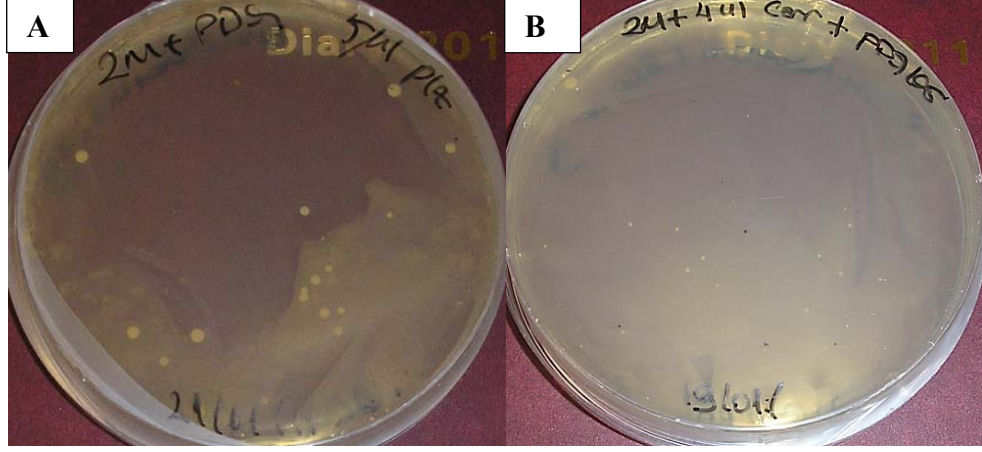
**Şekil 4.5.** pDQ105 plazmitinin HindIII ile kesim sonuçlarının agaroz jel elektroforezi ile analizi. 1- 10 kb markır, 2- pDQ105+ HindIII

#### 4.6. PDQ105' İN KONTROL VE İKİLİ MUTANT IRKA TRANSFORMASYONU

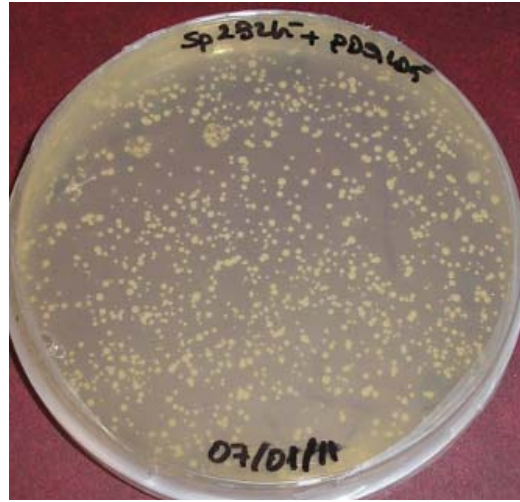
Plazmidin kontrol ve ikili mutant ırka transformasyonu, Malzeme ve Yöntem 3.9' da belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. İkili mutantın transformasyonu öncesinde, bir grup 0.25 M EDTA ile yıkanırken, diğer grup steril distile su ile yıkandı. EDTA ile yıkama yapılarak transformasyon yapılan grubun oluşturduğu koloniler daha büyük olurken distile su ile yıkama yapılarak transformasyon yapılan grubun oluşturduğu kolonilerin daha küçük olduğu görüldü (Şekil 4.6.1). Bunun nedeni olarak, ikili mutantın  $Mg^{2+}$  destekli besi ortamında yetiştirildiğinden dolayı, membran potansiyelini etkileyerek transformasyonun etkinliğini azaltmış olabileceği düşünüldü.



İkili mutant ve kontrol ırkın transformasyon sonrası oluşturdukları koloni sayıları karşılaştırıldığında, ikili mutantın transformasyon etkinliğinin çok daha düşük olduğu görüldü (Şekil 4.6.1, Şekil 4.6.2).



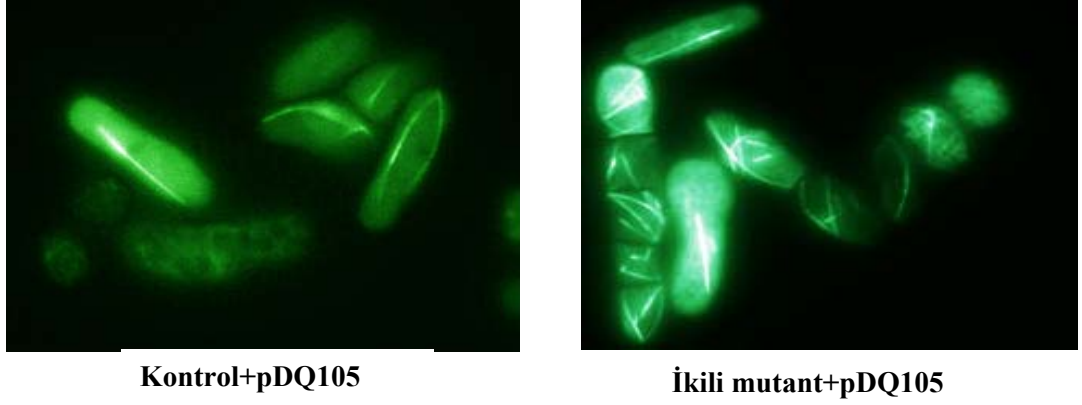
**Şekil 4.6.1** İkili mutantın pDQ105 ile transformasyonu **A.**'da transformasyon öncesi EDTA ile yıkanan hücrelerin oluşturduğu büyük transformant koloniler, **B.**'de EDTA ile yıkama yapılmadan transformasyon yapılması sonucunda oluşan küçük transformant koloniler



**Şekil 4.6.2** Kontrol ırkın (Sp292) pDQ105 ile transformasyonu

Transformasyon sonrası kontrol ve ikili mutantın seçimi için gerekli seçici besi ortamları, Malzeme ve Yöntem 3.2. 'de açıklanan yöntemle hazırlandı. Transformant ırlara ait koloniler, seçici sıvı besi ortamlarında üretilip, logaritmik fazda alınan

örnekler floresan mikroskobunda incelendi. Şekil 4.6.3' te her iki ırka ait, plazmiti alan hücrelerde GFP işaretli mikrotübüller gösterilmektedir.



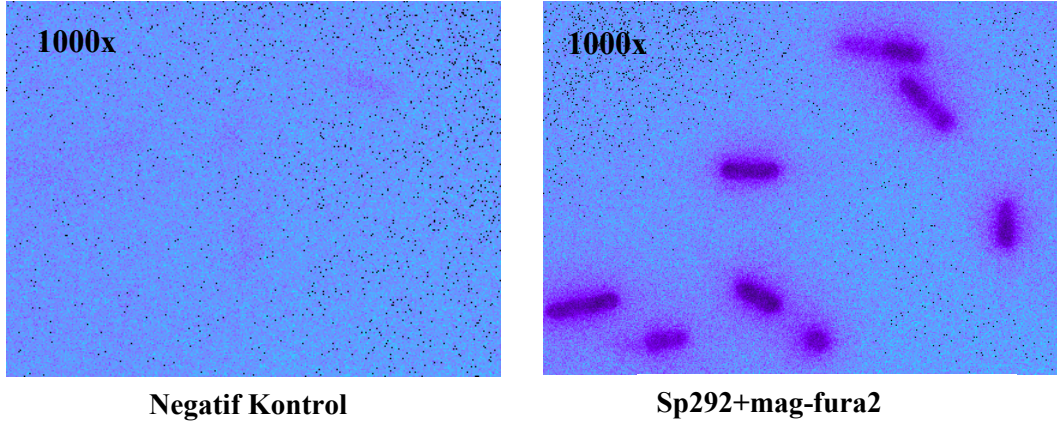
**Şekil 4.6.3** Transformasyon sonrası kontrol ve ikili mutantın floresan mikroskobunda 1000x büyütme ile elde edilmiş görüntüleri

#### 4.7. HÜCRE İÇİ SERBEST MAGNEZYUMUN MAG-FURA 2 ARACILIĞIYLA ÖLÇÜLMESİ

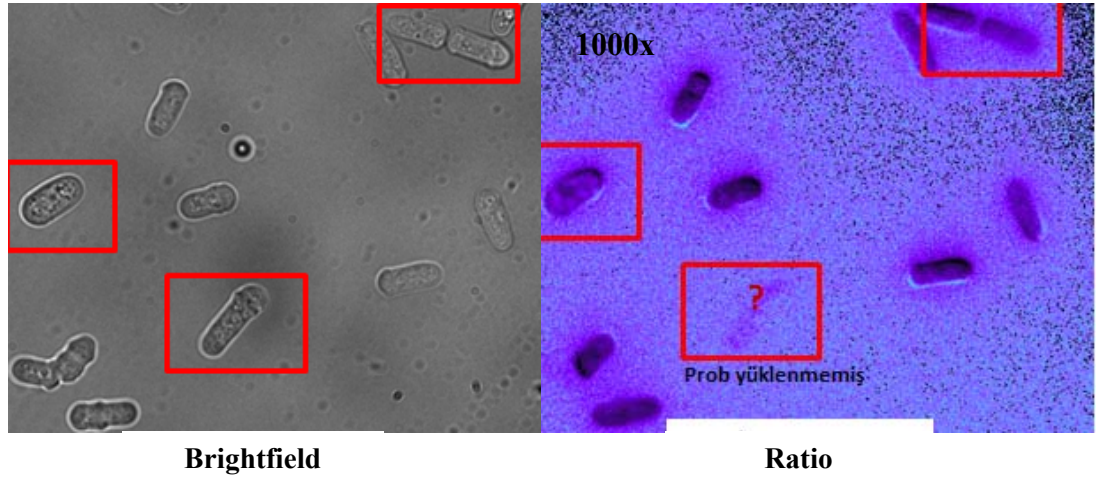
Malzeme ve Yöntem 3.10' da belirtildiği şekilde kontrol ve ikili mutant ırk mag-fura 2 probu ile yüklendi.

MetaFluor 6.2r4 yazılımı ile floresan mikroskobunda, prob ile yüklenen hücreler seçilerek 340 nm ve 380 nm' deki floresan yoğunlukları ve 340/380 oranları yani R değerleri elde edildi. Prob ile yüklenmiş ve yüklenmemiş hücrelerin orantısal (ratio) görüntüleri Şekil 4.7.1' de gösterilmektedir. Prob ile yüklemenin olduğu hücrelerden alınan sinyaller ile yükleme yapılmayan hücrelerden gelen sinyaller karşılaştırıldığında, prob ile yüklenmiş hücrelerden gelen sinyallerin düşük olduğu sonucuna varıldı. Ancak prob ile yükleme yapılmayan hücreler (Şekil 4.7.1) R görüntüsü oluşturmadığı için, R görüntüsü veren hücreler yüklenmiş kabul edilerek, hücre sınırları belirlenip, sadece probu içine almış hücrelerden gelen sinyaller değerlendirildi. Ayrıca Şekil 4.7.2' de prob ile yüklenmiş hücrelerin, ışık mikroskobundaki görüntüsü ile ratio görüntüsü karşılaştırılmaktadır. İşaret edilen yüklenmemiş hücrenin, ışık mikroskobu görüntüsü mevcutken, ratio görüntüsü bulunmamaktadır.

Mag-fura 2 probu, floresan sinyal yoğunluğunun değerlendirilmesi amacıyla, başka bir hücre çeşiti olan nöroblastoma hücrelerine de uygulandı. Bu hücre çeşitinde, prob ile yüklenmiş hücrelerden gelen sinyallerin, prob ile yüklü *Schz. pombe*' ye ait hücrelerle karşılaştırıldığında çok daha fazla olduğu görüldü. Bu da bize mag-fura 2 probunun, *Schz. pombe*' de etkin bir şekilde yüklenmediğini gösterdi. Bunun nedeni olarak, mayaların kalın hücre duvarına sahip olması ve/veya iyon transport mekanizmaları hakkında yeterli bilginin bulunmaması olduğu düşünülmektedir.

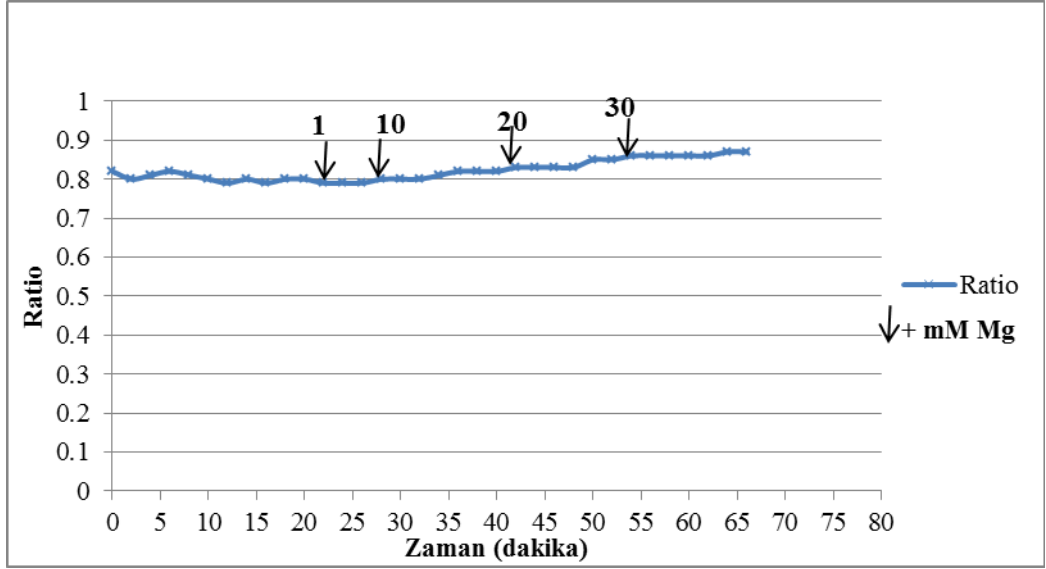


**Şekil 4.7.1** Mag-fura 2 ile yükleme yapılmayan ve yüklemenin gerçekleştiği kontrol ırka ait hücrelerin orantısal görüntüleri

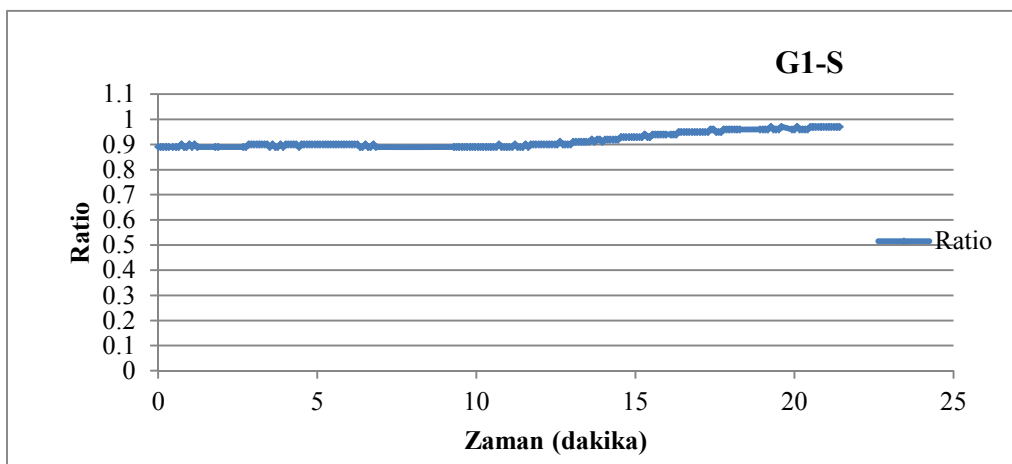
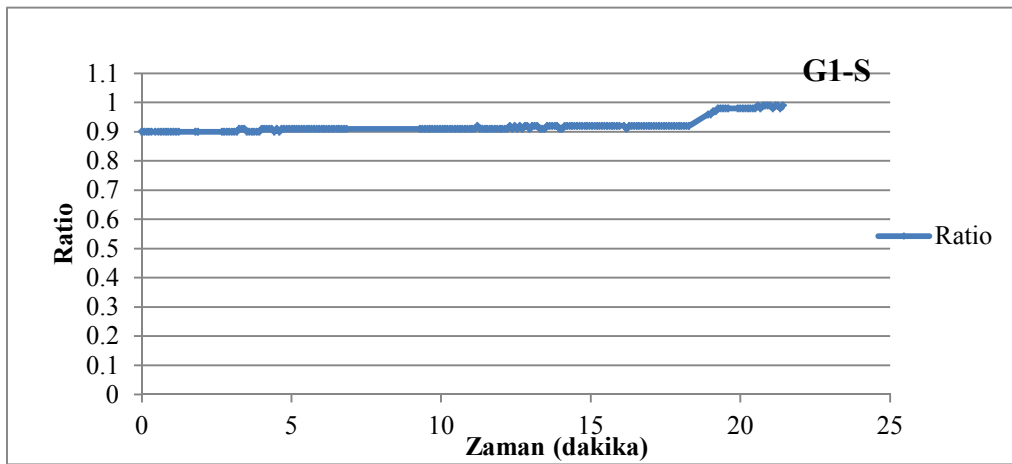
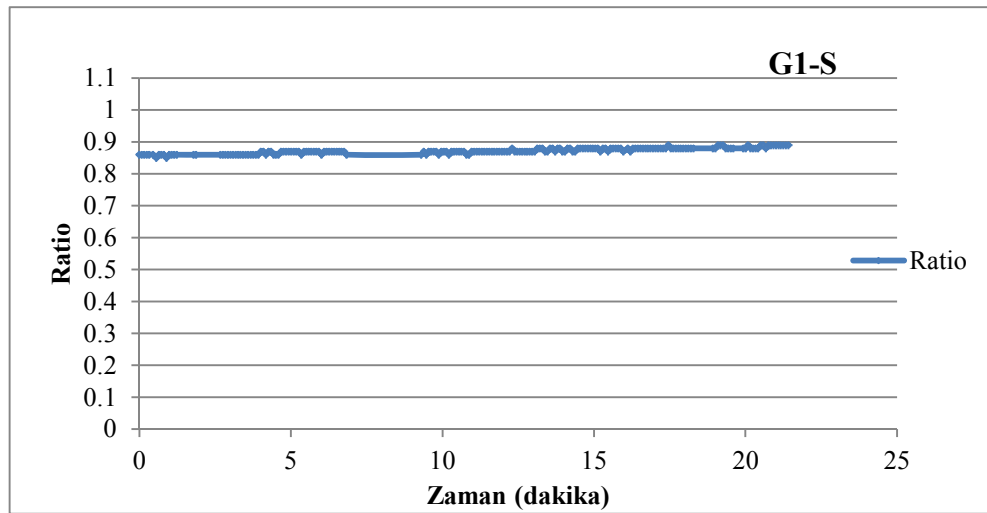


