

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SCHIZOSACCHAROMYCES POMBENİN

GENOM KİTAPLIĞININ KURULMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bedia GEMİCİ

36118

Biyoloji Anabilim Dalı

(Moleküler Biyoloji - Genetik Programı)

Danışman : Prof. Dr. Güler TEMİZKAN

TEMMUZ - 1995

ÖNSÖZ

Schizosaccharomyces pombe tek hücreli, basit yapılı bir ökaryot olması ve memeli hücrelerine oldukça benzerlik göstermesi nedeniyle ökaryotik organizmaların moleküler biyolojilerinin araştırılmasında uygun bir model organizma olarak giderek artan bir ilgiyle kullanılmaktadır.

Bu çalışmada *S.pombe* genlerinin yapı, anlatım ve regülasyonu konularıyla ilgilenen araştırmacıların baş vuracağı bir kaynak oluşturmak üzere bu maya türünün bir genom kitaplığı kuruldu.

Çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan ve yol gösteren Danışmanım Prof. Dr. Güler TEMİZKAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamın deneysel aşamasında tecrübelerinden yararlandığım ve yardımlarını gördüğüm Yard. Doç. Dr. Atok OLGUN'a, Yard. Doç. Dr. Ayşegül TOPAL'a, Biyolog Semian KARAER'e ve Araş. Gör. Kadir TURAN'a, yazım aşamasında ise Moleküler Biyoloji Anabilim Dalındaki çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Gülruh ALBAYRAK, Araş. Gör. Ercan ARICAN ve emeği geçen tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Ayrıca, destekleri ve gösterdikleri özveri ile çalışmamın son aşamasında bana kuvvet veren arkadaşım Araş. Gör. Gonca TOPOHAN ve kardeşim Zafer GEMİCİ'ye sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmaya İ.Ü. Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BIYOGEM) tarafından kısmi destek sağlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZ VE ABSTRACT.....	IV
I. GİRİŞ.....	1
II. MATERYAL VE METOD.....	4
II. 1. Organizmalar ve Vektörler.....	4
II. 2. Organizmaların Üretimi ve Saklanması.....	6
II. 3. Konak <i>E. coli</i> Irklarının Üreme Eğrilerinin Çıkarılması.....	10
II. 4. <i>S. pombe</i> 'den Genomik DNA İzolasyonu.....	10
II. 5. <i>E. coli</i> 'den Plazmid İzolasyonu.....	14
II. 6. Agaroz Jel Elektroforezi.....	16
II. 7. <i>S. pombe</i> DNA'sının Kısmi Kesimi İçin Uygun Doz Tespiti.....	18
II. 8. Klonlama İçin Uygun <i>S. pombe</i> Genomik DNA Fragmentlerinin Jelden Geri Alınması.....	18
II. 9. Plazmidlerin Restriksiyon Haritası Açısından Kontrolü.....	19
II. 10. Rekombinant DNA Moleküllerinin Oluşturulması.....	19
II. 10. 1. Plazmidlerin Doğrusal Biçime Getirilmesi.....	20
II. 10. 2. Plazmidlerin Defosforilasyonu.....	20
II. 10. 3. Ligasyon	21
II. 11. Transformasyon.....	21
II. 12. Transformantların Seçimi.....	23
II. 13. <i>S. pombe</i> 'nin Genom Kitaplığının Kurulması.....	25

III. BULGULAR.....	26
III. 1. <i>S. pombe</i> Genom DNA'sının İzolasyonu, Miktar Tayini ve Safılık Kontrolü.....	26
III. 2. Rekombinant DNA Moleküllerinin Oluşturulması.....	28
III. 3. Transformasyon.....	36
III. 4. Transformantların Seçimi.....	41
III. 5. <i>S. pombe</i> 'nin Genom Kitaplığının Kurulması.....	44
IV. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	45
V. ÖZET VE SUMMARY	48
VI. KAYNAKLAR	50
VII. ÖZGEÇMİŞ	54



ÖZ**SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE'NİN GENOM KİTAPLIĞININ KURULMASI**

Bu araştırmada, *Schizosaccharomyces pombe* maya türünün genomunun yaklaşık %95'ini kapsayan kitaplık, *Escherichia coli* HB101 ırkının transformasyonu yoluyla, bir *S.pombe-E.coli* mekik tipi vektörü olan pSAB1 'de kuruldu.

ABSTRACT**CONSTRUCTION OF GENOMIC LIBRARY OF *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE***

In this research, a library containing approximately 95% of the genome of *Schizosaccharomyces pombe* yeast strain was constructed in pSAB1, a *S.pombe-E.coli* shuttle vector, through transformation of *Escherichia coli* HB101 strain.

I. GİRİŞ

Bir organizmaya ait genomun hemen tümünün temsil edildiği klonlanmış DNA parçalarını kapsayan genom kitaplığı, genlerin yapısal ve işlevsel özelliklerinin araştırılmasına yönelik çalışmalara hazırlık amacıyla kurulmaktadır. Bu çalışmalar sırasında, konak organizma olarak, hücre organizasyonlarının basitliği, replikasyon sürelerinin kısa oluşu ve yüksek transformasyon etkinlikleri nedeniyle genellikle bakteriler kullanılmakta; genomik DNA parçalarının konak içine aktarılması ve burada klonlanmalarını sağlamak amacıyla da çeşitli tipteki vektörlerden (plazmid, bakteriyofaj, kozmid ve fazmid) yararlanılmaktadır.

Ökaryotik hücre yapısının araştırılmasında, *Saccharomyces cerevisiae*'nin yanısıra geniş çapta kullanılan bir maya türü *Schizosaccharomyces pombe*' dir. İlk olarak 1893 yılında Linder tarafından *Pombe* adlı bir Doğu Afrika darı birasından izole edilmiş olan, bu maya türünün genetiği ile ilgili ilk çalışmalar 1950'li yılların başında Leupold tarafından başlatılmıştır (GUTZ ve ark., 1974). Haploid durumda 3 kromozoma sahip olan (KOHLI ve ark., 1977) *S.pombe*'nin mayoz bölünme kusurlu mutant ırkları kullanılarak yapılan çaprazlamalardan elde edilen stabil diploid hücreler, izole edilen karakterlerin dominant/resesif özelliklerinin test edilmesine olanak vererek, bu maya türünün genetik çalışmalarına hız kazandırmıştır (MUNZ ve ark., 1989).

S.pombe, basit hücre ve genom yapısına sahip olmasının yanında, hücre çevriminin G1, S, G2 ve mitoz fazlarından oluşması (RUSSELL ve NURSE, 1986), sentromerlerindeki 40-100kb boyutundaki tekrarlanan dizilerin varlığı (STEINER ve ark., 1993), intron içeren gen sayısının fazla olması ve rRNA genlerinin organizasyonu (SINGER ve BERG, 1991) gibi özellikleri açısından, *S.cerevisiae*'den daha çok memelilere benzerlik göstermesi nedeniyle, günümüzde ökaryotik organizmaların araştırılmasında tercih edilen bir model organizmadır.

Saccharomyces cerevisiae transformasyonunun başarılabilmesiyle (HINNEN ve ark., 1978), mayalarda rekombinant DNA tekniklerinin kullanımına hız kazandırılmıştır. *S.cerevisiae*'de izole edilen bir çok genin, *S.pombe* mutantlarıyla komplementer olması (MUNZ ve ark., 1989). sayesinde, *S.cerevisiae* için geliştirilen vektörler bazı değişikliklerle, *S.pombe*'de kullanılabilir.

S.pombe'de transformasyon ilk kez, BEACH ve NURSE (1981) tarafından *S.cerevisiae*'nin 2µm plazmidinin replikasyon orijinini ve LEU2 işaret genini içeren pDB248 *S.pombe-E.coli* mekik tipi klonlama vektörü kullanılarak gösterilmiştir.

Daha sonraları *S.pombe*'de, genlerin yapı ve regülasyonu gibi konularda araştırmalar yapılabilmesi için bu amaca uygun klonlama ve ekspresyon vektörleri geliştirilmiştir (RUSSELL, 1989).