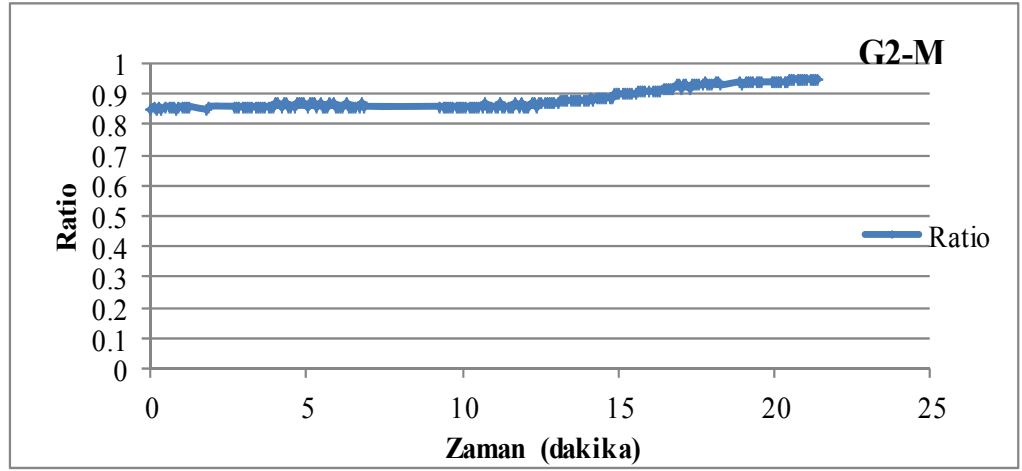
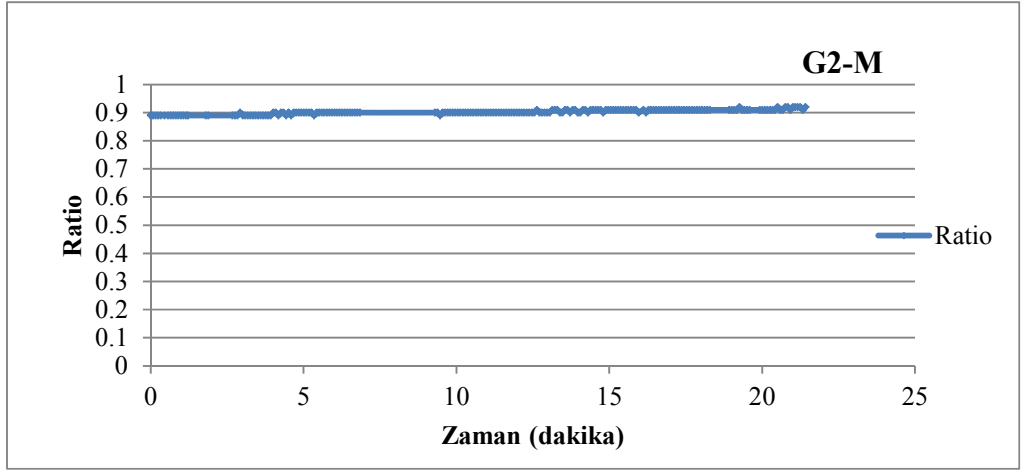
**Şekil 4.7.2** Mag-fura 2 ile yükleme yapılan hücrelerde, ışık mikroskobu görüntüsü (brightfield) ile ratio görüntüsü karşılaştırılmaktadır. Probu içine almayan hücre ratio görüntüsünde işaret edilmektedir (Büyütme: 1000x).

Çalışmamızda, kontrol ırk olarak belirttiğimiz  $Mg^{2+}$  transport sistemine sahip Sp292 ırkında, mag-fura 2 probunun in vivo kalibrasyonu denendi. Logaritmik fazın ortalarında, hücreler proba yükleme yapıldıktan sonra kültür kabında sabitlenip,  $R_{max}$  değerini elde etmek için ortama; 1mM, 5mM, 10mM olacak şekilde  $MgCl_2$  eklenmesine karşın hücre içi serbest  $Mg^{2+}$ deki değişimlerin göstergesi olan R değerinin sadece zamana bağlı olarak arttığı görüldü (Şekil 4.7.3). Hücre ortamına 10 mM  $MgCl_2$  ilave edildikten sonra devam eden süreçte, hücre içi  $Mg^{2+}$  değişimi olup olmadığını anlamak amacıyla 20 dakikalık gözlem yapıldı. Hücre döngüsünün G1-S ve G2-M aşamalarında bulunan 5 hücreden elde edilen R değerleri şekil 4.7.4' teki grafiklerde verildi.



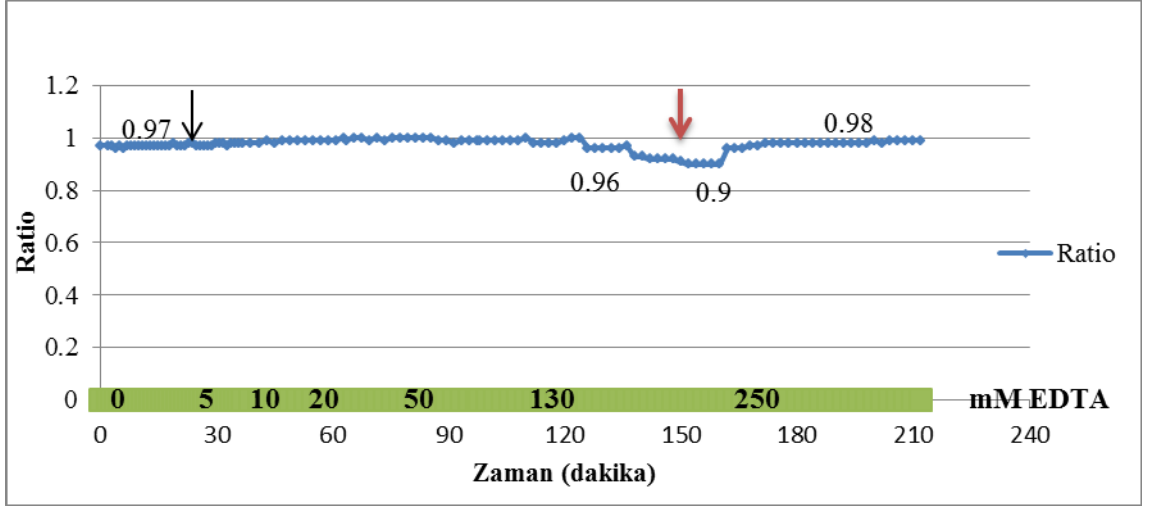
**Şekil 4.7.3** Kalibrasyon sırasında, hücre ortamına artan konsantrasyonlarda  $Mg^{2+}$  eklenmesinin R değeri üzerindeki etkisi





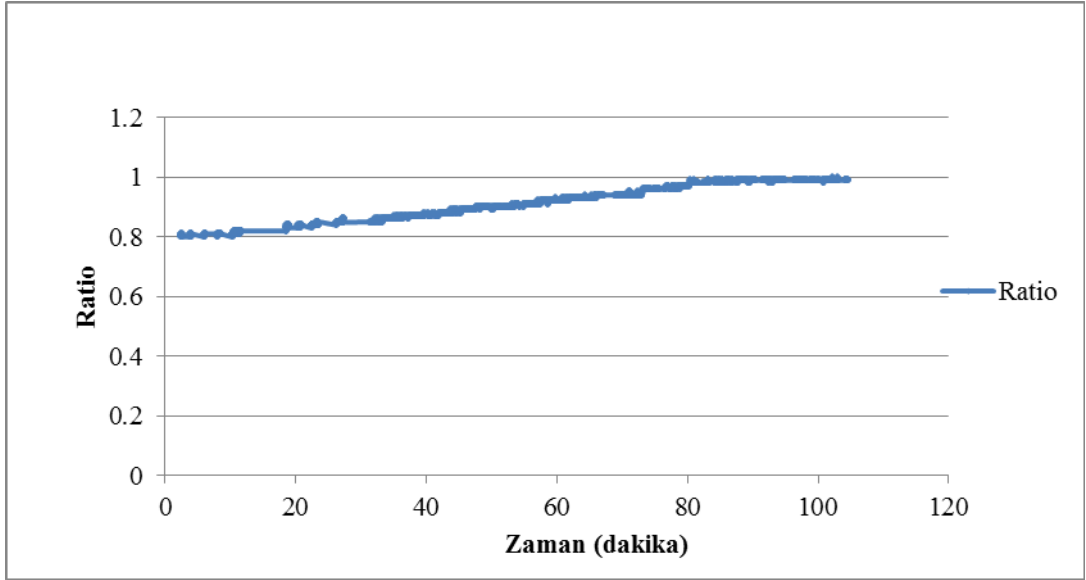
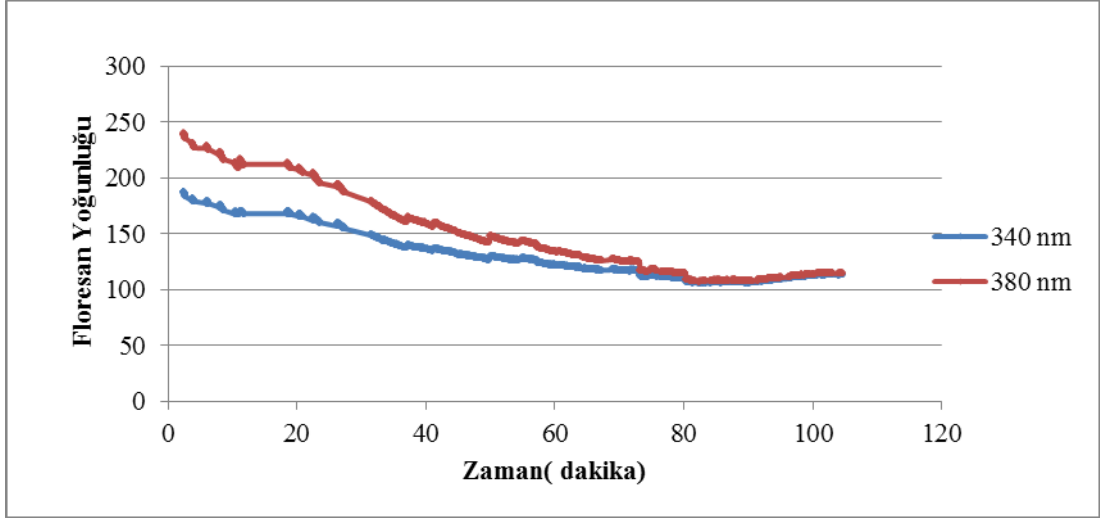
**Şekil 4.7.4** Hücre ortamına 10 mM MgCl<sub>2</sub> ilave edilen, hücre döngüsünün G1-S ve G2-M aşamalarında bulunan kontrol ırka ait 5 farklı hücrenin R değerlerinin zamana bağlı değişimi

Gözlemlerimiz sonucunda, kontrol ırkta R değerleri 0.8-1 aralığında olduğu, R değerlerinin, ortama ilave edilen Mg<sup>2+</sup> den bağımsız olarak zamanla artış gösterdiği düşünüldü. Aynı şekilde ortamdaki Mg<sup>2+</sup> nin uzaklaştırılarak, R<sub>min</sub> değerini elde etmek için, artan konsantrasyonlarda (5, 10, 20, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 190, 210, 230, 250 mM) EDTA uygulandı. Ancak hücrelerin ölçüm yapılmaya başlandığı andaki R değerinden daha düşük R<sub>min</sub> değerleri elde edilemedi. Şekil 4.7.5' de R<sub>min</sub> değerini elde etmek amacıyla ölçüm yapılan hücrelerin birinden elde edilen R değerleri gösterilmektedir. Siyah okla EDTA' nın eklenmeye başladığı an gösterilirken, kırmızı okla R değerindeki azalma gösterilmektedir.



Şekil 4.7.5 Artan EDTA konsantrasyonlarının R değeri üzerine etkisi

Hücrelerin bulunduğu ortama  $Mg^{2+}$  ilave edilip  $R_{max}$  ve  $F_S$ , ortama EDTA ilave ederek  $R_{min}$  ve  $F_0$  değerlerini elde etmek amacıyla, probun in vivo kalibrasyonu denendi. Ancak yüklenmiş hücrelerden elde edilen R değerlerinin, dış ortama eklenen  $Mg^{2+}$  ve EDTA' dan etkilenmediği, R değerlerinin sadece zamana bağlı olarak artış gösterdiği ya da değişmediği görüldü. 340 nm' deki (prob- $Mg^{2+}$ ) ve 380 nm' deki (prob) floresan yoğunlukları incelendiğinde, R değerindeki zamana bağlı artışın nedeni olarak, probun hücre dışına pompalanmasından kaynaklanmış olabileceğini düşündürdü (Şekil 4.7.6).



**Şekil 4.7.6.** 340 nm ve 380 nm ' deki floresan yoğunluğunun zamanla azalmasına bağlı olarak R değerinin artması

Mag-fura 2 aracılığıyla hücre içi serbest  $Mg^{+2}$  nin kantifikasyonunun yapılması için, Gryniewicz ve ark. tarafından [103] geliştirilen \*formülde gereken sayısal değerler, kalibrasyon güçlüğü nedeniyle elde edilemedi, dolayısıyla  $Mg^{+2}$  nin hücre içi kantifikasyonu yapılamadı. Ancak kullanılan prob, ratiometric (orantısal) prob olduğu için, elde edilen sinyallerin şiddeti, ölçülmek istenen iyonun konsantrasyonuna bağlı olup, boya konsantrasyonuna bağlı değildir. Dolayısıyla probun hücre içi konsantrasyonu zamanla azalsa da, farklı hücreler arasında, iyon konsantrasyonlarının bir göstergesi olan R değerleri kıyaslanabilir. Bundan yola çıkılarak, kontrol ırk ve plazma membranındaki  $Mg^{2+}$  transportundan sorumlu iki önemli kanal proteini



kodlayan genler bakımından delesyonlu, ikili mutant ırkın R değerleri kıyaslandı (Şekil 4.7.7).

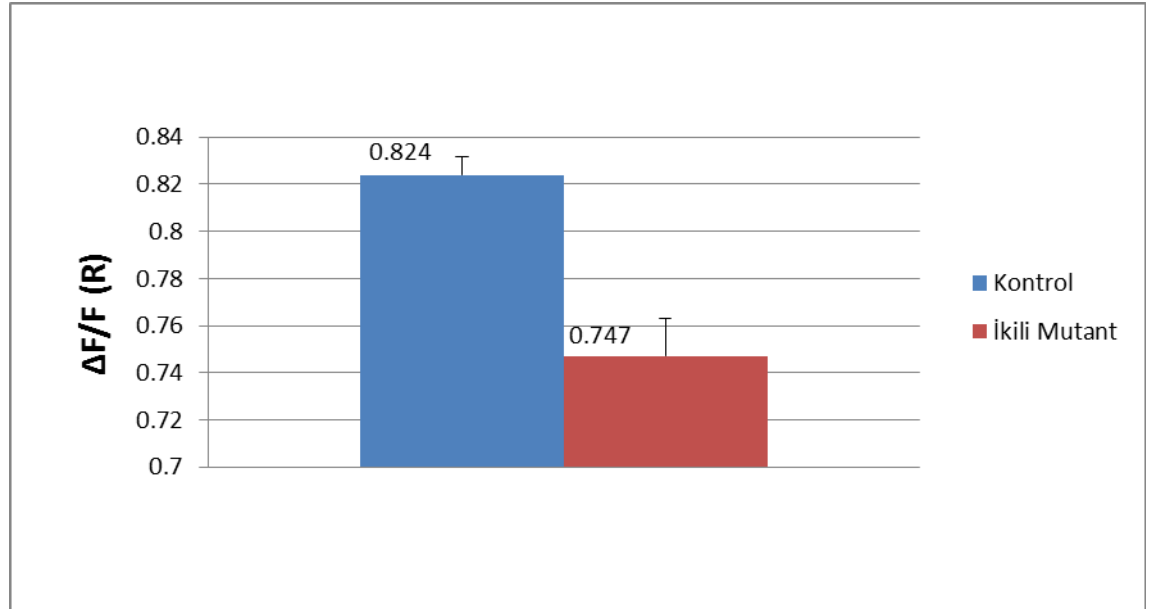
$$* \quad [Mg^{2+}] = K_D \cdot \frac{F_O}{F_S} \cdot \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R}$$

Her iki ırktan elde edilen R değerleri karşılaştırılarak, istatistik olarak anlamlılık, 'unpaired t test' aracılığıyla belirlendi.  $P \leq 0.001$  olarak bulunup, aradaki farklılık istatistiki açıdan oldukça anlamlı olarak değerlendirildi (Tablo 4.7.1).

**Tablo 4.7.1** Kontrol ve ikili mutant ırktan elde edilen R değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

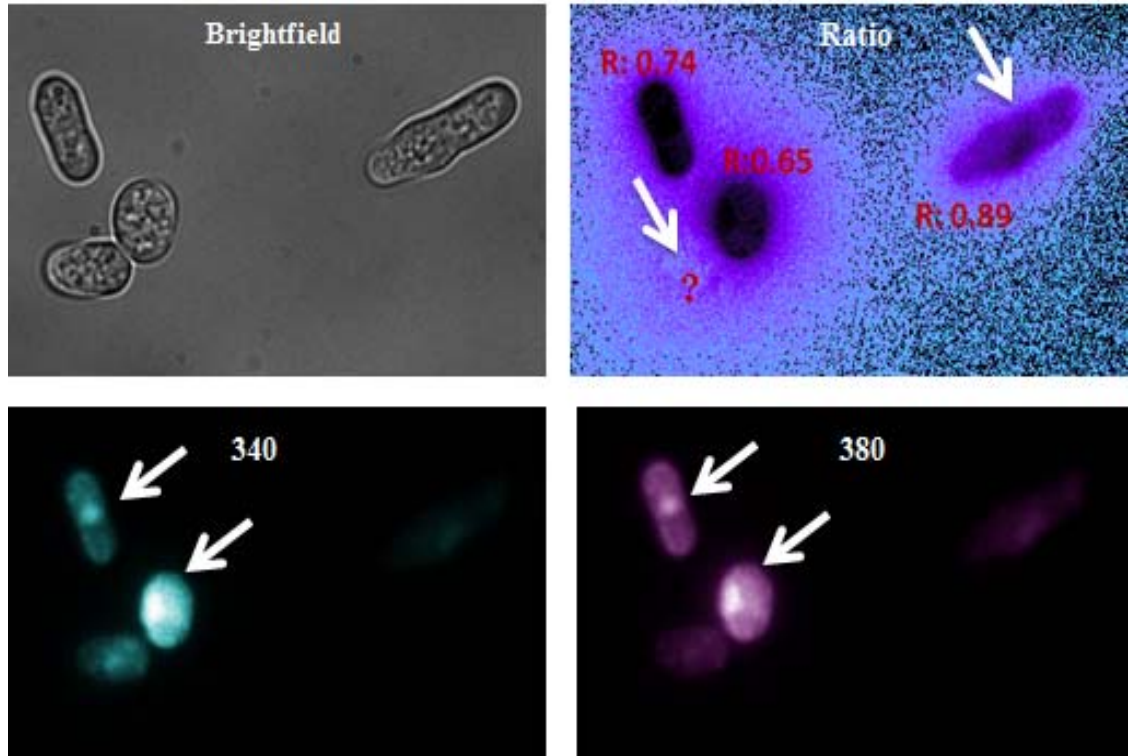
	Hücre Sayısı	$\Delta F/F (R)$
Kontrol Irk (Sp292)	10	0.824±0.007*
İkili Mutant	10	0.747±0.016*

\*ortalama±Standart Hata (SEM),  $P \leq 0.001$



**Şekil 4.7.7** Kontrol ve ikili mutant ırktan elde edilen R değerlerinin karşılaştırılması

Mag-fura 2 ile yüklenen hücrelerde, prob zamanla dışarı pompalandığı için, R değerinin yükseldiği görüldü. Bu nedenle her iki hücre grubundan elde edilen veriler değerlendirilirken, ölçüm sürecindeki ilk 5 dakikada sabit seyreden ve küçük olan R değerleri kullanıldı. Şekil 4.7.8' de magfura 2 ile yüklü ikili mutant hücrelerinin ratio görüntüsünde, R:0.89 olan hücrenin, R:0.74 ve R:0.65 olan hücelere göre daha açık renkte olduğu görüldü. Bu bize R: 0.89 olan hücrede, probun daha fazla dışarıya pompalanmış olabileceğini düşündürdü. Bununla birlikte gerek R görüntüsünde daha koyu olarak görülen, gerekse de 340 ve 380 filtrelerde daha açık görülen hücre merkezinde yer alan yapılar göze çarpmaktadır. Bu yapıların hücre nükleusu olabileceği düşünüldü.



**Şekil 4.7.8** Mag-fura 2 yüklü ikili mutanta ait hücrelerde ışık mikroskobu görüntüsü, ratio görüntüsü, 340 ve 380 eksitasyon filtrelerinden elde edilen görüntüler karşılaştırılmaktadır.

Mag-fura 2 ile yaptığımız çalışmada, hücre içi serbest formda bulunan  $Mg^{2+}$  nin kantifikasyonu, probun kalibrasyonu yapılamadığı için gerçekleştirilemedi. Bununla birlikte probun, *Schz. pombe*' de birçok hücreye yüklenemediği, yüklenen hücrelerde de zamana bağlı olarak probun hücre dışına pompalandığı görüldü. Çalışmamızda kullanılan prob 'ratiometric' olduğu için,  $Mg^{2+}$  ile kompleks yapmış probdan gelen

sinyaller, probun konsantrasyonuna bağılı değildir. Probun bu özelliği sayesinde, kontrol ve ikili mutant ırkta, hücre içi serbest  $Mg^{2+}$  nin bir göstergesi olan 'R' değerleri karşılaştırıldı ve ikili mutantın R değerinin kontrol ırkından düşük olduğu sonucuna varıldı. Dolayısıyla ikili mutantın hücre içi serbest  $Mg^{2+}$  konsantrasyonunun, kontrol ırktan daha az olduğu doğrulandı.

#### **4.8. HÜCRE İÇİ MAGNEZYUMUN MİTOTİK MİKROTÜBÜLLERİN OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ**

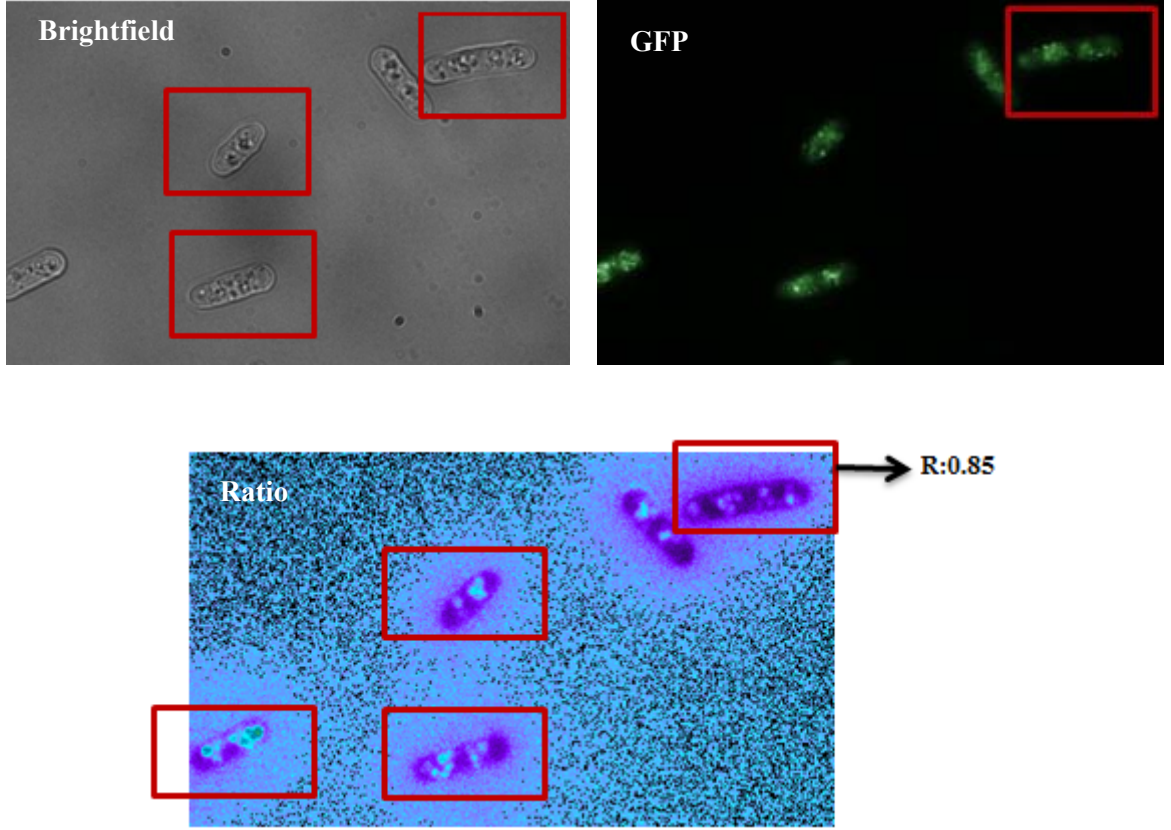
Çalışmamızın ana hedefi,  $Mg^{2+}$  nin mitoz sırasında oluşan, mitotik mikrotübüllerin oluşumu üzerindeki etkisini göstermektir. Bu amaçla deney grubu olarak, magnezyumun alınabildiği sistemde, mitotik mikrotübüllerin nasıl oluştuğunu göstermek için kontrol ırk ile magnezyumu alamayan ikili mutant ırk kullanıldı.

Mikrotübülleri floresan mikroskopunda görünür hale getirmek için, kontrol ve ikili mutant ırk GFP işaretli  $\alpha$ 2-tubulin geni anlatımı yapan plazmit ile transforme edildi. Transformasyon her iki ırkta da başarılı oldu ve her iki ırkın mikrotübülleri floresan mikroskopunda görülür hale geldi (Şekil 4.6.3). Magnezyumun, sitoplazmik mikrotübüllerin oluşumunu teşvik eden etkisi önceki yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu nedenle transformasyon yapılmadan önce, magnezyumu alamayan ikili mutant ırkta sitoplazmik mikrotübül polimerizasyonu görmeyi beklemiyorduk. Ancak ikili mutant ırkta sitoplazmik mikrotübül polimerizasyonunun gerçekleştiğini gördük (Şekil 4.6.3). Bu durum bize ikili mutantın, mikrotübül polimerizasyonu için gereken  $Mg^{2+}$  'yi, ya yetiştirme ortamından pasif yolla sınırlı oranda aldığı  $Mg^{2+}$  den ya da hücre içi magnezyum depoları olarak bilinen mitokondri ya da endoplazmik retikulum gibi yapılardan karşıladığını düşündürdü.

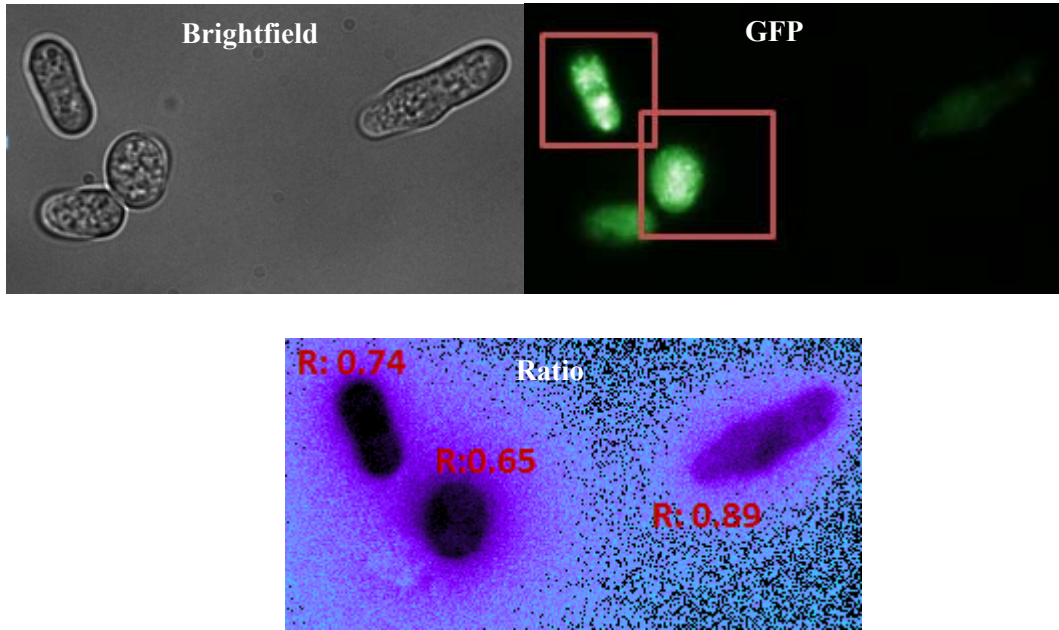
Daha önceki yıllarda yapılan başka bir çalışmada ise; hücre bölünmesinin sonuna doğru, hücrede Mg artışının olduğu ve bunun mitotik mikrotübüllerin depolimerize olmasını sağlayarak mitozun sona ermesini teşvik ettiği yönünde bir hipotez ileri sürülmüştü [6]. Dolayısıyla çalışmamızda, sitoplazmik mikrotübüllerin oluşumunu teşvik eden magnezyumun, mitotik mikrotübüllerin oluşmasındaki ve depolimerizasyonundaki etkisini, floresan görüntüleme ve canlı hücre inceleme yaparak, modern yöntemlerle göstermeyi amaçladık.

Mikrotübülleri GFP ile işaretlenen hücrelerde, eş zamanlı olarak  $Mg^{2+}$  hareketini incelemek amacıyla her iki ırk, logaritmik fazın ortasında, mag-fura 2 ile yüklendi. Ancak mag-fura 2 ile yüklenmiş hücrelerde mikrotübüller görülmedi. Bu durumun, prob ile yüklenmiş hücrede GFP anlatımı olmayışından ya da GFP anlatımı olan hücrede probun yüklenmediğinden kaynaklandığını düşündürdü. Bununla birlikte, veriler dikkatli incelendiğinde, hem prob ile yüklenmiş, hem de plazmiti taşıyan hücrelerde, düşük de olsa otofloresan sinyallerinin üzerinde GFP sinyali olmasına rağmen mikrotübüllerin görünür durumda olmadığı farkedildi (Şekil 4.8.1).

A.



B.

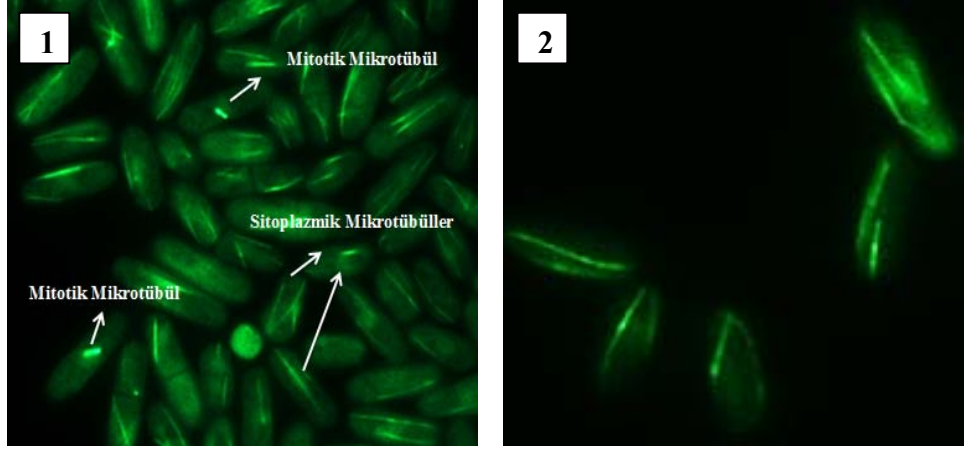


**Şekil 4.8.1** Magfura-2 ile yüklenmiş A. Kontrol ırk, B. İikili mutant ırka ait hücrede, GFP sinyali alınmasına rağmen mikrotübül yapısının görülmediği işaret edilmektedir (Büyütme oranı: 1000x).