Klonlama vektörlerinden olan ve *S.cerevisiae*'nin 2µm plazmidinin replikasyon orijini ile işaret geni olarak LEU2 genini taşıyan YEp (Yeast Episomal Plasmids) vektörlerinden bazıları;

YEp13 (BROACH ve ark., 1979), pDB248 (BEACH ve NURSE, 1981; BEACH ve ark., 1982), pDB 262, pWH4, pWH5 (WRIGHT ve ark., 1986)'tir.

S.pombe'nin ars (autonomous replication sequence) dizisini taşıyan YRp (Yeast Replicating Plasmids) vektörlerine ise; pFL20 (LOSSON ve LACROUTE, 1983), pUR18 ve pUR19 (BARBET ve ark., 1992), pSP1 ve pSP2 (COTTAREL ve ark., 1993) örnek olarak verilebilir. Bu vektörlerin işaret genleri; pSP1'de *S.cerevisiae*'nin LEU2 geni, pSP2 ve pFL20'de URA3 geni, pUR18 ve pUR19'da ise *S.pombe*'nin URA4 genidir. Ayrıca, pFL20'de, plazmidin stabilitesini arttıran stb (stable) elementi de bulunur.

Bu çalışmada *S.pombe-E.coli* mekik tipi vektörlerinden YEp grubuna giren pSAB1 ve YRp grubundan pFL20 kullanılarak, *S.pombe* genom kitaplığının kurulması amaçlandı.

II. MATERYAL VE METOD

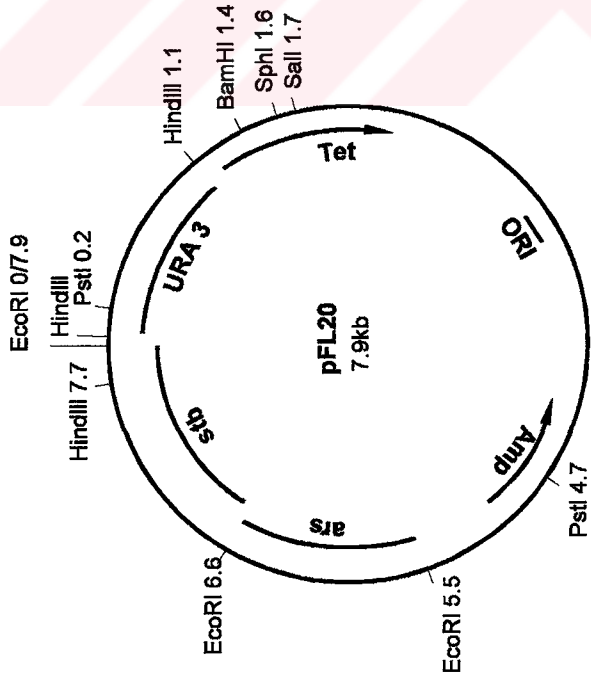
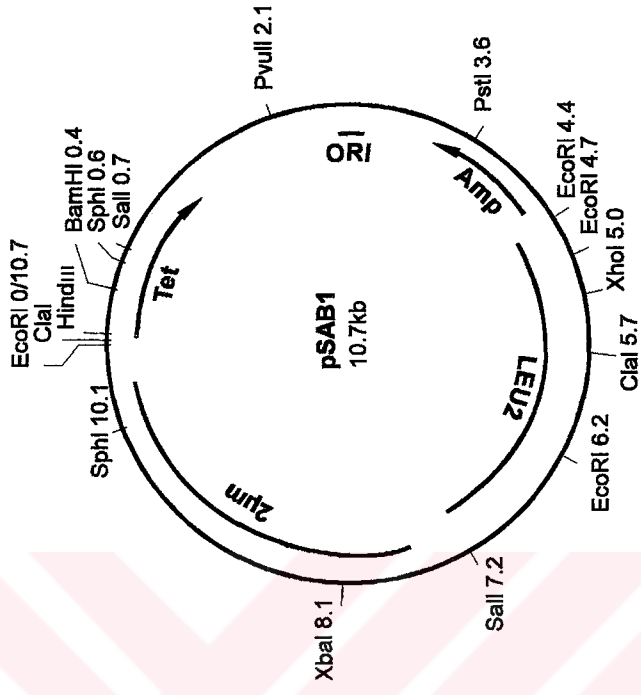
II.1. Organizmalar ve Vektörler

Schizosaccharomyces pombe Linder str Liquifaciens (Osterwalder)'in genom kitaplığı kurulmasında 972h⁻ yabancı ırkı kullanıldı. Klonlama, konak olarak *Escherichia coli*'nin HB101, DH5 α ve BJ5183 ırklarında gerçekleştirildi (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *Escherichia coli* ırklarının genotipik özellikleri

İrklar	Genotip	Kaynak
HB101	pro leu thi lacY his20 (hsd S _B ⁻) endA recA rpsL20 (str ^r) ara-14 galK2 xly-5 mtl-1 subE44	SAMBROOK ve ark. (1989)
DH5 α	subE44 Δ lacU169 (Φ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	SAMBROOK ve ark. (1989)
BJ5183	F ⁻ recBC sbcB endo-1 gal met str thi bio hsd	LOSSON ve LACROUTE (1983)

Gen kitaplığının kurulmasında, *E.coli* ve *S.pombe* hücrelerinde replikasyon yapabilen iki mekik tipi vektör denendi. *S.pombe*'ye ait ars (autonomous replication sequence) ve stb (stable) elementlerini içeren pFL20 ile *Saccharomyces cerevisiae*'deki 2 μ m plazmidin replikasyon orijinini içeren pSAB1 (Tablo 2, Şekil 1).



Şekil 1. pSAB1 ve pFL20 plazmid vektörlerinin restriksiyon haritaları

Tablo 2. Çalışmada kullanılan plazmidlerin özellikleri

Plazmid	Bakteri işaret geni	<i>S.cerevisiae</i> işaret geni	Özellikleri	Kaynak
pSAB1 (pDB248 türevi)	Amp ^r , Tet ^r	LEU2	2 µm plazmid	BEACH ve NURSE (1981)
pFL20	Amp ^r , Tet ^r	URA3	<i>S.pombe</i> ars ⁺ , stb	LOSSON ve LACROUTE (1983)

S.pombe ve *E.coli* ırkları ile pSAB1 ve pFL20 plazmid vektörleri İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonundan sağlandı.

II. 2. Organizmaların Üretimi ve Saklanması

Silika jel içinde +4°C'de uzun süreli olarak saklanan *S.pombe* 972h⁻ yabancı ırkının stoğundan alınan örnek, maya ekstreli katı besi ortamında (YEA) (Tablo 3), 30°C'de 2 gün süre ile üretildi. Kültürden öze ile alınan örnekler YEA besi ortamına azaltma yöntemi ile ekildi. Üreyen kolonilerden herhangi biri minimal sıvı besi ortamında (MML) (Tablo 3) 30°C'de, 150 devir/dakika, 1 gece üretilerek prototrofluk kontrolü yapıldıktan sonra kullanılmak üzere seçildi. *S.pombe* 972h⁻

yabani ırkının, 30°C'de, 2 gün eğri YEA besi ortamında üretilerek elde edilen aylık alt kültürleri, +4°C'de saklandı.

Tablo 3. *S.pombe*'nin üretiminde kullanılan besi ortamları.

(*: g/l, **: ml/l) (Stok A₂, 3 a, ve 3 b'nin içerikleri Tablo 4'de verildi.)

Besi ortamı	İçerik	Miktar
Maya ekstreli katı besi ortamı (YEA)	* Maya ekstresi (Yeast extract, Difco)	5
	* Glukoz (Merck)	30
	* Agar (Difco)	20
Maya ekstreli sıvı besi ortamı(YEL)	* Maya ekstresi	5
	* Glukoz	30
Minimal sıvı besi ortamı (MML)	**Stok A ₂	100
	**Stok 3 a	1
	**Stok 3 b	1
	* Glukoz	10
	* Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	1

Tablo 4. MML besi ortamında kullanılan stok çözeltiler.