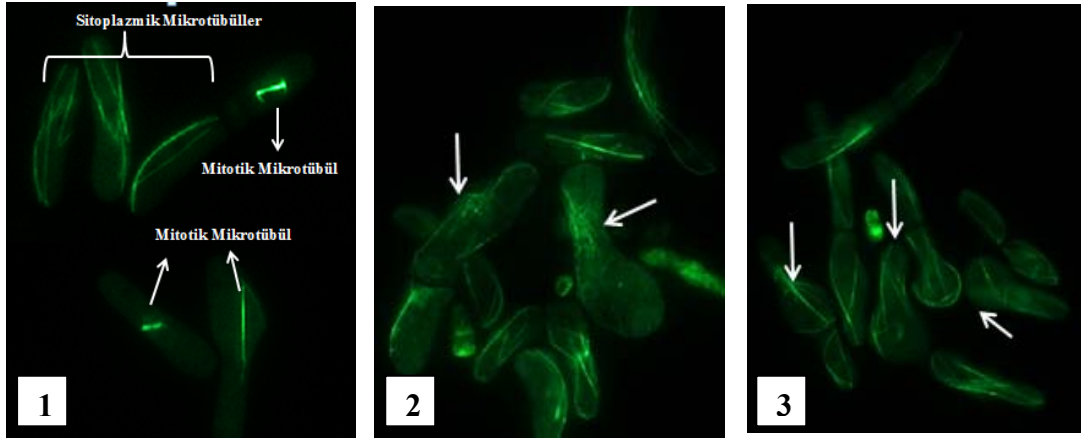
Çalışmamızda, GFP işaretli mikrotübüllerle aynı anda mag-fura görüntüleme yapılamadığı için, magnezyum alamayan model sistemde, mitotik mikrotübüllerin oluşup oluşmadığı ve mikrotübüllerin varlığının ne kadar süreyle devam ettiği araştırıldı. Bu amaçla, transformant iki ırkın mikrotübülleri 24.saatte (Şekil 4.8.2) ve 48. saatlerde (Şekil 4.8.5) incelendi ve aynı zamanda bu iki ırk, hücre sayıları, canlılıkları (Şekil 4.8.3) ve mitotik mikrotübül yüzdeleri (Şekil 4.8.4) bakımından da analiz edildi. Transformant hücreler, tiamin ile regüle edilen promotöre sahip plazmit pDQ105'i içerdiğinden, tiamin içeriği düşük olan \*seçici minimal besi ortamında üretildi. Hücreler, seçici minimal katı besiyeri ortamında 4 gün süreyle üretildikten sonra, inceleme için seçici sıvı kültür ortamına  $10^6$  hücre/ml olacak şekilde ekim yapıldı. (\*Kontrol ırk: MML+225 mg/l adenin+ urasil, İkili mutant ırk MML+225 mg/l adenin+ urasil+ 75 mM  $MgCl_2$ )

24. saatte her iki ırkın mikrotübülleri karşılaştırıldığında, logaritmik evrenin başlarında olan ikili mutant ırkın  $Mg^{2+}$  destekli ortamda, bölünme halindeki birkaç hücrede sağlıklı görülen mitotik mikrotübüllere ve sitoplazmik mikrotübüllere rastlandı. Ancak hücrelerin büyük bir kısmının, mikrotübül demetlerinin sayısı, uzunluğu ve yerleşimi bakımından kontrol ırkından farklı olarak organizasyon bozukluğu gösterdiği ve anormal hücre morfolojisine sahip olduğu görüldü. (Şekil 4.8.2, A-B) İkili mutant ırkın  $Mg^{2+}$  desteksiz ortamda ise, mitotik mikrotübüllere rastlanmadı. Bununla birlikte hücrelerin küçük ve sitoplazmik mikrotübüllerin organizasyonunun bozuk olduğu görüldü (Şekil 4.8.2-C).

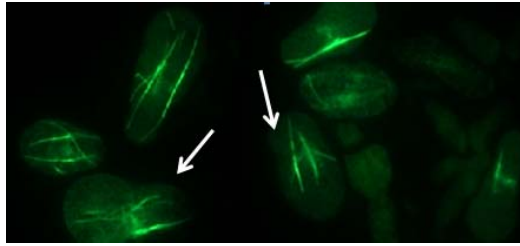
### A. Kontrol Irk (24.Saat)



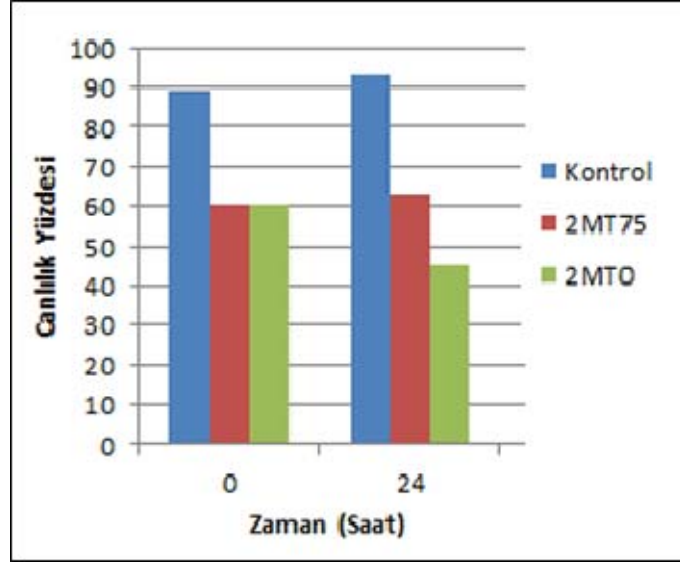
### B. İkili Mutant Irk-Mg Destekli Ortam (24.Saat)



### C. İkili Mutant Irk-Mg Desteksiz Ortam (24.Saat)



**Şekil 4.8.2** 24.saatte **A-1**.kontrol ırkın sitoplazmik ve mitotik mikrotübülleri işaret edilmektedir. **A-2** kontrol ırkın sitoplazmik mikrotübülleri detaylı olarak gösterilmektedir. **B-1**.  $Mg^{2+}$  destekli ortamdaki ikili mutant ırkın sitoplazmik ve mitotik mikrotübülleri gösterilmektedir. **B-2, B-3**.  $Mg^{2+}$  destekli ortamdaki ikili mutant ırkta organizasyonu bozulmuş sitoplazmik mikrotübüller ve morfolojisi bozulmuş hücreler işaret edilmektedir. **C**.  $Mg^{2+}$  desteksiz ortamdaki ikili mutant ırkın düzensiz sitoplazmik mikrotübülleri gösterilmektedir (Büyütme oranı: 1000x ).



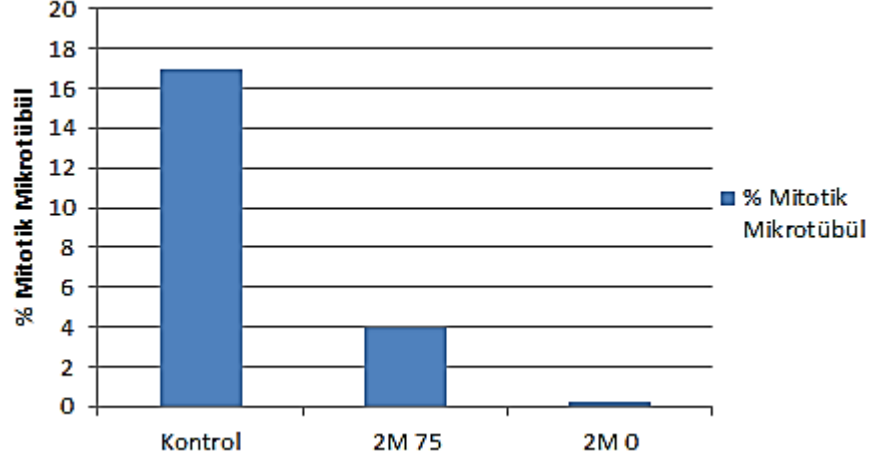
**Şekil 4.8.3** 24.saatte Kontrol ırkta ve ikili mutant ırkın  $Mg^{2+}$  destekli (2M 75) ve  $Mg^{2+}$  desteksiz (2M 0) ortamlarda canlılık yüzdeleri

Analizin yapıldığı 24. saatte kontrol ırkın canlılık yüzdesi % 93, ikili mutant ırkın ise canlılık yüzdesi,  $Mg^{2+}$  destekli ortamda % 62,  $Mg^{2+}$  desteksiz ortamda % 45 olarak bulundu (Şekil 4.8.3). Logaritmik fazın her iki ırkta da devam ettiği 24. saatte, GFP'ye bağlı tubulin anlatımı temel alınarak, her iki ırktan ~110 hücre üzerinde hesaplanan \*mitotik mikrotübül yüzdesi Şekil 4.8.4' te gösterilmektedir. Kontrol ırk, 24.saatte logaritmik fazın sonlarında olmasına rağmen mitotik mikrotübül yüzdesi (% 17), logaritmik fazın ortalarında bulunan  $Mg^{2+}$  destekli ortamdaki ikili mutantınkinden (% 4) daha fazladır.  $Mg^{2+}$  desteksiz ortamdaki ikili mutanta ait hücrelerde, mitotik mikrotübüle rastlanmamıştır.

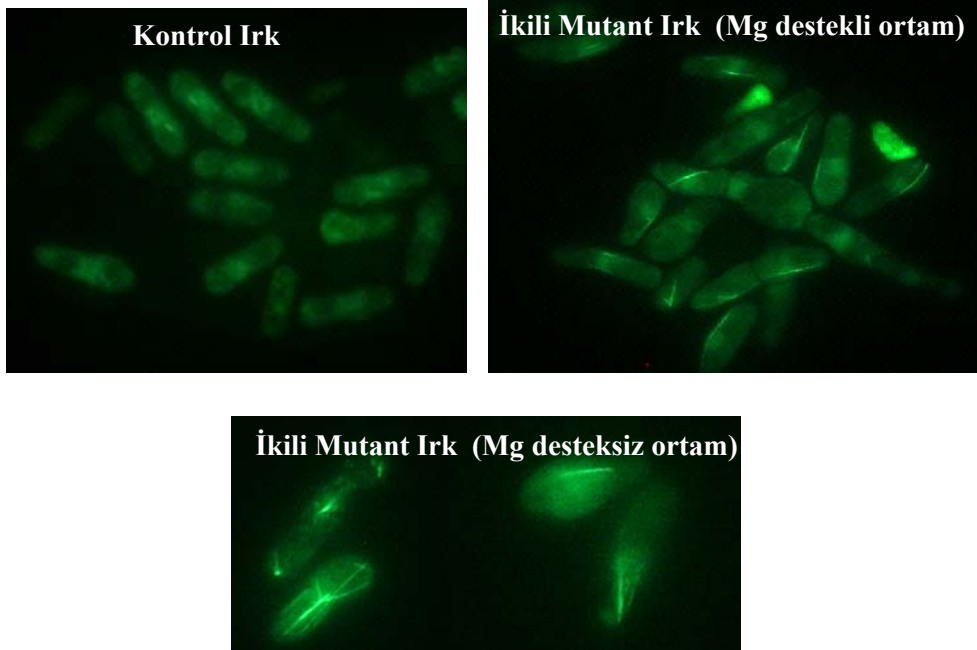
Mitotik Mikrotübül  
Taşıyan Hücre Sayısı

$$\text{*Mitotik Mikrotübül Yüzdesi} = \frac{\text{Mitotik Mikrotübül Taşıyan Hücre Sayısı}}{\text{Sitoplazmik Mikrotübül+Mitotik Mikrotübül Taşıyan Toplam Hücre Sayısı}} \times 100$$





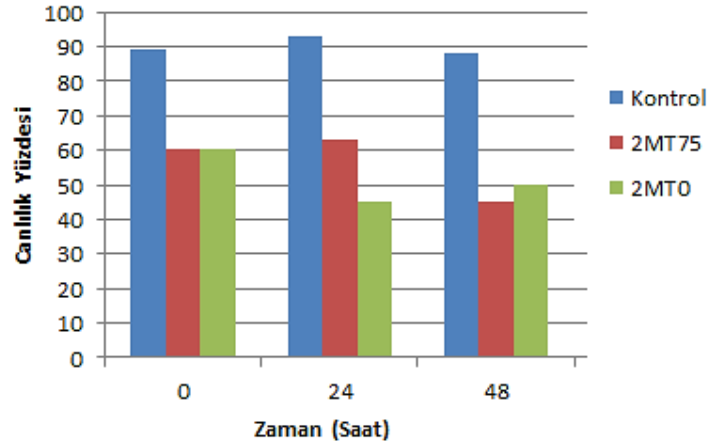
**Şekil 4.8.4** 24. saatte kontrol ırkta ve ikili mutant ırkta ( $Mg^{2+}$  destekli -2M 75 ve  $Mg^{2+}$  desteksiz -2M 0) mitotik mikrotübül yüzdeleri



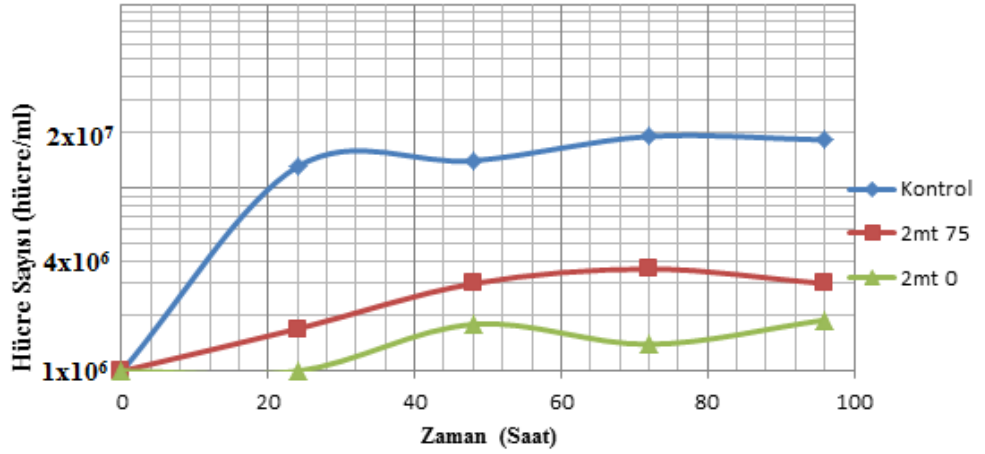
**Şekil 4.8.5** 48. saatte kontrol ve ikili mutant ırkın mikrotübülleri (Büyütme oranı: 1000x )

48. saatte kontrol ırkta GFP işaretli mikrotübül yapısı gözlenmezken, ikili mutant ırkta mikrotübül demetlerinde azalma ve daha kısa mikrotübüller görülmektedir (Şekil: 4.8.5). Kontrol ırkta mikrotübül yapısının görülmemesinin nedeni, incelemenin yapıldığı 48. saatte logaritmik fazın sona ermiş olmasıdır (Şekil 4.8.7). İkili mutant ırkta generasyon süresi kontrol ırka kıyasla daha uzundur ve 48. saatte logaritmik fazın sonları olduğundan sadece sitoplazmik mikrotübüller görülmektedir.

Kontrol ve ikili mutant ırkın, GFP işaretli mikrotübüllerinin 24. ve 48. saatteki gözleminde elde ettiğimiz sonuçlardan biri de, sitoplazmik mikrotübüllerin logaritmik fazın sonunda canlılık yüzdesi fazla olsa bile anlatımının sona ermesidir. Bunu, 48. saatte kontrol ırkın canlılığının % 87 olmasına rağmen sitoplazmik mikrotübüllerin görülmeşi, ikili mutantta canlılığın % 43 olmasına rağmen logaritmik faz devam ettiği için sitoplazmik mikrotübüllerin görülmesi açıkça göstermektedir. Her iki ırkın 48. saatteki canlılık yüzdeleri Şekil 4.8.6' da verildi.



Şekil 4.8.6 Kontrol ve ikili mutant ırkta ( $Mg^{2+}$  destekli -2M 75 ve  $Mg^{2+}$  desteksiz -2M 0) başlangıç anındaki (0), 24. ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri.



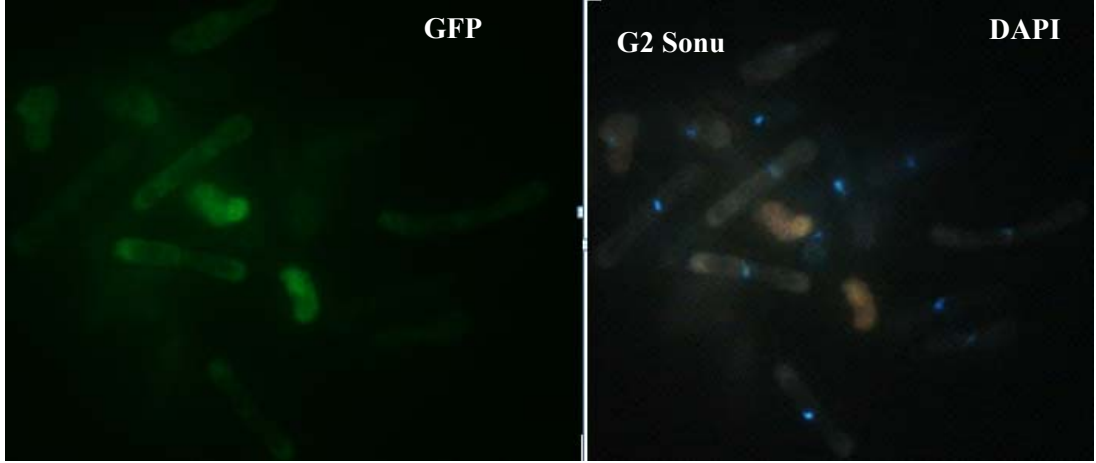
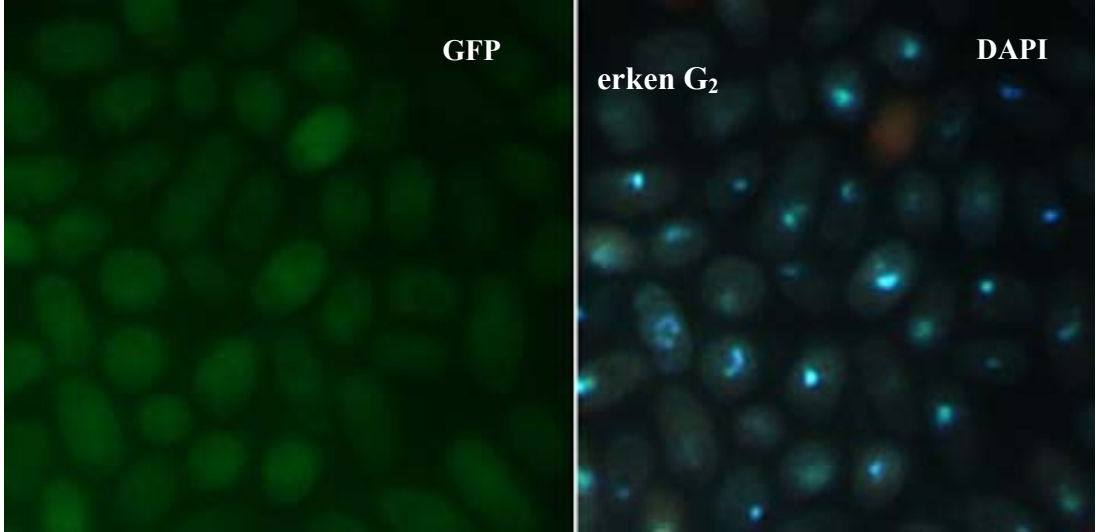
Şekil 4.8.7 Kontrol ve ikili mutant ırkta ( $Mg^{2+}$  destekli -2M 75 ve  $Mg^{2+}$  desteksiz -2M 0), seçici minimal besi ortamında hücre sayısındaki artışın incelenmesi.