(* mg/l, ** ml/l, *** l)

Stok Adı	İçerik	Miktar
A₁	* H ₃ BO ₄	5.4
	* CuSO ₄ .5H ₂ O	0.4
	* KCl	1
	* FeCl ₃ .6H ₃ O	2
	* MnSO ₄ .4H ₂ O	5.3
	* Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1.95
	* ZnSO ₄ .7H ₂ O	4.0
A₂	* KH ₂ PO ₄	100
	* MgSO ₄ .7H ₂ O	50
	* NaCl	10
	* CaCl ₂ .6H ₂ O	15
	* (NH ₄) ₂ SO ₄	500
	** Stok A ₁	0.1
3a	*Kalsiyum pantotenat	10
	* Nikotinik asit	100
	* Meso-inositol	100
3b	* Biotin	100
	*** %50 Etil alkol	1

%50 gliserin içinde -20°C'de saklanan *E.coli* ırklarına ait stoklardan alınan örnekler, Luria Broth Agar (LBA) besi ortamında (Tablo 5) tek koloni üretmek amacıyla 37°C'de, 1 gece bırakıldı. Kolonilerden alınan örnekler, her bir ırkın ampisiline ve tetrasikline duyarlılığını kontrol etmek amacıyla, bir ampisilin ilaveli bir de ampisilin ve tetrasiklin ilaveli LBA besi ortamlarına (Tablo 5) aktarıldı ve üreme durumları karşılaştırmalı olarak izlendi.

Tablo 5. *E.coli* ırklarının üretiminde kullanılan besi ortamları.

(*: g/l, **: ml/l)

İçerik	LB	LBA	LBA+Amp	LBA+Amp +Tet
* Bacto tryptone (Difco)	10	10	10	10
* Bacto Yeast Extract (Difco)	5	5	5	5
* Sodyum klorür (NaCl, Merck)	10	10	10	10
* Bacto Agar (Difco)	-	15	15	15
** Ampisilin (50 mg/ml su, Sigma)	-	-	1	1
** Tetrasiklin (10 mg/ml %50 etil alkol, Sigma)	-	-	-	1

Tüm besi ortamları; destile su içinde hazırlandı ve 120°C'de, 1 atmosfer basınç altında, 20 dakika tutularak, besi ortamlarına eklenen antibiyotik çözeltileri ise por çapı 0.22 µm olan filtreler (Millipore, millex-GS) kullanılarak steril edildi.

II. 3. Konak *E. coli* Irklarının Üreme Eğrilerinin Çıkarılması

E. coli ırklarının 5 ml LB (Tablo 5) içinde, 37°C'de, 150 devir/dakika, 1 gece üretilerek elde edilen doymuş kültürlerinin 0.5 ml'si, 100 ml LB besi ortamlarına ekildi. 37°C'de, 190 devir/dakika koşullarındaki üreme esnasında her 20 dakikada bir 600 nm dalga boyunda okunan absorbans değerleri spektrofotometre (Schimadzu UV-160) de fotometrik olarak ölçüldü. Elde edilen bu değerler, $1OD_{600} \cong 0.8 \times 10^9$ hücre/ml eşitliği (BROWN, 1990) dikkate alınarak, hücre sayısı/ml'ye çevirildi ve her bir ırkın zamana bağlı olarak hücre sayısı/ml'deki değişimlerini gösteren üreme grafikleri çizildi.

II. 4. *S. pombe*'den Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonunda (WRIGHT ve ark., 1986)'nın uyguladığı yöntem değiştirilerek izlendi.

S. pombe 972h⁻ yabancı ırkı 50 ml YEL besi ortamında (Tablo 4) 30°C'de, 120 devir/dakika, 1 gece üretildi. Hücre sayısı Malassez

tipi sayma lamı kullanılarak hesaplanan kültürden, 500 ml MML (Tablo 4), 5×10^5 hücre/ml olacak şekilde ekim yapıldı ve 30°C'de, 120 devir/dakika, 1 gece üretildi. Bu süre sonunda hücreler 16°C'de, 5000 devir/dakika, 8 dakika santrifüjlenerek (Hereaus, HFA 14.290 rotor) toplandı. 20 ml 20mM sitrat/fosfat tamponu (pH 5.6) eklenerek elde edilen süspansiyonun ml'sindeki hücre sayısı saptandı ve aynı koşullarda santrifüjlenerek hücreler toplandı. Her 10^9 hücre için 2 ml Solusyon A (Tablo 6) eklenip 30°C'de, 45-60 dakika, hücre çeperinin kısmen ya da tamamen parçalanması için, inkübasyona bırakıldı. Işık mikroskopunda hücrelerin yaklaşık %90'ının sferoblast haline dönüştüğü gözlemlendiğinde 16°C'de, 3000 devir/dakika, 10 dakika santrifüjlenerek toplanan her 10^9 hücre 0.5 ml Solusyon B (Tablo 6) içinde süspanse edilip 65°C'de, 15 dakika tutularak liziz meydana getirildi. Proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla, liziz ortamı üzerine yine 10^9 hücre için 0.5 ml Solusyon C (Tablo 6) eklenip 37°C'de, 90 dakika tutuldu. Hücresel kalıntılar 16°C'de, 3000 devir/dakika, 10 dakika santrifüjleme yapılarak uzaklaştırıldı.

Üst sıvıda kalan genomik DNA, sezyum klorid (CsCl) yoğunluk gradienti santrifüjlemesi ile saflaştırıldı. Bu amaçla, DNA solusyonu üzerine 1.05 g/ml final konsantrasyonda CsCl (Sigma) ve 0.5 mg/ml final konsantrasyonda etidyum bromid (EtBr) (Sigma) eklenerek 20°C'de, 50000 devir/dakika, 6 saat santrifüjlendi (Sorval OTD 75 B; T865 vertikal rotor).

DNA bandı, ultraviyole (UV) ışık altında steril bir enjektörle alındı ve eşit hacim izoamilalkol ekstraksiyonu ile EtBr'den arındırıldı.

DNA süspansiyonu üzerine 4 hacim 300mM sodyum klorür (NaCl) (Sigma) ve 2 hacim saf etil alkol (Merck) eklenerek -20°C'de, 1 gece bırakıldı. +4°C'de, 14000 devir/dakika, 15 dakika santrifüjlenerek çöktürülen DNA, 65°C'de, yaklaşık 1 saat kurutulduktan sonra Tris-EDTA (TE) tamponu (Tablo 6) içinde 60°C'de, 10 dakika tutularak çözündürüldü.

DNA miktarının spektrofotometrik tayini (Schimadzu UV-160) 260 ve 280 nm dalga boylarında alınan ölçümlerle yapıldı.

Çift iplikli DNA molekülünün konsantrasyonu, 1 OD'nin 50 µg DNA'ya karşılık geldiği kabul edilerek, aşağıda verilen formüle göre hesaplandı:

$$\text{DNA Konsantrasyonu} = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Sulandırım Oranı}$$

DNA molekülünün saflığı, 260 nm dalga boyunda okunan absorbans değerinin 280 nm dalga boyunda okunan absorbans değerine oranından ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$) hesaplandı (SAMBROOK ve ark., 1989). Konsantrasyonu bilinen saf DNA çözeltileri +4°C'de saklandı.

Tablo 6. Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon ve Solusyonlar

	İçerik	Final konsantrasyon
TE	Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) (pH 8.0)	1mM
	Tris[hydroxymethyl]aminomethane (Trisma Base, Sigma) (pH 8.0)	10mM
Solusyon A	Fosfat/Sitrat Tamponu (pH 5.6)	20mM
	Sorbitol (Merck)	1.2M
	Novozym (NovoSP234,NovoBioLabs)	8 mg
Solusyon B	EDTA (pH 8.0)	50mM
	Trisma Base (pH 8.5)	20mM
	Sodyum Dodesil Sülfat (SDS, Sigma)	%1
Solusyon C	EDTA (pH 8.0)	50mM
	Trisma Base (pH 8.5)	20mM
	Proteinaz K (Sigma)	50 µg/ml

II. 5. *E. coli*'den Plazmid İzolasyonu

Klonlamada vektör olarak kullanılan pSAB1 ve pFL20 plazmidleri (Tablo 2, Şekil 1) içinde buldukları *E.coli* HB101 ırklarından (Tablo 1) izole edildi (BIRNBOIM ve DOLY,1979).

Plazmid taşıyan *E.coli* ırkı, 1 litre ampisilin ve tetrasiklin içeren LB besi ortamında (Tablo 5) 37°C'de, 150 devir/dakika, 1 gece üretildi. +4°C'de, 5 dakika santrifürlenerek toplanan hücreler 5 mg/ml final konsantrasyonda lizozim (Sigma) içeren 25 ml liziz tamponunda (Tablo 7) süspansiyon edildi ve 30 dakika buz içerisinde bırakılarak hücre çeperlerinin kısmen parçalanması sağlandı. Üzerine eklenen 50 ml alkali SDS (Tablo 7) ile hücrelerin lizizi ve kromozomal DNA'nın denatürasyonu gerçekleştirildi. Kromozomal DNA ve diğer makromoleküllerin ortamdan uzaklaştırılması amacıyla, 37.5 ml 3M sodyum asetat (NaAc) pH 4.8 (Sigma) eklenip 60 dakika buz içerisinde bekletildikten sonra, +4°C'de 10 dakika 15000 devir/dakika santrifüleme yapıldı. Üst sıvıda kalan plazmid DNA'sı, 0.6 hacim izopropanol eklenip, oda ısısında, 10 dakika 10000 devir/dakika santrifürlenerek çöktürüldü.

10 ml TE tamponu (Tablo 6) içinde çözündürülen plazmid çökeltisi fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ekstraksiyonu ile saflaştırıldı: DNA çözeltisi üzerine 0.1 hacim 1M Trisma Base (pH 8.0), 0.2 hacim fenol:kloroform:izoamilalkol eklenip, +4°C'de, 15000 devir/dakika, 10 dakika santrifüj edildi ve üst faz alındı. Ekstraksiyon işlemi 0.2 hacim fenol:kloroform:izoamilalkol ve

0.2 hacim kloroform:izoamilalkol (24:1) kullanılarak tekrarlandı. Üst fazda bulunan plazmid DNA'sı, 0.1 hacim 10M amonyum asetat (NH₄Ac) (Sigma) eklendikten sonra 20°C'de, 10 dakika 15000 devir/dakika santrifüjlenerek çöktüldü ve 6 ml TE tamponunda çözündürüldü.

Plazmid DNA'sı, *S. pombe* genomik DNA izolasyonunda olduğu gibi (Bkz.II.4.), CsCl/EtBr yoğunluk gradienti santrifüjlemesi ile saflaştırıldı. Oluşan DNA bandı steril bir enjektörle alındı ve EtBr eşit hacim izoamilalkolle ekstre edilerek uzaklaştırıldı. 2 hacim 0.5M etil alkol içinde hazırlanmış amonyum asetat (NH₄Ac/EtOH) (Sigma) eklenip oda ısısında, 30 dakika bekletildikten sonra +4°C'de, 15000 devir/dakika, 10 dakika santrifüjlenerek DNA çöktürüldü. Plazmid DNA'sı, 0.4 ml TE tamponunda çözündürüldü ve üzerine 2 hacim 0.5M NH₄Ac/ EtOH ekleyerek +4°C'de, 15 dakika, 20000 devir/dakika santrifüj edildi. DNA, TE tamponu içinde çözündürülmesinden sonra spektrofotometrede konsantrasyonu ve saflık derecesi saptandı. DNA çözeltisi +4°C'de saklandı.

Tablo 7. Plazmid izolasyonunda kullanılan solusyonlar.

	İçerik	Konsantrasyon
Liziz Tamponu	EDTA, pH 8.0	10mM
	Glukoz	50mM
	Tris-HCl, pH 8.0	25mM
Alkali SDS	Sodyum dodesil sulfat (SDS,Sigma)	%1
	Sodyum hidroksit (NaOH,Sigma)	0.2N

II. 6. Agaroz Jel Elektroforezi

S.pombe genomik DNA'sı ve plazmid DNA'ları ile bu DNA'ların restriksiyon enzimleriyle kesim ürünleri agaroz jel elektroforezinde analiz edildi. Ayrıca, 2-10 kb'lık *S.pombe* genomik DNA fragmentlerinin diğer fragmentlerden ayrılmasında da kullanıldı.

Çalışmalarda kullanılan agaroz jel, % 0.8 konsantrasyonda olacak şekilde TBE tamponu (Tablo 8) içerisinde hazırlandı. Isıtılmayla polimerizasyon gerçekleştirildi ve 60-55°C'ye kadar soğutulduktan sonra, ultraviyole (UV) ışık altında yaydığı floresansla DNA'nın görülmesini sağlayan, EtBr (final konsantrasyon 0.5 µg/ml) eklenip, hazırlanan elektroforez kasetine döküldü.

Final hacimde 1 konsantre olacak şekilde elektroforez yükleme tamponu (Tablo 8) eklenen DNA örnekleri, jele uygulandı ve 80V/40 mA'de, 2-2.5 saat elektrik akımında yürütüldü. Elektroforez sonucunda 302 nm UV ışık altında jelde gözlenen DNA bantlarının değerlendirilmesi, polaroid kameralı transillüminatörde (Camag Reprostar II) yapıldı.

Tablo 8. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar

	İçerik	Konsantrasyon
TBE tamponu (20x)	Trisma Base	1.780M
	Borik Asid (Sigma)	0.040M
	EDTA	1.780M
Elektroforez yükleme tamponu (10x)	Üre (Sigma)	4.000M
	EDTA	0.025M
	Sukroz (Sigma)	%60
	Bromofenol Mavisı (Sigma)	%0.025
	Ksilen Siyanol (Sigma)	%0.025

II. 7. *S.pombe* DNA'sının Sau3AI İle Kısmi Kesimi İçin Uygun Doz Tespiti

Klonlanacak uygun boydaki genomik DNA fragmentlerini elde etmek için, öncelikle, kısmi kesimi gerçekleştirecek Sau3AI (Boehringer) restriksiyon enziminin uygun dozu belirlendi.

1 µg DNA içeren 15 µl'lik reaksiyon ortamlarına değişen ünitelerde Sau3AI eklendi ve 37°C'de, 1 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda, inkübasyon ortamı 65°C'de, 10 dakika tutularak enzimin aktivitesi durduruldu. DNA örnekleri elektroforetik analiz için %0.8 agaroz jele yüklendi ve örneklerin jelde oluşturdukları görünüm standart λ DNA fragmentlerine (λ/HindIII, Gibco BRL) ait bandlarla karşılaştırılarak kısmi kesim için uygun Sau3AI dozu belirlendi.

II. 8. Klonlama İçin Uygun *S. pombe* Genomik DNA Fragmentlerinin Jelden Geri Alınması

Genom kitaplığını oluşturmak üzere, uygun dozda Sau3AI ile kısmi kesimi yapıldıktan sonra %0.8 agaroz jele uygulanan *S. pombe* genomik DNA fragmentlerinden 2-10 kb'lık içeren jel parçası, içinde TBE tamponu (Tablo 8) bulunan dializ tüpüne (Gibco BRL) alındı. Elektroforez tankına yerleştirilen dializ tüpüne, 100V/50mA'de, 2-2.5 saat elektrik akımı uygulandı (elektroelüsyon). Bu süre sonunda tampona geçen DNA fragmentleri, öncelikle eşit hacim

izoamilalkol ya da fenol-kloroform ekstraksiyonu ile EtBr'den arındırıldı ve daha sonra 0.1 hacim 3M NaAc (pH 4.8) ve 2 hacim soğuk etil alkol ile çöktürüldü. Çökelti TE içinde çözündürülerek +4°C'de saklandı.

II. 9. Plazmidlerin Restriksiyon Haritası Açısından Kontrolü

Klonlamada vektör olarak kullanılan plazmidlerin (pSAB1 ve pFL20), restriksiyon haritaları, vektörlerin restriksiyon enzimleri kullanarak kesilmesiyle kontrol edildi.

Bu vektörleri tek noktada kesen enzim olarak, hedef dizisinin tetrasiklin direnç geni üzerinde olması ve kesim sonucu meydana getirdiği yapışkan uçların genomik DNA fragmentlerinininkilerle tamamlayıcı özellikte olmasından dolayı BamHI, birden fazla noktada kesim yapan enzim olarak da EcoRI kullanıldı.

pSAB1 ve pFL20 plazmidleri, 1 U/μg DNA BamHI ve EcoRI enzimleri etkisinde 37°C'de, 1 saat bırakılarak tekli ve ikili kesime uğratıldı. Enzim aktivitesi, 65°C'de, 10 dakika tutularak durduruldu. Sonuçlar elektroforetik olarak değerlendirildi.