**Tablo 4.8.1.** Kontrol ırkın seçici minimal ortamda ve ikili mutant ırkın  $Mg^{2+}$  destekli ve  $Mg^{2+}$  desteksiz seçici minimal ortamdaki generasyon sayıları

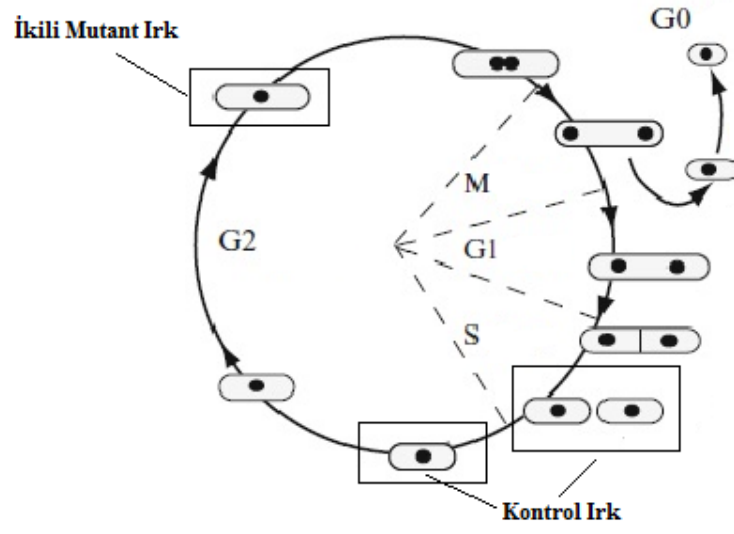
	Transformant Kontrol Irk (MML + 225 mg/l adenin, urasil)	Transformant İkili Mutant (MML + 225 mg/l adenin, urasil+ 75 mM $MgCl_2$ )	Transformant İkili Mutant (MML + 225 mg/l adenin, urasil)
Generasyon Sayısı	3.7	1.6	0.8

Tablo 4.8.1' de görüldüğü üzere, magnezyum transportu yapamayan ikili mutant ırk yaklaşık 2 kere bölünürken, kontrol ırk 4 kere bölünmektedir. Magnezyum desteksiz ortamda ise, ikili mutant yaklaşık 1 bölünme geçirmektedir. Bu da bize magnezyum desteğinin ikili mutantın üremesini %50 oranda iyileştirdiğini göstermektedir.

Kontrol ve ikili mutant ırka ait hücrelerde, magnezyumun mitotik mikrotübüllerin oluşumu üzerindeki etkisini anlamak üzere yaptığımız çalışmada, magnezyum transportu yapamayan ikili mutanta ait hücrelerin, kontrole kıyasla 2 kat daha az bölündüğü görüldü. Dolayısıyla, her iki ırkın logaritmik fazlarında yaptığımız incelemelerde, ikili mutant ırkın daha az sayıda mitotik mikrotübül oluşturduğu gözlemlendi. Bununla birlikte ikili mutanta ait hücrelerin, hücre döngüsünün hangi aşamasında tutuklandığını anlamak için, hücre bölünmesinin sona erdiği durağan fazda incelemeler yapıldı (Şekil 4.8.8). Hücreler fikse edilmeden, nukleus boyası (hoechst) kullanılarak floresan mikroskopunda, hem GFP hem de DAPI filtresi altında yaptığımız incelemeler, ikili mutanta ait hücrelerin uzamış olduğu ve tek nukleus içerdiği için mitoz öncesi G2 evresinde (G2 sonuna doğru), kontrol ırka ait hücrelerin ise, küçük olduğu ve tek nukleus içerdiğinden, mitozdan ve G1'den hemen sonraki S-G2 evresinde tutuklandığını düşündürmektedir (Şekil 4.8.9).

**İkili Mutant Irk****Kontrol Irk**

**Şekil 4.8.8** Durağan fazda kontrol ve ikili mutant ırka ait hücrelerin bulunduğu hücre döngüsü aşamaları (Büyütme oranı: 1000x)



### Haploid, Vegetatif Döngü

**Şekil 4.8.9** Durağan fazda kontrol ve ikili mutant ırkın, hücre bölünmesinin hangi aşamalarda bulunabileceğini gösteren şematik şekil [115].

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Magnezyum ( $Mg^{2+}$ ), memelilerde, mayalarda ve bakterilerde ençok bulunan divalent katyon olup, hücre bölünmesinde, protein ve DNA sentezinde, sinyal iletiminde ve hücre iskeletinin düzenlenmesi gibi birçok biyolojik süreçte yer alır. Özellikle fosfotransfer reaksiyonlarını içeren birçok metabolik reaksiyonun gerçekleşmesi  $Mg^{2+}$ 'ye bağlıdır.  $Mg^{2+}$  homeostasisinin bozulması; genomik kararlılık, RNA' nın işlenmesi, membran akışkanlığı ve membran kanallarının aktivitesi gibi birçok süreci etkiler [10].

Magnezyum eksikliğinin hücre düzeyinde etkileri; hücre sayısı, canlılık ve hücre büyümesinin göstergesi olan hücre çapı bakımından 24. ve 48. saatlerde değerlendirildi. Hücre sayısı bakımından yapılan incelemede,  $Mg^{2+}$  transport sistemi kaldırılmış ikili mutant ırkın ve kontrol ırkın, Mg içermeyen ve 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150 ve 200 mM konsantrasyonlarında  $MgCl_2$  içeren YEL besi ortamlarında üremeleri karşılaştırıldı. İkili mutant ırkın 24. saatte artan Mg konsantrasyonlarına bağlı olarak hücre sayısı artarken, 48. saatte en fazla üremenin 75 mM  $Mg^{2+}$  içeren ortamda olduğu görüldü. Bu nedenle ikili mutantın YEL besi ortamında optimum ürediği  $Mg^{2+}$  konsantrasyonu 75 mM olarak belirlendi. Bulgularımızı destekler şekilde, Graschopf ve ekibinin *S. cerevisiae'* nin  $Mg^{2+}$  transport sistemi kaldırılmış ırkla yaptıkları çalışmada, besi ortamına 50 mM ve üzerinde  $Mg^{2+}$  eklendiğinde mutant ırkın üreme gösterdiğini belirtmişlerdir [122]. Kontrol ırkta ise, 24. saatte artan  $Mg^{2+}$  konsantrasyonlarına bağlı olarak hücre sayısı artarken, 48. saatte besi ortamına 10 mM  $Mg^{2+}$  ilavesinin, hücre bölünmesini en fazla teşvik ettiği, 40 mM ve üstü  $Mg^{2+}$  konsantrasyonlarının hücre bölünmesi üzerinde toksik etki oluşturduğu görüldü. Magnezyumun hücre bölünmesi üzerindeki etkisini anlamak üzere, maya ve bazı memeli hücrelerinde yapılan önceki çalışmalarda da, besi ortamına fizyolojik koşullardan daha fazla oranda  $Mg^{2+}$  eklenmesinin, hücre bölünmesini teşvik ettiği gösterilmiştir [5,6]. Besi ortamında  $Mg^{2+}$  kısıtlaması yapıldığında ise, hücre tipine bağlı olarak değişmekle birlikte, hücre bölünmesinin yavaşladığı, hücre döngüsünde tutuklanmalar olduğu bildirilmiştir [7].

Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz diğer bir bulgu ise,  $Mg^{2+}$  transport sistemi kaldırılmış ikili mutant ırkın (18 saat) kontrol ırka (6 saat) kıyasla generasyon

süresinin 3 kat daha uzun oluşudur. Yapılan bir çalışmada  $Mg^{2+}$  kısıtlaması yapılmış S49 lenfoma hücrelerinde generasyon süresinin 3 kat daha uzamış olduğu gösterilmiş olup,  $Mg^{2+}$  kısıtlamasının generasyon süresi üzerindeki etkisinin hücre tipine göre değiştiği vurgulanmıştır [123]. Ayrıca *S. cerevisiae'* nin  $Mg^{2+}$  transport sistemi kaldırılmış ( $\Delta alr1$  ve  $\Delta alr1-alr2$ ) ırklarında yapılan çalışmada, hem  $Mg^{2+}$  destekli hem de  $Mg^{2+}$  desteksiz besiyerlerinde üremenin yabani ırka kıyasla daha yavaş olduğu ve generasyon süresinin daha uzun olduğu gösterilmiştir [124].

Magnezyum eksikliğinin canlılık üzerindeki etkileri 24. ve 48. saatlerde analiz edildi. Deneyin başlangıcında sıvı kültüre  $10^6$  hücre ekim yapmak amacıyla, 4 günlük katı besiyerinden toplanan hücrelerde, kontrol ırkın canlılığı % 87,  $Mg^{2+}$  destekli besi yerinde üretilen ikili mutant ırkın canlılığı ise %48 olarak bulundu. Yapılan birçok çalışmada, magnezyumun kısa süreli ve uzun süreli eksikliğinde canlılığın azaldığı belirtilmiştir [6, 125, 126 ]. Ancak IMR-90 insan fibroblast hücreleriyle yapılan bir çalışmada ise  $Mg^{2+}$  kısıtlaması yapıldığında hücre canlılığının değişmediği buna karşın senesensin hızlandığı bildirilmiştir [127]. Yaptığımız çalışmada, 24. saatte ikili mutant ırkta, besi ortamında artan  $Mg^{2+}$  ya bağlı olarak canlılığın arttığı, 48. saatte ise, 24. saate kıyasla canlılığın azaldığı ancak  $Mg^{2+}$  içermeyen ortama kıyasla  $Mg^{2+}$  içeren ortamlarda canlılık yüzdesinin daha fazla olduğu görüldü. Kontrol ırkta ise, 24. saatte 100 mM' ye kadar olan  $Mg^{2+}$  ilavesinin,  $Mg^{2+}$  ilave edilmemiş ortamlarla kıyaslandığında canlılık yüzdesini artırdığı, 48. saatte  $Mg^{2+}$  ilave edilmiş ortamlarda canlılık yüzdesinin daha az olduğu belirlendi. İki ırka ait veriler birlikte değerlendirildiğinde, 24. ve 48. saatte kontrol ırk için toksik olduğu görülen 100, 150 ve 200 mM  $Mg^{2+}$  ilaveli ortamların, ikili mutantın canlılık yüzdesini artırdığı görüldü. Bu da bize, ikili mutantın ortamdaki magnezyumu çok az alabildiğini göstermektedir.

Magnezyumun hücre büyümesinin bir göstergesi olan hücre çapı üzerindeki etkileri de 24. ve 48. saatlerde analiz edildi. Başlangıçta, ikili mutant ırkın hücre çapının ( $8.8 \mu m$ ), kontrol ırkın hücre çapından ( $7.6 \mu m$ ) daha fazla olduğu görüldü. Daha önceden yapılan çalışmalarda,  $Mg^{2+}$  nın hücre boyutunu artırarak, hücre döngüsünün ilerleyişini sağladığı belirtilmiştir [6, 128]. Ancak  $Mg^{2+}$  transportu yapamayan ikili mutant ırkın hücre çapının kontrol ırka kıyasla daha fazla oluşu, generasyon süresi daha uzun oluşu nedeniyle hücre döngüsünün kontrol ırka göre daha yavaş ilerleyişinden ya da hücre döngüsünün G2-M aşamasında tutuklanmasından kaynaklandığını düşündürdü. Kontrol

ırkta ise, hücre çapının 24.saatte, ortamların hepsinde artmış olduğu görüldü. 48. saatte, bütün ortamlarda hücre çapında azalma meydana geldiği ve en belirgin azalmanın 150 mM ve 200 mM  $Mg^{2+}$  içeren ortamlarda olduğu görüldü. Bu bize, 48.saatte hem hücre sayısının hem de canlılık yüzdesinin de 150 mM ve 200 mM  $Mg^{2+}$  içeren ortamlarda düşük oluşundan, bu  $Mg^{2+}$  konsantrasyonlarının kontrol ırktaki hücreler için toksik olduğunu gösterdi. İkili mutantın 24. ve 48. saatlerde belirtilen ortamlarda, hücre çapındaki artışların, hücre sayısı ve canlılık verileriyle karşılaştırıldığında anlamlı olmadığı görüldü. 200 mM  $Mg^{2+}$  destekli ortamda ise hücre çapının belirgin olarak azaldığı, hücre sayısının da bu ortamda azalmış olduğu görüldüğünden, besi ortamına 200 mM  $Mg^{2+}$  ilavesinin, ikili mutant için toksik etki oluşturduğunu, buna karşılık  $Mg^{2+}$  desteksiz ortamda, hücre döngüsü ilerleyemediği için hücre çapının azalmış olduğunu düşündürdü.

Maya hücrelerinde metallerin hücre üremesi üzerine etkisi, sıvı ve katı besi ortamlarında farklı olmaktadır. Bunun nedeni olarak da, metallerin sıvı besi ortamında daha homojen dağılırken, katı besi ortamında sıvıda olduğu kadar homojen dağılmayışı olarak gösterilmektedir [114]. Dolayısıyla hücreler sıvı besi ortamında, metallerin daha düşük konsantrasyonlarına duyarlılık gösterirken, katı besi ortamında daha yüksek konsantrasyonlarda duyarlılık oluşur. Plazma membranındaki magnezyum transportundan sorumlu iki kanal proteinini kodlayan genler bakımından delesyonlu ırkın (2M), zengin katı besi ortamında 200 mM  $Mg^{2+}$  desteğiyle optimum üreme gösterirken, sıvı ortamda 75 mM  $Mg^{2+}$  desteği optimum üreme için yeterli olmuştur.

Birçok hücreyel olayda yer alan magnezyumun homeostasisi bozulduğunda, hücre ve organ düzeyinde fonksiyonlar etkilenecek, alzheimer, hipertansyon, ateroskleroz, tip1-2 diyabet, iskemik kalp hastalığı, konjestif kalp yetmezliği gibi birçok hastalık oluşmaktadır [83, 84] Dolayısıyla  $Mg^{2+}$  transportunun moleküler mekanizmasının anlaşılması önemlidir. Buna yönelik yapılan çalışmalarda yapısı en çok aydınlatılmış olan bakterilerde, plazma membranındaki  $Mg^{2+}$  kanal proteini CorA'dır. CorA'nın  $Mg^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  ve  $Ni^{2+}$ 'nin transportundan sorumlu olduğu;  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ya da  $Fe^{3+}$ 'in transportundan sorumlu olmadığı bildirilmiştir [71, 72]. Bununla birlikte ökaryotik organizmalardan *Saccharomyces cerevisiae'* de, bakterilerdeki CorA' ya homolog Alr proteinlerinin,  $Mg^{2+}$  başta olmak üzere,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$  transportunu sağladığı bildirilmiştir [3]. Biz de çalışmamızda, *Saccharomyces cerevisiae'* deki Alr proteinlerine



dolayısıyla CorA  $Mg^{2+}$  transport sistemine homoloji gösteren, iki membran transport proteini kodlayan genler bakımından delesyonlu, ikili mutant ırkı kullanarak,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  ve  $Cd^{2+}$  metallerinin hücre içine girişini araştırdık. Sonuç olarak, ikili mutant ırkın,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  ve  $Cd^{2+}$  ye direnç gösterdiğini saptadık. Dolayısıyla bulgularımız bize,  $Mg^{2+}$  taşıma sistemi ortadan kaldırıldığında,  $Mg^{2+}$  taşıma sistemi ile alındığını düşündüğümüz  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  ve  $Cd^{2+}$  nin ortamdan alınmadığı için, bu katyonlara direnç geliştiğini düşündürdü. *Saccharomyces cerevisiae*' deki Alr proteinlerinin işlevlerine benzer şekilde *Schz. pombe*' de homologu olan bu proteinlerin, grubumuzun önceki çalışmasında da rapor edildiği gibi [4],  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ve  $Ni^{2+}$  ye ek olarak  $Cd^{2+}$  nin de transportundan sorumlu olabileceğini gösterdik.