II. 10. Rekombinant DNA Moleküllerinin Oluşturulması

S. pombe genomik DNA'sının uygun Sau3AI konsantrasyonu ile kısmi kesimi sonucu elde edilen fragmentler, BamHI endonükleazı ile doğrusal hale getirilmiş pSAB1 ve pFL20 plazmid vektörlerine bağlanarak rekombinant DNA molekülleri oluşturuldu.

II. 10. 1. Plazmidlerin Doğrusal Biçime Getirilmesi

Plazmidler, 1U/μg DNA BamHI (Boehringer) etkisinde 37°C'de, 1 saat bırakıldı ve enzimin aktivitesi 65°C'de, 10 dakika tutularak sona erdirildi. Plazmidlerin doğrusal duruma geçip geçmediği, agaroz jel elektroforezinde halkasal ve doğrusal DNA moleküllerinin farklı hızlardaki hareket özelliklerine dayanarak kontrol edildi. Daha sonra doğrusal plazmidler 2.2 hacim %0.2 etil alkol içinde hazırlanmış potasyum asetat (KAc/EtOH) (Sigma) eklenerek -20°C'de, 30 dakika bırakıldı ve +4°C'de, 15000 devir/dakika, 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü.

II. 10. 2. Plazmidlerin Defosforilasyonu

Doğrusal hale getirilmiş plazmid DNA'larının uygun koşullarda tekrar kendi üzerlerine kapanmaması için serbest 5'-PO₄ grupları yok

edildi, 100µl 10mM trisma base (pH 8.0) içinde çözüldürülmüş DNA üzerine 1mM spermidin (Sigma), 1 konsantre alkali fosfataz tamponu (Boehringer), 1U/µg DNA alkali fosfataz (Boehringer) eklendi ve karışım steril bidestile su ile 200µl'ye tamamlandı. Reaksiyon ortamı 37°C'de, 60 dakika tutuldu. Alkali fosfatazın aktivitesini durdurmak üzere, 10mM trisma base (pH 8.0), 10mM EDTA (pH 8.0), 100mM NaCl, %2 SDS eklenip hacim 400µl'ye tamamlanarak, 70°C'de 1 saat bırakıldı. Defosforile edilmiş plazmid, fenol-kloroform ekstraksiyonundan sonra 2.2 hacim %0.2 KAc/EtOH ile çöktürüldü ve TE tamponunda çözüldürülüp +4°C'de saklandı.

Defosforilasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği, T4 DNA ligaz etkisinde bırakılan defosforile vektörlerin elektroforetik analizleri ile saptandı.

II. 10. 3. Ligasyon

Ligasyon ortamı, µg olarak; 1:1, 1:2, 2:1 ve 4:1 oranında defosforile plazmid DNA'sı ve *S. pombe* genomik DNA fragmentleri, 1 U/µg DNA T4 DNA Ligaz enzimi (Boehringer), 1mM ATP ve 1 konsantre reaksiyon tamponu (Boehringer) içerecek şekilde hazırlandı ve 12°C'de, değişik sürelerde (4., 8., 12. ve 24. saat) inkübasyona bırakıldı. Reaksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediği agaroz jelde kontrol edildi.

II. 11. Transformasyon

Rekombinant DNA moleküllerinin klonlanmasında *E.coli*'nin *recA* mutanlığı olan HB101 ve DH5 α ile *recBC* mutanlığı olan BJ5183 ırkları kullanıldı (Tablo 1).

Transformasyonda (COHEN ve ark., 1972)'nin önerdiği yöntem izlendi: 5ml LB içinde, 37°C'de, 150 devir/dakika, 1 gecelik *E. coli* kültüründen alınan 0.5 ml 50ml LB'ye ekildi ve 37°C'de, 190 devir/dakika üremeye bırakıldı. Kültürün yoğunluğu 600 nm dalga boyunda 0.3-0.4 absorbans ($\sim 3 \times 10^8$ hücre/ml) değerine ulaşınca 10 dakika buzda bekletilerek üreme durduruldu. Hücreler +4°C'de, 4000 devir/dakika, 4 dakika santrifüjlenerek toplandı. 10ml 0.1M soğuk kalsiyum klorür (CaCl_2) ile yapılan hücre süspansiyonu 30 dakika buzda tutuldu. Bu şekilde hücre çeperindeki porları kısmen genişlemiş olan hücreler tekrar +4°C'de, 4000 devir/dakika, 5 dakika santrifüjlenerek toplandı ve 2 ml 0.1M soğuk CaCl_2 içinde süspansiyon edilerek +4°C'ye kaldırıldı.

Transformasyona elverişli (kompetant) duruma getirilmiş 0.5-18 saatlik hücre süspansiyonununun 200 μl 'si üzerine 0.1 μg DNA içeren 0.1-1 μl DNA çözeltisi eklenip buz içerisinde 20 dakika bırakılarak konak restriksiyon sisteminin aktivitesi durduruldu. Daha sonra 42°C'de, 90 saniye tutularak DNA'nın hücreye girişi sağlandı. Son olarak, bu transformasyon ortamı üzerine 1 ml LB (Tablo 4) eklenerek, kompetant hücrelerin eski durumlarını almaları ve transformantların taşıdıkları plazmid DNA'larının kendilerine

kazandırdıkları fenotipik özellikleri gösterecek genlerin anlatımlarını yapmalarına izin veren koşullar 37°C su banyosunda, 1 saat tutularak sağlandı.

II. 12. Transformantların Seçimi

Transformantların seçimi, pSAB1 ve pFL20 plazmidlerindeki işaret genleri olan ampisilin ve tetrasiklin direnç genlerine (Amp^r, Tet^r) göre yapıldı.

Bu amaçla, transformasyon karışımının 0.1 ml'si ampisilin içeren LBA besi ortamına (Tablo 5) ekilerek, 37°C'de, 1 gece üremeye bırakıldı. Seçici besi ortamında üreyebilen transformantlar arasında *S.pombe*'ye ait DNA fragmentlerini taşıyan plazmidleri içerenleri (rekombinantları) saptamak üzere koloniler steril kürdanla ampisilin içeren LBA ile ampisilin ve tetrasiklin içeren LBA besi ortamlarına aktarılarak 37°C'de, 1 gece üretildi. Ampisilin içeren LBA'da üreyip ampisilin ve tetrasiklin içeren LBA da üremeyen koloniler *S.pombe*'ye ait DNA fragmentini içeren transformantlar olarak seçildi.

Rekombinant kolonilerden minipreparasyonla plazmid izolasyonu yapıldı: 5ml ampisilin içeren LB besi ortamında 37°C'de, 150 devir/dakika, 1 gece üretilen transformantlar +4°C'de, 5000 devir/dakika, 5 dakika santrifüjlenerek toplandı. Çökelti 5mg/ml lizozim içeren 0.2 ml liziz tamponunda (Tablo 7) süspansiyon edilip 30 dakika buzda tutuldu. Lizat üzerine 0,4 ml alkali SDS (Tablo 7) eklenip 5 dakika buzda bırakılarak alkali pH (pH 12-12.50)'da

kromozomal DNA ve diğerk makromoleküllerin denatürasyonu sağlandı. Bu ortama 0.3 ml 3M NaAc (pH 4.8) eklenerek 60 dakika buzda bırakıldı ve +4°C'de, 15000 devir/dakika, 10 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü. Üst sıvıda kalan plazmid, 0.6 hacim izopropanol eklenerek oda ısısında, 10000 devir/dakika 10 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü. Plazmid çökeltisi 0.4 ml TE tamponunda (Tablo 6) çözündürölüp 10µg/ml final konsantrasyonda RNaz eklenerek oda ısısında 1 saat bırakıldı. DNA'nın fenol-kloroform ile ekstraksiyonu yapıldı (Bkz.2.5.). Plazmid DNA'sı üzerine 2 hacim 0.5M NH₄Ac/EtOH eklenerek -20°C'de, 30 dakika bırakılmasını takiben +4°C'de, 15000 devir/dakika, santrifüjlendi. Çökelti TE tamponunda çözündürüldü.