$Mg^{2+}$  taşıma sistemine sahip kontrol ırkta da  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  metallerinin, etkilerine bakıldı. Magnezyumca desteklenmemiş katı besiyerinde  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  nin yüksek konsantrasyonlarına karşı kontrol ırkın duyarlı olduğu, ancak magnezyum destekli katı besiyerinde  $Co^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  nin yüksek konsantrasyonlarına karşı belirli oranda tolerans gösterdiği görüldü. Kontrol ırkın  $Mg^{2+}$  destekli besiyerinde  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  ye belli oranlarda tolerans göstermesinin, ortamdaki  $Mg^{2+}$  nin hücre içine girişi sırasında bu metallerle yarışarak, toksik etkiyi ortadan kaldırmasından ileri geldiğini söyleyebiliriz. ki bu bulguda dolaylı olarak bu metallerin  $Mg^{2+}$  transport sistemi ile taşındığını göstermektedir. Çünkü yapılan çalışmalarda  $Mg^{2+}$  nin;  $Al^{3+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  gibi birçok ağır metalin toksik etkisini ortadan kaldırdığı da bildirilmektedir [3, 116, 120].

Magnezyum, genomik kararlılığın sağlanmasında, nükleik asitlerdeki fosfat grupları ile kompleks oluşturarak yapısal kararlılığın sağlanmasında olduğu kadar, hücre iskeletinin ve mitotik aygıtın bir parçası olan mikrotübüllerin polimerizasyonunda ve depolimerizasyonunda da önemli role sahiptir. Mitotik aygıt ve dolayısıyla mitotik mikrotübüller, paclitaxel ve taxotere başta olmak üzere birçok kanser ilacının hedefi olmuştur [121]. Dolayısıyla hücre bölünmesi sürecinde, mitotik mikrotübüllerin polimerizasyon ve depolimerizasyonunun nasıl gerçekleştiğini, bu süreçte hangi faktörlerin rol aldığını aydınlatmaya yönelik çalışmalar büyük önem taşımaktadır.

Çalışmamızda, her iki ırkta, mikrotübülleri floresan mikroskopunda görünür hale getirmek amacıyla, GFP işaretli tubulin geni taşıyan plazmit ile transformasyon yapıldı. Mikrotübüllerin GTP ve  $Mg^{2+}$  varlığında polimerize olduğu önceki çalışmalardan [11]

bilindiği için,  $Mg^{2+}$  transportu yapamayan ikili mutant ırkta, mikrotübüllerin polimerize olması beklenmiyordu. Dolayısıyla yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz ilk bulgu,  $Mg^{2+}$  transportu yapamayan ikili mutant ırkta, mikrotübül polimerizasyonunun gerçekleşiyor olmasıdır. Ancak, gerek kontrol gerekse de ikili mutant ırkın logaritmik fazları karşılaştırmalı olarak incelendiğinde, ikili mutant ırkın sitoplazmik mikrotübüllerinin organizasyonunda bozukluklar olduğu görüldü. Her iki ırkın da logaritmik fazda olduğu 24. saate ait gözlemlerimizde, kontrol ırkta düzgün polimerize olmuş mikrotübül yapısı mevcutken, ikili mutant ırkta, kontrol ırkından farklı sayıda, yer yer dağınık ve kümeleşme gösteren, organizasyonu bozulmuş mikrotübül yapılarına rastlandı. Mikrotübül organizasyonu bozulmuş olan ikili mutant ırkın, kontrol ırka ait hücrelerle kıyaslandığında, hücre morfolojisinin de bozulmuş olduğu görüldü. Mikrotübüllerin hücrenin şeklinin sağlanması açısından önemi, ilk olarak 1967 yılında Tilney ve Porter tarafından *A. nucleofilum* hücrelerinde gösterilmiştir [129]. Bununla birlikte *Schz. pombe*' de morfolojisi bozulmuş olan hücrelerde yapılan çalışmalarda, hücrelerin bölünebildiği ancak sitoplazmik (interfaz) mikrotübüllerin organizasyonunun bozuk olduğu görüldükten sonra, mikrotübüllerin *Schz. pombe*' nin hücre şeklinin oluşmasındaki önemi anlaşılmıştır [130, 131, 132, 133]. Dolayısıyla çalışmamızda kullandığımız ikili mutanta ait morfolojisi bozulmuş hücreler, mikrotübül organizasyonunun bozulmuş olduğunun bir göstergesidir. Magnezyum desteksiz ortamdaki ikili mutanta ait hücrelerde ise,  $Mg^{2+}$  destekli ortamdaki hücrelerin 48. saatteki durumuna benzer şekilde bozulmuş ve daha kısa mikrotübül yapıları görüldü. 48. saate ait gözlemlerimizde ise, kontrol ırkta logaritmik faz sona erdiği için, mikrotübül yapıları görülmedi. Ancak ikili mutant ırkta generasyon süresi uzun olduğundan, 48. saatte logaritmik faz sona ermek üzeredir. Bu nedenle mikrotübül demet sayılarında belirgin bir azalma ve mikrotübüllerin depolimerize olduğunu gösteren daha kısa yapılar görüldü.

İkili mutant ırk,  $Mg^{2+}$  desteksiz ortamda neredeyse hiç bölünmemektedir,  $Mg^{2+}$  destekli ortamda bile ancak  $\sim 2$  bölünme geçirmektedir. Bu nedenle, ikili mutant ırkın yetiştirilmesinde besi ortamına, yüksek konsantrasyonlarda (75 mM) Mg eklenmektedir. İkili mutant ırk, bu besi ortamından sınırlı miktarda  $Mg^{2+}$  yi pasif olarak,  $Mg^{2+}$  iyon gradienti yönünde, iyon kanalları aracılığıyla almaktadır. Dolayısıyla ikili mutantın hücre içi serbest  $Mg^{2+}$  düzeyinin, kontrol ırktan ne kadar farklı olduğunu anlamak için, her iki ırkta da mag-fura 2 probu kullanılarak orantısal görüntüleme yapıldı. Mag-fura 2'

nin kalibrasyonu için daha önceden yapılan çalışmalardan yararlandı. Çalışmalardan birinde *Salmonella enterica*' da mag-fura 2 nin kalibrasyonu *in vivo* yapılırken [108], *Schz. pombe* ile yapılan çalışmada ise, probun kalibrasyonu *in vitro* olarak yapılmıştır. *In vitro* kalibrasyon için, mag-fura 2' nin membrandan geçebilme özelliğindeki yüksüz AM (asetoksimetil ester) formu yerine, yüklü formu 'mag-fura 2' kullanılmıştır [107]. Çalışmamızda, *in vivo* kalibrasyon denendi. Probu  $Mg^{2+}$  içermeyen ortamda verdiği floresan yoğunluğu ve farklı  $Mg^{2+}$  konsantrasyonları ile probun  $Mg^{2+}$  ile tamamen doygun hale geldiği andaki floresan yoğunluğu ölçüldü. Bu şekilde hem probun kalibrasyonu denenmiş olup, hem de 'Genel Kısımlar 2.4.2. Hücre İçi Serbest  $Mg^{2+}$ ' nin Hesaplanması' bölümünde belirtilen formüldeki  $R_{min}$  ve  $R_{max}$  değerlerinin elde edilmesi amaçlandı. Kalibrasyon sırasında  $R_{min}$  değerini elde etmek için ortamdan EDTA ile  $Mg^{2+}$ 'nin uzaklaştırılmasının etkili olmadığı görüldü. Daha önceden *Schz. pombe*' de mag-fura 2 ile yapılan çalışmada da benzer bulgular elde edilmiş olup, dış ortamdan Mg' nin uzaklaştırılmasının, hücre içi  $Mg^{2+}$  düzeyini etkilemediği belirtilmiş, bunun nedeni olarak *Schz. pombe*' de  $Mg^{2+}$  transportunun memeli hücrelerinden farklı mekanizmalarla gerçekleştiği ve  $Mg^{2+}$  transportunun sıkı bir kontrolü olduğu ileri sürülmüştür [107]. Çalışmamızda, mag-fura 2 AM probunun mevcut protokollerle *Schizosaccharomyces pombe*' de etkin bir şekilde yüklenmediği ve zamana bağlı olarak probun hücre dışına atıldığı görüldü. Ancak burada önemli olan probun orantısız olarak ne kadarının serbest  $Mg^{2+}$  ye bağlı olduğudur. Probu bu özelliği sayesinde, kontrol ve ikili mutant ırkta,  $Mg^{2+}$  için kesin bir miktar belirtilemezse de, hücre içi serbest  $Mg^{2+}$  nin bir göstergesi olan 'R' değerleri karşılaştırıldı. R değerlerinin analizi yapılırken, prob ile yüklenmemiş hücrelerden gelen floresan yoğunluğunu yani 'otofloresans' sinyallerini aşan, sinyaller değerlendirildi. İkili mutanta ait, gerek  $Mg^{2+}$  destekli besiyerindeki, gerekse de  $Mg^{2+}$  desteksiz besiyerindeki bir gecelik kültüre ait hücrelerde, R değerlerinin kontrol ırka ait hücrelerden düşük olduğunu görüldü. Bu şekilde ikili mutantın,  $Mg^{2+}$  destekli besi ortamında yetiştirilse dahi hücre içi serbest  $Mg^{2+}$  düzeyinin, kontrol ırktan daha düşük olduğu doğrulanmış oldu. Ancak her iki ırkta kantifikasyon yapılabilmesi için, probun hücre dışına atılması önlendikten sonra kalibrasyonunun yapılması gerekmektedir. Hücre içindeki esterazlar etkisi ile negatif yüklü hale gelen probun, hücrelerden dışarı çıkışını önlemek için, prob ile yükleme esnasında, ' probenecid ' ya da ' sulphinyprazone ' adı verilen organik anyon transport inhibitörlerinin kullanımı gerekmektedir [111]. Bu şekilde yükleme yapılarak, probun

hücre dışına pompalanmadığından emin olduktan sonra kalibrasyon aşamasına geçilmelidir.

Çalışmamızın esas amacı,  $Mg^{2+}$ 'nin mitotik mikrotübüllerin oluşumu üzerindeki etkisini göstermektir. Bu nedenle, mag-fura 2 probu aracılığıyla floresan olarak işaretlenmiş hücre içi serbest  $Mg^{2+}$  ve GFP işaretli mikrotübülleri eş zamanlı olarak, bölünme aşamasındaki hücrelerde göstermek üzere deney tasarlandı. Bu şekilde, mitotik mikrotübüller oluşmadan önce, oluşurken ve hücre bölünmesi sırasında depolimerize olurken, serbest  $Mg^{2+}$ 'nin hücre içi hareketinin izlenerek kantifikasyonunun yapılması hedeflendi. Ancak, mag-fura 2 ile yüklü hücrelerde GFP sinyali alınmasına rağmen, mikrotübül yapısı görülmedi. Bu bulgu bize, mikrotübüllerin mag-fura gibi kimyasallara karşı hassas olabileceğini düşündürdü. Buna bağlı olarak serbest  $Mg^{2+}$  ve mitotik mikrotübülleri birlikte görüntülemek için kullandığımız protokolün geliştirilmesi ya da farklı bir yöntem izlenmesi gerekliliği sonucu çıktı.

Çalışmamızda, serbest  $Mg^{2+}$  ve mitotik mikrotübülleri birlikte görüntülenemediği için,  $Mg^{2+}$  transportu yapamayan ikili mutant ırkta, mitotik mikrotübüllerin oluşup oluşmadığına bakıldı. İkili mutantın çoğalabilmesi için ortama yüksek konsantrasyonda  $Mg^{2+}$  eklendiğinde, ikili mutant dış ortamdan sınırlı olarak  $Mg^{2+}$  alabilmektedir. Dolayısıyla mikrotübüller ile yaptığımız çalışmada, ikili mutantta hem Mg destekli hem de  $Mg^{2+}$  desteksiz besi ortamında mikrotübül polimerizasyonu olup olmadığı araştırıldı. Kontrol ırk ve ikili mutant ırkın  $Mg^{2+}$  destekli ve  $Mg^{2+}$  desteksiz besi ortamlarında, hücrelerin logaritmik evrelerinde yaptığımız incelemede,  $Mg^{2+}$  destekli ortamdaki ikili mutant ırkta mitotik mikrotübül içeren hücrelerin yüzdesi % 4 iken, kontrol ırk logaritmik fazın sonlarında olmasına rağmen bu oranın % 17 olduğu görülmüştür.  $Mg^{2+}$  desteksiz ortamdaki ikili mutant ırka ait hücrelerde ise, mitotik mikrotübüle rastlanmamıştır.  $Mg^{2+}$  destekli ve  $Mg^{2+}$  desteksiz ortamdaki ikili mutanta ait hücrelerde sitoplazmik mikrotübüllerin görülmesine karşılık, mitotik mikrotübüllerin  $Mg^{2+}$  destekli ortamda dahi kontrol ırka kıyasla az görülmesi,  $Mg^{2+}$ 'nin mitotik mikrotübüllerin oluşumu üzerindeki etkisinin, sitoplazmik mikrotübüllerin oluşumu üzerine olan etkisinden daha fazla olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte araştırmamızın konusunu belirlerken ilham aldığımız çalışmada, hücre döngüsü süresince hücre içi  $Mg^{2+}$  konsantrasyonunun düştüğü, düşen  $Mg^{2+}$  konsantrasyonunun mitotik mikrotübül polimerizasyonunu sağladığı yönünde bir hipotez ileri sürülmüştür [6]. Ancak  $Mg^{2+}$

transportu yapamayan hücrelerde, sitoplazmik mikrotübüllerin varlığına rağmen mitotik mikrotübüllerin azlığı, mitotik mikrotübüllerin oluşabilmesi için daha fazla  $Mg^{2+}$  gerektiğini düşündürmektedir. Bu durumda hücre döngüsü süresince hücre içi serbest  $Mg^{2+}$ 'nin düşmesinin nedeni, mitotik mikrotübüllerin oluşması için kullanılıyor olmasından olabilir. Ancak bu hipotezi doğrulayabilmek için mag-fura 2 probunun *Schz. pombe*'de in vivo kalibrasyonu yapıldıktan sonra, hücre döngüsü süresince  $Mg^{2+}$ 'nin kantifikasyonunun yapılması gerekmektedir. Bununla birlikte yine aynı çalışmada, anafaz aşamasında kromozomların hücrenin kutuplarına yerleşmesi gerçekleştikten sonra, hücreye  $Mg^{2+}$  girişi olduğu ve mitotik mikrotübüllerin depolimerize olarak hücre bölünmesinin gerçekleştiği yönünde bir hipotez ileri sürülmüştür [6]. İlgili çalışmada hücreye  $Mg^{2+}$  girişi, divalent katyon iyonoforu A23187 ile  $Ca^{+2}$  içermeyen ortamda, hücre bölünmesinin sonuna doğru sinyal alınmasıyla test edilmiş ve mevcut sinyalin  $Mg^{2+}$ 'ye ait olabileceği düşünülmüştür. Çalışmanın yapıldığı 1980'li yıllarda, iyon formundaki  $Mg^{2+}$  ye özgün probalar mevcut olmadığı için hücre içi serbest  $Mg^{2+}$ 'nin hareketinin izlenmesi teknik açıdan mümkün değildir. Dolayısıyla, bu çalışmada hücre bölünmesinin sonuna doğru alınan sinyalin, gerçekten de  $Mg^{2+}$  ye ait olup olmadığı modern teknikler kullanılarak gösterilmelidir ve bu zamana kadar, böyle bir çalışma yapılmamıştır. Biz de yaptığımız çalışmada  $Mg^{2+}$ 'nin mitotik mikrotübüllerin oluşumu üzerine etkisini araştırmakla birlikte bu önemli hücresel olayı, serbest  $Mg^{2+}$  ya özgün olan mag-fura probunu kullanarak göstermeyi hedefledik. Yaptığımız deneylerde, probun yüklendiği G2-M aşamasındaki hücrelerde, hücre içi  $Mg^{2+}$  düzeyini gösteren R değerinde zamana bağlı artışlar ve bazı hücrelerde pikler yakaladık. Ancak, 340 ve 380 eksitasyon filtrelerinden alınan floresan yoğunluklarının zamana bağlı azalışından, probun hücre dışına pompalandığını, elde ettiğimiz R değerlerindeki zamana bağlı artışın 'drift' yani boya kaybından kaynaklı anlamsız bir artış olabileceğini düşündürdü. Bu nedenle deneyimizin, probun yükleme aşamasında anyon transport inhibitörü kullanarak tekrarlanması gerekmektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz diğer bir bulgu ise,  $Mg^{2+}$  desteksiz ortamdaki ikili mutant ırka ait hücrelerin büyük çoğunuluğunun, küçük ve tek nükleus içerdiği, buna bağlı olarak hücre döngüsünün S evresinde ya da erken G2 evresinde tutuklandığıdır. Tutuklanmanın hangi evrede olduğunun flow sitometri kullanılarak doğrulanması gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda,  $Mg^{2+}$  kısıtlanmış besi ortamında hücrelerin S

fazını geçemediği bildirilmiştir [10].  $Mg^{2+}$  destekli ortamdaki ikili mutant hücreleri ise, uzun ve tek nukleus içermektedir. Bu bize, besi ortamına  $Mg^{2+}$  ilavesi ile hücre içine pasif yolla giren  $Mg^{2+}$  nın hücrelerin S fazını geçmesini sağladığını ve G2 evresinin sonlarına kadar hücre döngüsünün devam ettiğini, ancak genomik materyalin ikiye ayrılmadığını göstermektedir. Bulgularımız,  $Mg^{2+}$  destekli ortamdaki ikili mutantta, mitotik mikrotübüllerin yüzde kontrol ırka göre daha az olduğu için genomik materyalin ayrılmadığı ve bunun da G2 evresinin sonlarında tutuklanmaya neden olduğunu düşündürmektedir.

Genomik kararlılığın sürdürülmesi açısından hücre döngüsünde kontrol noktaları bulunmaktadır. Bunlar; DNA hasarı olması, DNA replikasyonunun tamamlanması, mikrotübül oluşturan merkezlerin kutuplara yerleşmesi ve mikrotübüllerin oluşumu şeklindedir [117]. Bu önemli süreçlerin gerçekleşmesi halinde, hücre döngüsü ilerlemekte ya da durmaktadır. Dolayısıyla, çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular bize,  $Mg^{2+}$  destekli ortamdaki ikili mutantta G2 evresinin sonlarında meydana gelen tutuklanmanın, mikrotübüllerle ilgili kontrol noktasında gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bu hipotezimizin doğrulanması için, *Schz. pombe'* de mikrotübül oluşumu ile ilgili ' slp1 mad2, apc10, apc11, bub3, bub1, cut2 ve cut1 ' genlerinin anlatım bakımından ikili mutant ırkta incelenmesi gerekmektedir. Bununla birlikte, *S.cerevisiae*  $Mg^{2+}$  transport proteinlerinden ALR1' in *Schz. pombe'* deki homoloğu olan SPAC17A2.14' nin, mitotik mikrotübül oluşum merkezinin (MOM) membrana bağlı bileşenlerinden Sad1 ile etkileşimi yapılan bir çalışmada gösterilmiştir [112]. Sad1' in mitotik mikrotübüllerin oluşumu ve uzaması için gerekli olduğu bildirilmiştir [118]. Dolayısıyla  $Mg^{2+}$  transport proteinlerini kodlayan genlerin delesyonu, birçok hücrenel yolağı etkilemiş olabilir. Bu nedenle ikili mutant ırkta gen anlatım profillemesi yapılması, hem hipotezimizin doğrulanmasında hem de  $Mg^{2+}$  eksikliğinin, başka hangi hücrenel süreçleri etkilediğinin anlaşılması bakımından önem taşımaktadır.

Proje kapsamında yaptığımız çalışmada, magnezyumun hücre bölünmesi sırasında görülen mitotik mikrotübüllerin oluşumu üzerindeki etkisi araştırıldı. GFP işaretli mikrotübül anlatımı yapan hücreler,  $Mg^{2+}$  ye özgün floresan proba yüklendiğinde, GFP sinyali alınmasına rağmen, mikrotübül yapıları görülmedi. Bu nedenle,  $Mg^{2+}$  nın mitotik mikrotübüller üzerindeki etkisi,  $Mg^{2+}$  transportu yapamayan, hücre içi serbest  $Mg^{2+}$  düzeyi, kontrole göre düşük olduğu belirlenen, ikili mutant ırktan yararlanılarak

gösterildi. Bölünme evresinde,  $Mg^{2+}$  transportu yapamayan mutant hücrede, mitotik mikrotübül oluşumunun, kontrol ırka göre daha düşük olduğu görüldü. İkili mutant ırkta, sitoplazmik mikrotübüllerin anlatımının devam etmesine rağmen, mitotik mikrotübüllerin oluşamaması bize, mitotik mikrotübül oluşumunda, sitoplazmik mikrotübül oluşumu için gerekenden daha fazla  $Mg^{2+}$  ya ihtiyaç olduğunu düşündürdü [6]. Ayrıca çalışmamızın konusunu belirlemede ilham aldığımız çalışmadaki hipotezde, hücre döngüsü sürecinde, hücre içi düşen  $Mg^{2+}$  konsantrasyonunun, mitotik mikrotübüllerin oluşmasını sağladığı belirtilmişti. Ancak bulgularımız, mitotik mikrotübül oluşumunda daha fazla  $Mg^{2+}$  nın gerektiğini göstermektedir. Dolayısıyla hücre döngüsü sürecinde hücre içi  $Mg^{2+}$  nin azalma nedeni, mitotik mikrotübüllerin oluşması için kullanılması olabilir. Bununla birlikte  $Mg^{2+}$  transport sistemiyle alındığı düşünülen metallerle yapılan fizyolojik çalışmalarımız, *Schz. pombe*' de  $Mg^{2+}$  transport sisteminin aydınlatılması açısından önem taşımaktadır. Gelecekte,  $Mg^{2+}$  transport sistemi kaldırılmış ikili mutant ırkta, gen anlatım profillemesi çalışmalarının yapılması gerekli olup,  $Mg^{2+}$  eksikliğinin hangi hücresel yolları etkilediğinin gösterilmesi açısından yararlı olacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

1. ROMANI AM, SCARPA A.,(2000), Regulation of cellular magnesium, Front Biosci. 5:D720 D734.
2. S P HMIEL, M D SNAVELY, C G MILLER and M E MAGUIRE, (1986), Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: characterization of magnesium influx and cloning of a transport gene, J. Bacteriol. vol. 168 no. 3 1444-1450.
3. COLIN W. MACDIARMID and RICHARD C. GARDNER, (1998), Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* Magnesium Transport System Confers Resistance to Aluminum Ion, The Journal of Biological Chemistry, 273, 1727-1732.
4. AYSEGUL TOPAL SARIKAYA, GOKHAN AKMAN and GULER TEMIZKAN, (2006), Nickel resistance in fission yeast associated with the magnesium transport system, Molecular Biotechnology, Volume 32, Number 2, 139-145.
5. RUBIN H., (1975), Central role for magnesium in coordinate control of metabolism and growth in animal cells, Proc Natl Acad Sci USA. 72(9):3551-5.
6. WALKER GM, DUFFUS JH., (1980), Magnesium ions and the control of the cell cycle in yeast, J Cell Sci.42:329-56.
7. SGAMBATO A, WOLF FI, FARAGLIA B, CITTADINI A., (1999), Magnesium depletion causes growth inhibition, reduced expression of cyclin D1, and increased expression of P27Kip1 in normal but not in transformed mammary epithelial cells, J Cell Physiol. 180(2): 245-54.
8. BERNARDINI D, NASULEWIC A, MAZUR A, MAIER JA., (2005), Magnesium and microvascular endothelial cells: a role in inflammation and angiogenesis, Front Biosci.10:1177-82.
9. MAIER, J. A. M., NASULEWICZ-GOLDEMAN, A., SIMONACCI, M., BONINSEGNA, A., MAZUR, A. AND WOLF, F. I., (2007), Insights into the mechanisms involved in magnesium-dependent inhibition of primary tumor growth, Nutr. Cancer 59, 1–7.
10. FEDERICA I. WOLF AND VALENTINA TRAPANI, (2008), Cell (patho) physiology of magnesium, Clinical Science 114, 27–35.
11. WEISENBERG RC, Microtubule formation *in vitro* in solutions containing low calcium concentrations, (1972), Science.;177(54):1104-5.



12. PRESCOTT AR, COMERFORD JG, MAGRATH R, LAMB NJ, WARN RM., (1988), Effects of elevated intracellular magnesium on cytoskeletal integrity, *J Cell Sci.*;89 ( Pt 3):321-9.
13. ELIN RJ., (1988), Magnesium metabolism in health and disease, *Dis Mon.*; 34(4):161-218.
14. SIEGEL, H., (1992), Metal ions in biological systems. In: Siegel, A. (Ed.), *Compendium on Magnesium and its Role in Biology, Nutrition and Physiology*, vol. 29.
15. HUANG HW, LI D, COWAN JA., (1995), Biostructural chemistry of magnesium, regulation of mithramycin-DNA interactions by  $Mg^{2+}$  coordination, *Biochimie.*;77(9):729-38.
16. IŞIK Z.SOLAK GÖRMÜŞ, NEYHAN ERGENE, (2003), Magnezyumun klinik önemi, *Genel Tıp Derg.*; 12(2):69-75.
17. FEDERICA I. WOLF, ACHILLE CITTADINI, (2003), Chemistry and biochemistry of magnesium, *Molecular Aspects of Medicine* 24: 3–9.
18. WILLIAMS, R.J.P., (1993), Magnesium: an introduction to its biochemistry, In: Birch, N.J. (Ed.), *Magnesium and the Cell*. Academic Press, NY, pp. 15–30.
19. TEVELEV, A., COWAN, J.A., (1995), Metal substitution as a probe of the biological chemistry of magnesium ion, In: Cowan, J.A. (Ed.), *The Biological Chemistry of Magnesium*. VCH, pp. 53–84.
20. PORSCHKE, D., (1995), Modes and dynamics of  $Mg^{2+}$ -polynucleotide interactions, In: Cowan, J.A. (Ed.), *The Biological Chemistry of Magnesium*. VCH, pp. 85–110.
21. HARTWIG, A., (2001), Role of magnesium in genomic stability, *Mutation Res.* 475, 113–121.
22. BEESE, L.S., STEITZ, T.A., (1991), Structural basis for the 30–50 exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism, *EMBO J.* 10, 25.
23. LEROY, J., (1926), Necessite du magnesium pour la croissance de la souris, *Comptes Rendus de Seances de la Societe de Biologie* 94: 431–433.
24. LUSK, J.E.; WILLIAMS, R.J.P., AND KENNEDY, E.P., (1968), Magnesium and the growth of *Escherichia coli*, *Journal of Biological Chemistry* 243 (10): 2618–2624.

25. MARSCHNER, H. (1995), *Mineral Nutrition in Higher Plants*, San Diego: Academic Press.
26. VALBERG, L.S.; HOLT, J.M., PAULSON, E., AND SZIVEK, J., (1965), Spectrochemical Analysis of Sodium, Potassium, Calcium, Magnesium, Copper, and Zinc in Normal Human Erythrocytes, *Journal of Clinical Investigation* 44 (3): 379–389.
27. WALSER, M., (1967), Magnesium metabolism, *Ergebnisse der Physiologie Biologischen Chemie und Experimentellen Pharmakologie* 59: 185–296.
28. IYENGAR, G.V.; KOLLMER, W.E., and BOWEN, H.J.M., (1978), *The Elemental Composition of Human Tissues and Body Fluids*, Weinheim, New York: Verlag Chemie.
29. STELZER, R.; LEHMANN, H., KRAMMER, D., and LUTTGE, U. (1990), X-Ray microprobe analysis of vacuoles of spruce needle mesophyll, endodermis and transfusion parenchyma cells at different seasons of the year, *Botanica Acta* 103: 415–423.
30. SHAUL, O.; HILGEMANN, D.W., DE-ALMEIDA-ENGLER, J., VAN, M.M., INZE, D., and GALILI, G., (1999), Cloning and characterization of a novel  $Mg^{2+}/H^{+}$  exchanger, *EMBO Journal* 18 (14): 3973–3980.
31. BERKOWITZ, G.A.; WU, W., (1993), Magnesium, potassium flux and photosynthesis, *Magnesium Research* 6 (3): 257–265.
32. MCCARTHY J.T., KUMAR R., Divalent Cation Metabolism: Magnesium, En: Schrier RW. *Atlas of the disease of the kidney*. Volume 1 Chapter 4 [http://www.kidneyatlas.org./book1/adk1\\_04.pdf](http://www.kidneyatlas.org./book1/adk1_04.pdf)
33. ROMANI, A. M., MATTHEWS, V. D. and SCARPA, A., (2000), Parallel stimulation of glucose and  $Mg^{2+}$  accumulation by insulin in rat hearts and cardiac ventricular myocytes, *Circ. Res.* 86, 326–333.
34. BARBAGALLO, M. and DOMINGUEZ, L. J., (2007), Magnesium metabolism in type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome and insulin resistance, *Arch. Biochem. Biophys.* 458, 40–47.
35. ROMANI, A. M., (2007), Magnesium homeostasis in mammalian cells, *Front. Biosci.* 12, 308–331.
36. KUBOTA, T., SHINDO, Y., TOKUNO, K. ET AL., (2005), Mitochondria are intracellular magnesium stores: investigation by simultaneous fluorescent imaging in PC12 cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1744, 19–28.
37. KOLISEK, M., ZSURKA, G., SAMAJ, J., WEGHUBER, J., SCHWEYEN, R. J. AND SCHWEIGEL, M., (2003), Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic  $Mg^{2+}$  influx system in mitochondria, *EMBO J.* 22, 1235–1244.

38. ZSURKA, G., GREGAN, J. AND SCHWEYEN, R. J., (2001), The human mitochondrial Mrs2 protein functionally substitutes for its yeast homologue, a candidate magnesium transporter, *Genomics* 72, 158–168.
39. RUBIN, H., (2007), The logic of membrane, magnesium, mitosis (MMM) model for the regulation of animal cell proliferation, *Arch. Biochem. Biophys.* 458, 16–23.
40. TOYODA, M., KOJIMA, M. AND TAKEUCHI, T., (2000), Jumonji is a nuclear protein that participates in the negative regulation of cell growth, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274, 332–336.3.
41. PETERSEN, P. H., ZOU, K., HWANG, J. K., YAN, Y. N. AND ZHONG, W., (2002), Progenitor cell maintenance requires numb and numbl like during mouse neurogenesis, *Nature* 419, 929–934.
42. MAIER, J. A., BERNARDINI, D., RAYSSIGUIER, Y. and MAZUR, A., (2004), High concentrations of magnesium modulate vascular endothelial cell behaviour *in vitro*, *Biochim. Biophys. Acta* 1689, 6–12.
43. 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.
44. WOLF, F. I., FASANELLA, S., TEDESCO, B. et al., (2004), Regulation of magnesium content during proliferation of mammary epithelial cells (HC-11), *Front. Biosci.* 9, 2056–2062.
45. MAIER, J. A., MALPUECH-BRUGERE, C., ZIMOWSKA, W., RAYSSIGUIER, Y. AND MAZUR, A., (2004), Low magnesium promotes endothelial cell dysfunction: implications for atherosclerosis, inflammation and thrombosis, *Biochim. Biophys. Acta* 1689, 13–21.
46. COVACCI, V., BRUZZESE, N., SGAMBATO, A. et al., (1998), Magnesium restriction induces granulocytic differentiation in human leukemic HL-60 cells. *J. Cell. Biochem.* 70, 313–322.
47. FLEMMING, W., (1879), Beiträge zur Kenntnis der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen, *Arch. Mikroskop. Anat.* 18 :151-259; plates VII-IX.
48. SCHRADER, F., (1953), The movements of chromosomes in cell division, Columbia University Press, New York.
49. MAZIA, D., and K. DAN., (1952), The isolation and biochemical characterization of the mitotic apparatus of dividing cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 38 :826-838.
50. CHRISTIANE WIESE AND YIXIAN ZHENG, (2006), Microtubule nucleation: tubulin and beyond, *Journal of Cell Science* 119, 4143-4153, 23.

51. [http://209.68.138.57/lc/archive/biology/PublishingImages/c08\\_05.jpg](http://209.68.138.57/lc/archive/biology/PublishingImages/c08_05.jpg) [Ziyaret Tarihi: 6 Ekim 2011].
52. IAIN M.HAGAN The fission yeast microtubule cytoskeleton, (1998), *Journal of Cell Science*, 111, 1603-1612.
53. NABESHIMA K, KUROOKA H, TAKEUCHI M, KINOSHITA K, NAKASEKO Y, YANAGIDA M., (1995), p93dis1, which is required for sister chromatid separation, is a novel microtubule and spindle pole body-associating protein phosphorylated at the Cdc2 target sites, *Genes Dev.*; 9(13):1572-85.
54. DING DQ, CHIKASHIGE Y, HARAGUCHI T, HIRAOKA Y, (1998), Oscillatory nuclear movement in fission yeast meiotic prophase is driven by astral microtubules, as revealed by continuous observation of chromosomes and microtubules in living cells, *J Cell Sci.* 111 ( Pt 6): 701-12.
55. LEE, J. C. & TIMASHEFF, S. N., (1977), In vitro reconstitution of calf brain microtubules: effects of solution variables, *Biochemistry* 16, 1754—1764.
56. HUANG, A. B., LIN, C. M. & HAMEL, E., (1985), Differential effects of magnesium on tubulin-nucleotide interactions, *Biochim. Biophys. Acta* 832, 22-32.
57. CORREIA, J. J., BATY, L. T. & WILLIAMS, R. C. JR, (1987), Mg<sup>+</sup> dependence of guanine nucleotide binding to tubulin, *J. Biol.Chem.* 262, 17278-17284.
58. MEJILLANO, M. R. & HIMES, R. H., (1991), Binding of guanine nucleotides and Mg<sup>2+</sup> to tubulin with a nucleotide-depleted exchangeable site, *Arch. Biochem. Biophys.* 291, 356-362.
59. ABBOTT, BERNARD; D S FUKUDA, D E DORMAN, J L OCCOLOWITZ, M DEBONO, AND L FARHNER, (1979), Microbial transformation of A23187, a divalent cation ionophore antibiotic, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 16 (6): 808–812.
60. ROSENFELD, A., ZACKROFF, R. V. & WEISENBERG, R. C., (1976), Magnesium stimulation of calcium binding to tubulin and calcium induced depolymerization of microtubules, *FEBS Letters*, Amsterdam 65, 144-147.
61. FULLER, G. M., ELLISON, J. J., MCGILL, M., SORDAHL, L. A. & BRINKLEY, B. R., (1975), Studies on the inhibitory role of calcium in the regulation of microtubule assembly *in vitro* and *in vivo*, pp. 379-390. Amsterdam and Oxford: North-Holland.
62. ROBERT M. TOMBES AND GARY G. BORISY, (1989), Intracellular free calcium and mitosis in mammalian cells: anaphase onset is calcium modulated,

but is not triggered by a brief transient, *The Journal of Cell Biology*, Volume 109, 627-636.