Transformantlardan izole edilen plazmidlerin yabancı DNA fragmentlerini taşıyıp taşımadıklarının ve bu fragmentin yaklaşık boyunun belirlenmesi amacıyla, plazmid 1U/µg DNA EcoRI ve HindIII restriksiyon endonükleazları ile ayrı ayrı 37°C'de 1 saat tutularak kesime uğratıldı ve sonuçlar elektroforetik olarak değerlendirildi.

II. 13. *S. pombe*'nin Genom Kitaplığının Kurulması

S.pombe genom kitaplığını kurmak için gerekli en az klon sayısı; Clarke-Carbon'un geliştirmiş olduğu formül kullanılarak hesaplandı (RUSSELL, 1992).

$$N = \frac{\ln(1 - p)}{\ln(1 - a / b)}$$

N: Gerekli koloni sayısı

a: Vektöre giren DNA fragmentinin ortalama boyu

p: Her bir genin bulunma olasılığı

b: Genomun total boyu

Bu amaçla *S.pombe*'ye ait DNA fragmentlerini içeren yeterli sayıda transformant koloniler öze ile toplanarak 5 ml ampisilin içeren LB besi ortamında 37°C'de, 150 devir/dakika, 1 gece üretildi ve %50 gliserin içinde -20°C'de saklandı.

III. BULGULAR

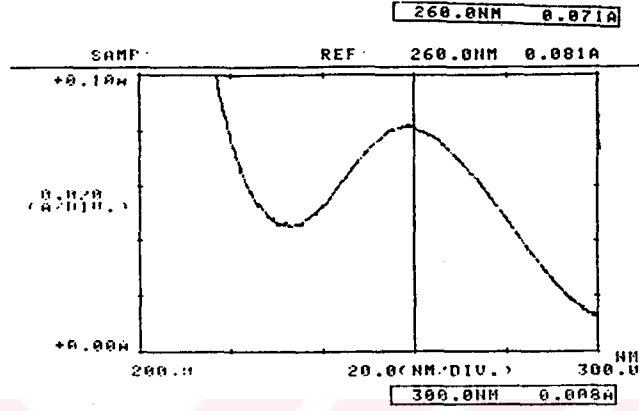
III. 1. *S. pombe* Genom DNA'sının ve Plazmid DNA'sının İzolasyonu, Miktar Tayini ve Saflık Kontrolü

S.pombe genom DNA'sı, Novozym ile hücre çeperi kısmen parçalanarak sferoblast haline getirilmiş hücrelerden II.4.'de anlatıldığı biçimde izole edildi. Ancak Novozym etki süresinin uzatılmasıyla protoplast haline gelen sferoblastlardan, daha fazla miktarda DNA izole edildiği belirlendi.

İzole edilen genomik DNA ve plazmid DNA'larının, CsCl/EtBr yoğunluk gradienti santrifüjlemesi sonunda miktar ve saflık dereceleri spektrofotometrik olarak değerlendirildi (Şekil 2).

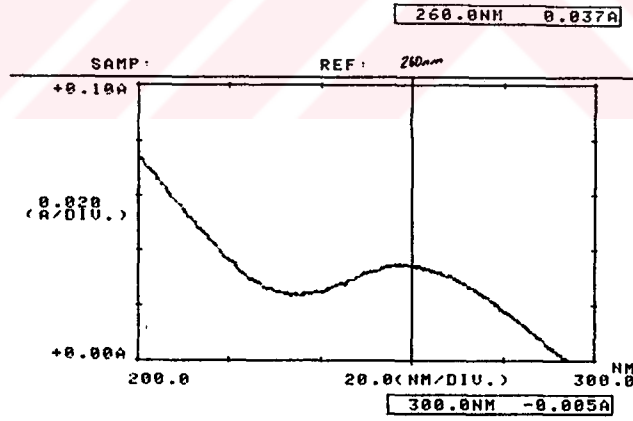
Şekil 2'de verilen, *S. pombe* ve pFL20 DNA'larının OD_{260}/OD_{280} (A1/A2) oranları her iki kaynağa ait DNA'ların yeterli derecede saf olduğunu gösterdi.

	λ	260.0	280.0		
No.	A1	A2	A1-A2	A1/A2	
1	0.072	0.041	0.030	1.7412	



(a)

	λ	260.0	280.0		
No.	A1	A2	A1-A2	A1/A2	
1	0.037	0.019	0.017	1.9000	

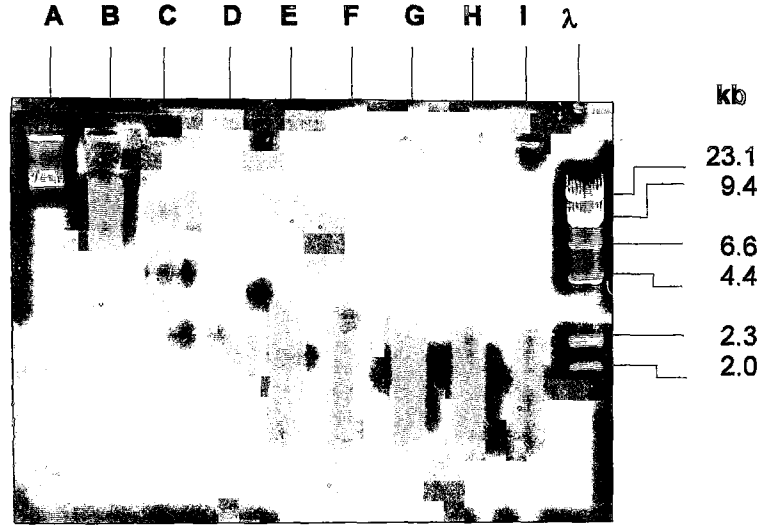


(b)

Şekil 2. a: *S. pombe* DNA'sı ve **b:** pFL20 plazmidinin CsCl/EtBr yoğunluk gradienti santrifüjlemesi sonunda 200–300 nm dalga boylarında oluşturdukları spektrum eğrileri.

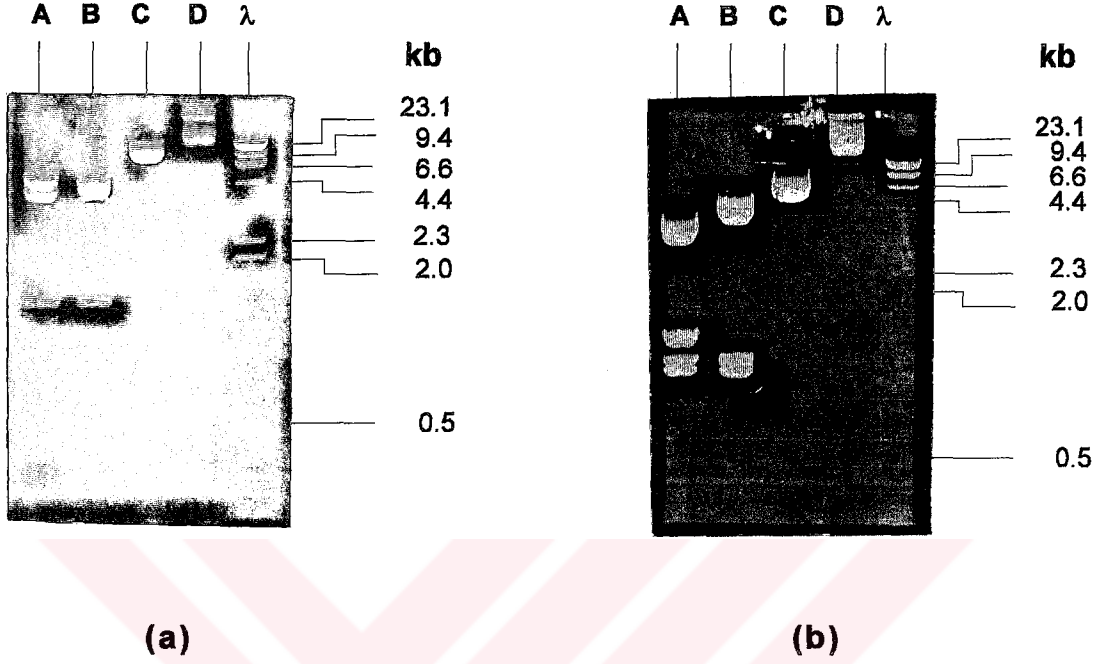
III. 2. Rekombinant DNA Moleküllerinin Oluşturulması