63. BEYENBACH KW., (1990), Transport of magnesium across biological membranes, *Magnes Trace Elem*; 9:233-54.
64. FLATMAN PW. (1991), Mechanism of magnesium transport, *Annu Rev Physiol* 53: 259-71.
65. AGUS ZS, MORAD M., (1991), Modulation of cardiac ion channels by magnesium, *Annu Rev Physiol*; 53: 299-307.
66. TANER ÖZGÜRTAŞ, TÜRKER KUTLUAY, (2002), Metabolism of magnesium and its measurements, *T Klin Tıp Bilimleri*, 22:530-534.
67. YOSHIKI NISHIZAWA, HIROTOSHI MORII, AND JEAN DURLACH, (2007), *New perspectives in magnesium research nutrition and health*, Springer-Verlag London, ISBN-10: 1-84628-388-4.
68. GÜNTHER T, VORMANN J, AVERDUNK R. (1986), Characterization of furosemide-sensitive  $Mg^{2+}$  influx in yoshida ascites tumor cells, *FEBS Lett*, 197:297–300.
69. SCHWEIGEL M, MARTENS H., (2003), Anion-dependent  $Mg^{2+}$  influx and a role for a vacuolar  $H^+$ -ATPase in sheep ruminal epithelial cells, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 285: G45–G53.
70. PASCAL LAURANTA AND RHIAN M. TOUYZ, (2000), Physiological and pathophysiological role of magnesium in the cardiovascular system: implications in hypertension, *Journal of Hypertension* Vol 18 No 9.
71. PAPP KM, MAGUIRE ME. (2004), The CorA  $Mg^{2+}$  transporter does not transport  $Fe^{2+}$ , *J Bacteriol* 186: 7653–7658.
72. SNAVELY MD, FLORER JB, MILLER CG, MAGUIRE ME. (1989), Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*:  $^{28}Mg^{2+}$  transport by the CorA, MgtA, and MgtB systems, *J Bacteriol* 171: 4761–4766.
73. SCHINDL R, WEGHUBER J, ROMANIN C, SCHWEYEN RJ. (2007), Mrs2p forms a high conductance  $Mg^{2+}$  selective channel in mitochondria, *Biophys J*. 93: 3872–3883.
74. BUI DM, GREGAN J, JAROSCH E, RAGNINI A, SCHWEYEN RJ. (1999), The bacterial magnesium transporter CorA can functionally substitute for its putative homologue Mrs2p in the yeast inner mitochondrial membrane, *J Biol Chem* 274: 20438–20443.

75. SMITH RL, THOMPSON LJ, MAGUIRE ME. (1995), Cloning and characterization of *mgtE*, a putative new class of  $Mg^{2+}$  transporter from *Bacillus firmus* OF4, *J.Bacteriol* 177: 1233–1238.
76. TOWNSEND DE, ESENWINE AJ, GEORGE J, III, BROSS D, MAGUIRE ME, SMITH RL. (1995), Cloning of the *mgtE*  $Mg^{2+}$  transporter from *Providencia stuartii* and the distribution of *mgtE* in the eubacteria, *J Bacteriol* 177: 5350–5354.
77. ANDREA S. MOOMAW AND MICHAEL E. MAGUIRE, (2008), The unique nature of  $Mg^{2+}$  channels, *Physiology* 23: 275–285.
78. GREGAN J, KOLISEK M, SCHWEYEN RJ., (2001), Mitochondrial  $Mg^{2+}$  homeostasis is critical for group II intron splicing in vivo, *Genes Dev.*;15(17):2229-37.
79. TASHIRO M, KONISHI M, IWAMOTO T, SHIGEKAWA M, KURIHARA S., (2000), Transport of magnesium by two isoforms of the  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  exchanger expressed in CCL39 fibroblasts, *Plügers Arch*; 440:819–827.
80. CEFARATTI C, ROMANI A, SCARPA A., (1998), Characterization of two  $Mg^{2+}$  transporters in sealed plasma membrane vesicles from rat liver, *Am J Physiol* 275: C2995–C1008.
81. RUDE RK., (1993), Magnesium metabolism and deficiency, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*; 22(2) : 377-95.
82. SARIS NL, MERVAALA E, KARPPANNEN H, et al., (2000), Magnesium an update on physiological, clinical and analytical Aspect, *Clinica Chimica Acta* 294:1-26.
83. WALLACH J., (2000), Interpretation of diagnostic tests: a synopsis of laboratory medicine fifth edition, Little, Brown and Company; pg 49.
84. HENRY JB., (1996), Clinical diagnosis and management by laboratory methods, 19th ed. Philadelphia; W.B.Saunders Company, p 197-8.
85. ELIN RJ., (1991), Determination of serum magnesium concentration by clinical laboratories, *Magnes Trace Elem*; 10: 60-6.
86. SEILER H. G., (1990), Determination of magnesium in biological materials, *Metal ions in biological systems*, vol. 26, pp. 611-624.
87. HENRY RJ, CANNON DC, WINKELMAN JW., (1974), Clinical chemistry principles and techniques, ed 2, New York, Harper & Row Publishers, Inc.
88. HULANICKI A., (1993), Magnesium: chemical properties and methods of determination, *Clin Chem Enzym Commun*; 5: 135-42.

89. SARIS NL, MERVAALA E, KARPPANNEN H, et al., (2000), Magnesium an update on physiological, clinical and analytical Aspect. *Clinica Chimica Acta*; 294:1-26.
90. ROMANI AM, SCARPA A., (1992), Regulation of cell magnesium, *Arch Biochem Biophys*; 298: 1-12.
91. GEVEN WB, VOGELS MENTINK GM, WILLEMS JL, et al., (1991), P Nuclear magnetic resonance and zero-point titration compared for measuring free magnesium concentration in erythrocytes *Clin Chem*; 37: 2076-80.
92. MAGUIRE, MICHAEL E; COWAN, JAMES A, (2002), *BioMetals* Vol. 15, no. 3, pp. 203-210.
93. C. H. FRY, S. K. HALL, L. A. BLATTER AND J. A. S. MCGUIGAN, (1990), Analysis and presentation of intracellular measurements obtained with ion-selective microelectrodes, *Experimental Physiology*, 75, 187-198.
94. BLATTER, L. A. & MCGUIGAN, J. A. S., (1991), Intracellular pH regulation in ferret ventricular muscle. The role of Na-H exchange and the influence of metabolic substrates, *Circulation Research* 68, 150-161.
95. HAUGLAND RP, (2005), In: *The handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies*, 10th edn. *Molecular Probes*.
96. EUGENE; CSERNOCH L, BERNENGO JC, SZENTESI P, JACQUEMOND V, (1998), Measurements of intracellular  $Mg^{2+}$  concentration in mouse skeletal muscle fibers with the fluorescent indicator mag-indo-1, *Biophys J* 75:957-967.
97. GÜNTHER T, VORMANN J, KONSTANCZAK P, SCHAFFER A., (1994), Interactions of polyamines in the measurement of free magnesium concentration by mag-fura-2 and P-NMR, *Biochim Biophys Acta*; 1192:281-5.
98. RAJU, B., MURPHY, E., LEVY, L. & LONDON, R. E., (1989), Cytosolic free magnesium levels in ischemic rat heart, *Am. J. Physiol.* 256.
99. YOSHIO SUZUKI, HIROKAZU KOMATSU, TAKAFUMI IKEDA, NAOHIKO SAITO, SAWA ARAKI, DANIEL CITTERIO, HIDEAKI HISAMOTO, YOSHIICHIRO KITAMURA, TAKESHI KUBOTA, JUN NAKAGAWA, KOTARO OKA and KOJI SUZUKI, (2002), Design and synthesis of  $Mg^{2+}$  selective fluoroionophores based on coumarin derivative and application for the  $Mg^{2+}$  measurement in a living cell, *Anal. Chem* 74, 1423-14289.
100. TAKESHI KUBOTA, MS, YUTAKA SHINDO, BT, KENTARO TOKUNO, BT, HIROKAZU KOMATSU, MT, HIROTO OGAWA, YOSHIICHIRO KITAMURA, KOJI SUZUKI, KOTARO OKA, (2004), Investigation of intracellular magnesium mobilization pathways I Pc12 cells B simultaneous Mg-

Ca fluorescent imaging, Journal of the American College of Nutrition, Vol. 23, No. 6, 742S–744S.

101. GIOVANNA FARRUGGIA, STEFANO IOTTI, LUCA PRODI, MARCO MONTALTI, NELSI ZACCHERONI, PAUL B. SAVAGE, VALENTINA TRAPANI, PATRIZIO SALE, AND FEDERICA I. WOLF, (2006), 8-Hydroxyquinoline derivatives as fluorescent sensors for magnesium in living cells, J. Am. Chem. Soc., 128 (1), pp 344–350.
102. PROF. DR. MEHMET UĞUR, (2005), Fizyolojik sinyallerin floresan yöntemlerle izlenmesi, [http://www.ctf.edu.tr/farma/tfd/tfd2005\\_078\\_ugur.pdf](http://www.ctf.edu.tr/farma/tfd/tfd2005_078_ugur.pdf). [Ziyaret Tarihi: 12 Ocak 2011].
103. GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M. and TSIEN, R.Y., (1985), A new generation of  $\text{Ca}^{+2}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. 260, 3440–3450.
104. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp01290.pdf> [Ziyaret Tarihi: 5 Mayıs 2011].
105. MORENO, S., A. KLAR AND P. NURSE, (1991), Molecular genetic analysis of *Schizosaccharomyces pombe*, Methods Enzymol. 194:795–82.
106. <http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm?Format=50> [Ziyaret Tarihi: 6 Haziran 2011].
107. A. ZHANG, T. P.-O. CHENG, X. Y. WUC, B. T. ALTURA and B. M. ALTURA, (1997), Extracellular  $\text{Mg}^{2+}$  regulates intracellular  $\text{Mg}^{2+}$  and its subcellular compartmentation in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*, CMLS, Cell. mol. life sci. 53 69–72.
108. ELISABETH M FROSCHAUER, MARTIN KOLISEK, FRANK DIETERICH, MONIKA SCHWEIGEL, RUDOLF J SCHWEYEN, (2004), Fluorescence measurements of free  $[\text{Mg}^{2+}]$  by use of mag-fura 2 in *Salmonella enterica*, Fems Microbiology Letters 237 49–55.
109. BOYD, R.F., (1984), General Microbiology, Times Mirror/Mosby College Pub. St. Louis, ISBN 0801609003.
110. MOAT, A.G., (1979), Microbial Physiology, John Wiley and Sons, New York.
111. FRANCESCO DI VIRGILIO, CRISTINA FASOLATO and THOMAS H. STEINBERG, (1988), Inhibitors of membrane transport system for organic anions block fura-2 excretion from PC12 and N2A cells, Biochem. J. 256, 959–963.
112. F. MIKI, A. KURABAYASHI, Y. TANGE, K. OKAZAKI, M. SHIMANUKI and O. NIWA, (2004), Two-hybrid search for proteins that interact with Sad1 and



Kms1, two membrane-bound components of the spindle pole body in fission yeast, *Molecular Genetics and Genomics* Volume 270, Number 6, 449-461.

113. MATSUYAMA A, ARAI, YASHIRODA Y, SHIRAI, KAMATA A, SEKIDO S, KOBAYASHI Y, HASHIMOTO A, HAMAMOTO M, HIRAOKA Y, HORINOUCHE S, YOSHIDA M., (2006), ORFome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Nat Biotechnol.*; 24(7): 841-7.

114. KLÁRA CZAKÓ-VÉR, MARTIN BATIÈ, PETER RASPOR, MATHIAS SIPICZKI, MIKLÓS PESTI, (1999), Hexavalent chromium uptake by sensitive and tolerant mutants of *Schizosaccharomyces pombe*, *Fems Microbiology Letters*; Volume 178, Issue 1, pages 109–115.

115. JONATHAN WEISSMAN, CHRISTINE GUTHRIE and GERALD R. FINK, *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.

116. K. J. BLACKWELL, J. M. TOBIN and S. V. AVERY, (1998), Manganese toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: Dependence on intracellular and extracellular magnesium concentrations, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 49, Number 6, 751-757.

117. ANDREA MUSACCHIO AND KEVIN G.HARDWICK, (2002), The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Volume 3, 731.

118. HAGAN I., YANAGIDA M., (1995), The product of spindle formation gene *sad1+* associates with the fission yeast spindle pole body and is essential for viability, *J Cell Biol* 129:1033-1047.

119. NIELS GALJART, (2005), CLIPs and CLASPs and cellular dynamics, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 487-498.

120. VICTOR I. KARAMUSHKA, GEOFFREY M. GADD, (1994), Influence of copper on proton efflux from *Saccharomyces cerevisiae* and the protective effect of calcium and magnesium, *Fems Microbiology Letters* Volume 122, 33–38.

121. MARY ANN JORDAN and LESLIE WILSON, (2004), Microtubules as a target for anticancer drugs, *Nature reviews-Cancer* Volume 4 , 253-265.

122. GRASCHOPF A, STADLER JA, HOELLERER MK, EDER S, SIEGHARDT M, KOHLWEIN SD, SCHWEYEN RJ., (2001), The yeast plasma membrane protein Alr1 controls Mg<sup>2+</sup> homeostasis and is subject to Mg<sup>2+</sup>-dependent control of its synthesis and degradation, *J Biol Chem*, 276(19):16216-22

123. MAGUIRE, M.E., (1988), Manganese and cell proliferation, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 551, 201-217
124. DA COSTA BM, CORNISH K, KEASLING JD., (2007), Manipulation of intracellular magnesium levels in *Saccharomyces cerevisiae* with deletion of magnesium transporters, *Appl Microbiol Biotechnol.*; 77(2):411-25.
125. WOLF FI, TORSELLO A, FASANELLA S, CITTADINI A, (2003), Cell physiology of magnesium, *Mol Aspects Med* 24:11–26.
126. FERRE S, MAZUR A, MAIER JAM, (2007), Low magnesium induces senescent features in cultured human endothelial cells, *Magn Res* 20:66–71.
127. DAVID W. KILLILEA AND BRUCE N. AMES, (2008), Magnesium deficiency accelerates cellular senescence in cultured human fibroblasts, *PNAS* vol. 105 no. 15, 5768–5773.
128. WALKER, G.M., 1986, Magnesium and cell cycle control: an update, *Magnesium* 5, 9-23.
129. TILNEY, L.G., and K.R. PORTER, (1967), Studies on the microtubules in heliozoa, *J. Cell Biol.* 34:327–343
130. BEINHAEUER, J. D., HAGAN, I. M., HEGEMANN, J. H. AND FLEIG, U., (1997), Mal3, the fission yeast homolog of the human APC-interacting protein EB-1 is required for microtubule integrity and the maintenance of cell form, *J. Cell Biol.* 139, 717-728.
131. HIRATA, D., MASUDA, H., EDDISON, M. and TODA, T., (1998), Essential role of tubulin-folding cofactor D in microtubule assembly and its association with microtubules in fission yeast. *Embo J.* 17, 658-666.
132. MATA, J. and NURSE, P., (1997), tea1 and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast cell, *Cell* 89, 939-949.
133. VERDE, F., MATA, J. and NURSE, P., (1995), Fission yeast cell morphogenesis identification of new genes and analysis of their role during the cell-cycle, *J. Cell Biol.* 131, 1529-1538.

## ÖZGEÇMİŞ

24.07.1984 yılında Sivas/Gürün' de doğdum. İlk öğrenimi, Fikret Yüzatlı İlköğretim Okulu, orta öğrenimi Yayla İlköğretim Okulu ve lise öğrenimi Fatih Vatan Anadolu Lisesi' nde tamamladım. 2003 yılında başladığım İstanbul Ünivesitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2007 yılında mezun oldum. Aynı zamanda 2004 yılında başladığım İstanbul Ünivesitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Çift Anadal Programından 2008 yılında mezun oldum. 2009 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans eğitimime başladım ve devam etmekteyim.

### Bilimsel Etkinlikleri:

1. G. Uz, D. Özbilenler, G. Akman, A. Topal Sarıkaya, *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.