S. pombe Genom DNA'sının Kısmi Kesimi. Ön denemelerde, *S.pombe* genom DNA'sının kısmi kesimi için uygun restriksiyon endonükleazı dozunu saptamak amacıyla 1 µg *S.pombe* genom DNA'sı, 2–0.0078 ünite arasında değişen dozlarda Sau3AI etkisinde 37°C'de 1 saat bırakıldı. Plazmid vektörün taşıyabileceği maksimum boyuttaki ve bir genin tam olarak bulunabileceği DNA fragmentlerinin elde edilmesi ölçütüne göre, 2-10 kb'lık fragmentlerin kullanımının uygun olacağı kabul edildi. Buna göre, elektroforetik analizle, bu boyuttaki DNA fragmentlerini yüksek oranda meydana getiren en uygun Sau3AI dozunun 0.0156 U/µg DNA olduğu saptandı (Şekil 3) ve genomik DNA'nın kısmi kesimi için bu doz uygulandı.



Şekil 3. Farklı dozlarda Sau3AI kesimiyle meydana gelen *S. pombe* genomik DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi sonuçları. Enzim uygulamasız genomik DNA (A), 0,0078 (B), 0,0156 (C), 0,03125 (D), 0,0625 (E), 0,125 (F), 0,5 (G), 1 (H), 2 (I) U/ μ g, λ /HindIII standart DNA fragmentleri (λ).

Plazmidlerin Restriksiyon Haritası Açısından Kontrolü. Genom kitaplığı kurulmasında kullanılacak olan vektörler öncelikle klonlamada önemli restriksiyon noktaları açısından kontrol edildi. Bu amaçla, pSAB1 ve pFL20 vektörlerinin BamHI, EcoRI ve BamHI+EcoRI restriksiyon endonükleazları ile kesilerek meydana getirdikleri fragmentler agaroz jele uygulandı. Agaroz jelde meydana getirdikleri bantlar, standart λ DNA fragmentleri ile karşılaştırılarak değerlendirildi (Şekil 4).



Şekil 4. Plazmidlerin restriksiyon analizi. **a:** pSAB1, **b:** pFL20 **a:** EcoRI ve BamHI (**A**), EcoRI (**B**), BamHI (**C**) enzimleri ile kesilen pSAB1, enzim uygulamasız pSAB1 (**D**). **b:** EcoRI ve BamHI (**A**), EcoRI (**B**), BamHI (**C**) enzimleri ile kesilen pFL20, enzim uygulamasız pFL20 (**D**). λ /HindIII standart fragmentleri (λ).

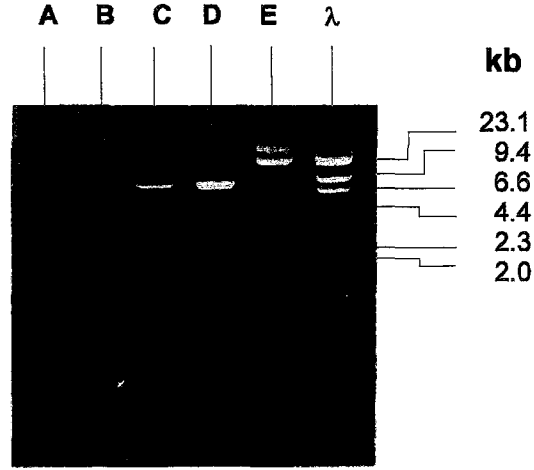
Şekil 4' de görüldüğü gibi standart λ DNA fragmentleri ile karşılaştırılarak elde edilen bulgulara göre, pSAB1, BamHI ile tek band (10.7 kb), EcoRI ile 4 band (4.5, 4.4, 1.5 ve 0.3 kb), EcoRI ve BamHI ikili kesimi ile 5 band (4.5, 4, 1.5, 0.4 ve 0.3 kb) oluşturdu. pFL20'nin de, BamHI ile tek band (7.9 kb), EcoRI ile 3 band (5.5, 1.3 ve 1.1 kb) EcoRI ve BamHI ikili kesimi ile 4 band (4.1, 1.4, 1.3 ve 1.1 kb) oluşturduğu gözlemlendi. Buna göre, vektörlerin Şekil 1'de

verilen restriksiyon haritalarında belirtilen hedef dizilerinde bir değişim olmadığı belirlendi.

Klonlanacak vektörler (pSAB1 ve pFL20) tetrasiklin geni içinde tek hedef dizisi bulunan BamHI restriksiyon endonükleazı ile kesilerek doğrusal hale getirildi. Enzim uygulaması yapılmamış vektörün halkasal, açık halkasal ve doğrusal biçimlerinin, jelde oluşturduğu 3 banda karşın, BamHI uygulaması yapılan vektör örneklerinde tüm DNA'ların doğrusal duruma geçtiği, jelde tek bir band oluşturmalarıyla doğrulandı (Şekil 4).

Ayrıca BamHI uygulaması ile doğrusal duruma getirilmiş vektörler defosforile edilmeden önce ve sonra T4 DNA ligaz etkisinde, 12°C'de 1 gece tutuldu ve defosforilasyonun başarılıp başarısız olduğu elektroforetik olarak test edildi (Şekil 5).

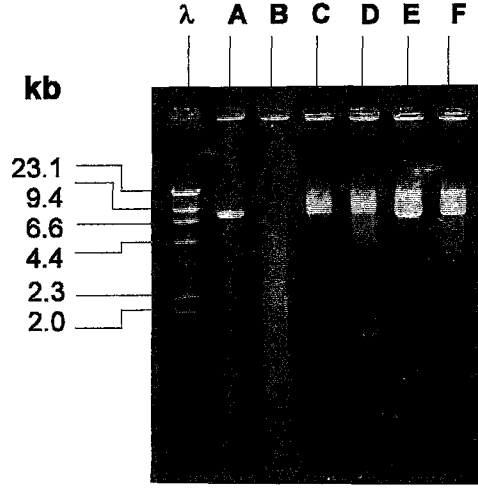
Şekilde, pFL20 için verilen jel fotoğrafından da görüldüğü gibi T4 DNA ligaz uygulanan, 5'-PO₄ grubu yok edilmemiş doğrusal DNA'nın halkasal biçim alması, buna karşın defosforile DNA'nın biçimini koruması defosforilasyonun gerçekleştiğini gösterdi.



Şekil 5. Defosforilasyonun elektroforetik kontrolü. T4 DNA ligaz uygulamasına bırakılmış doğrusal vektör (pFL20) (A), T4 DNA ligaz uygulamasına bırakılmış defosforile doğrusal vektör (B), Defosforile vektör (C), Doğrusal vektör (D), Halkasal vektör (E), Standart λ /HindIII fragmentleri (λ).

Rekombinant DNA moleküllerinin oluşturulmasında, ligasyon ortamındaki vektör ile *S.pombe* fragmentlerinin μg olarak oranı ve T4 DNA ligaz'ın inkübasyon süresi açısından optimizasyon yapıldı.

Bu amaçla, vektör ve *S.pombe* fragmentlerini 4 farklı oranda (1:1, 2:1, 4:1, 1:2) içeren ligasyon ortamları 12°C'de, 1 U/ μg T4 DNA ligaz etkisinde 1 gece bırakıldı. Sonuçlar agaroz jelde değerlendirildi (Şekil 6).

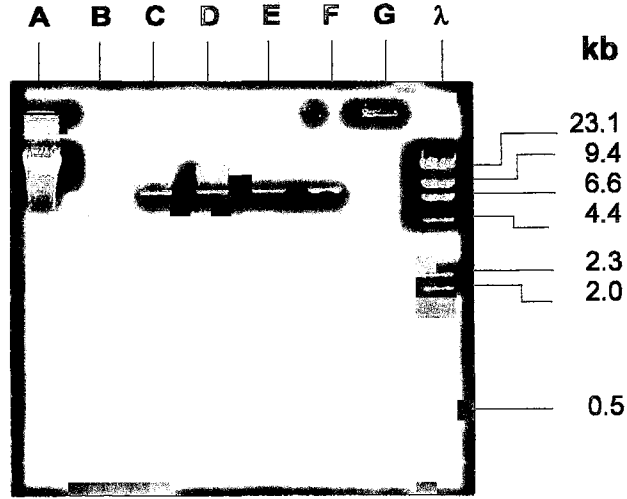


Şekil 6. *S.pombe* ve vektör (pFL20) oranının ligasyona etkisi. Defosforile pFL20 (A), *S.pombe* fragmentleri (B). pFL20 ve *S.pombe* fragmentleri oranı: 1:1 (C), 1:2 (D), 4:1 (E), 2:1 (F). Standart λ /HindIII fragmentleri (λ).

Şekil 6'da da görüldüğü gibi, vektör ve *S.pombe* fragmentlerinin kullanılan tüm oranlarında ligasyonun meydana geldiği belirlendi. Bununla beraber, vektör oranı *S.pombe* fragmentlerinin iki ve dört katı olduğunda ortamdaki serbest *S.pombe* fragmentlerinin büyük ölçüde azaldığı, ancak vektörün ortamda fazla miktarda kaldığı gözlemlendi. *S.pombe* fragmentleri vektörün iki katı olduğunda ise, vektörde büyük ölçüde azalma olmasına karşın *S.pombe* fragmentlerinin ortamda fazla miktarda kaldığı izlendi. Vektör ve *S.pombe* fragmentleri eşit oranda olduğu durumda serbest vektör ve *S.pombe* fragmentlerinde büyük ölçüde azalma olduğu gözlemlendi. Bu gözlemlere dayanarak, en uygun vektör ve *S.pombe* fragmentleri oranının 1:1 olduğu saptandı.

Daha sonra *S.pombe* fragmentleri ve defosforile doğrusal plazmidler 1:1 oranında kullanılarak, inkübasyon süresinin ligasyon üzerindeki etkisine bakıldı. 1 U/ μ g DNA T4 DNA ligaz etkisinde 12°C'de gerçekleştirilen inkübasyon sırasında 4., 8., 12. ve 24. saatlerde alınan örneklerin jele uygulanması ile ligasyonun zamana bağlı ilerleyişi elektroforetik olarak incelendi (Şekil 7).

4. saatte defosforile vektörün (pFL20) büyük bir kısmının doğrusal halde kaldığı, 8. saatte vektör miktarında azalma olduğu, 12. ve 24. saatlerde bu azalmanın daha da arttığı ve vektördeki bu azalmayla birlikte 8-23 kb arasında farklı boylarda fragmentleri içeren rekombinant DNA moleküllerinin oluşturduğu yoğun bir dağılım gözlemlendi. Buna göre, T4 DNA ligaz için uygun inkübasyon süresinin 12 saat olduğu, bu süre sonunda ligasyonun hemen hemen tamamlandığı, inkübasyon süresini daha fazla uzatmanın sonucu değiştirmediği belirlendi.



Şekil 7. İnkübasyon süresinin ligasyona etkisi. *S.pombe* total genom DNA'sı (A), 2-10 kb'lık *S.pombe* fragmentleri (B), ligasyon ortamından 24. (C), 12. (D), 8. (E) ve 4. (F) saatlerde alınan örnekler, BamHI uygulaması yapılmamış pFL20 (G), λ /HindIII fragmentleri (λ).

Bu sonuçlara göre, *S.pombe*'nin genom kitaplığının kurulmasına ilişkin çalışmalarda rekombinant DNA moleküllerinin oluşturulması sırasında, vektör ve *S.pombe* fragmentleri oranı 1:1, T4 DNA ligaz etkisindeki inkübasyon süresi 12 saat olarak kullanıldı.

III. 3. Transformasyon

S.pombe genom kitaplığını kurmak üzere oluşturulan rekombinant plazmidlerin klonlanması *E.coli* transformasyonu ile gerçekleştirildi.

Transformasyon etkinliğinin, kompetant hale getirilecek hücre kültürünün ve konak olarak kullanılan kompetant hücrenin yaşı açısından optimizasyonu yapıldı.

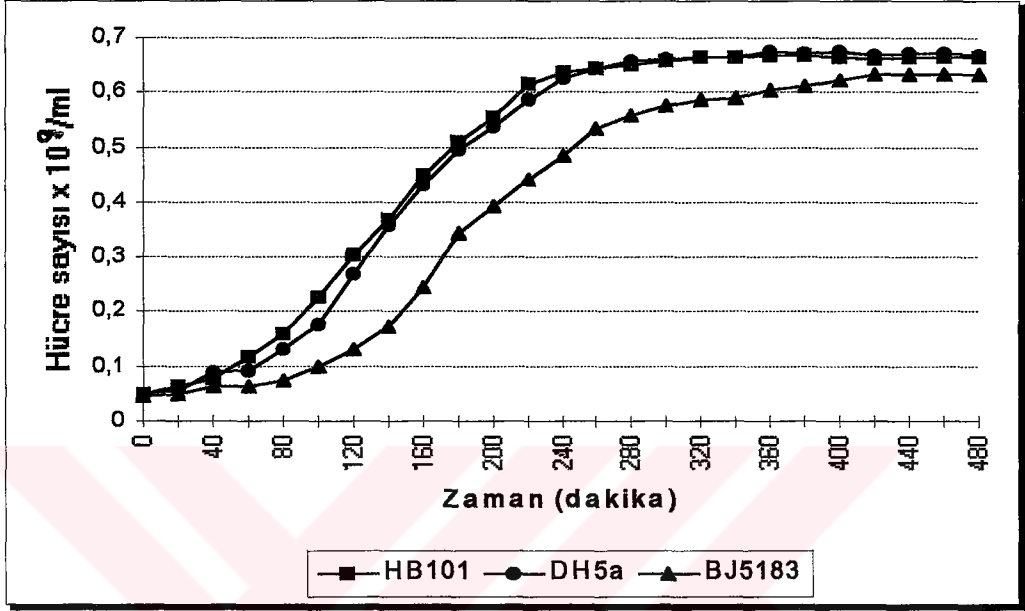
Transformasyonda konak olarak kullanılacak *E.coli* ırklarının (HB101, DH5 α , BJ5183) kompetant hale getirilmeleri için en uygun yaşı belirlemek üzere karşılaştırmalı olarak üremeleri izlendi. Üreme sırasında 20 dakikalık periyotlarda kültürlerden alınan örneklerde, 600 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümlerle hücre miktarı absorbans olarak saptandı ve daha sonra bu değerler hücre sayısı/ml cinsine çevrildi (Tablo 9). Elde edilen değerlere göre, zamana karşı kültürdeki hücre sayısındaki artışla ifade edilen üreme eğrileri çıkarıldı (Şekil 8).

Tablo 9. *E. coli* ırklarının 600 nm dalga boyundaki absorbans ve hücre sayısı/ml değerleri

Zaman (dakika)	HB101		DH5 α		BJ5183	
	OD ₆₀₀	hücre/ml (x10 ⁸)	OD ₆₀₀	hücre/ml (x10 ⁸)	OD ₆₀₀	hücre/ml (x10 ⁸)
0	0.060	0.48	0.062	0.488	0.059	0.464
20	0.078	0.624	0.070	0.56	0.060	0.48
40	0.099	0.792	0.110	0.8	0.081	0.648
60	0.146	0.117	0.113	0.9	0.079	0.632
80	0.197	1.58	0.164	1.31	0.092	0.736
100	0.284	2.27	0.223	1.78	0.124	0.992
120	0.378	3.02	0.336	2.69	0.164	1.31
140	0.459	3.67	0.446	3.57	0.217	1.74
160	0.561	4.49	0.538	4.30	0.307	2.46
180	0.636	5.09	0.620	4.96	0.429	3.43
200	0.696	5.57	0.667	5.36	0.490	3.92
220	0.767	6.14	0.734	5.87	0.554	4.43
240	0.796	6.37	0.784	6.27	0.605	4.84
260	0.806	6.45	0.804	6.43	0.666	5.33
280	0.812	6.5	0.820	6.56	0.698	5.58

Tablo 9'un devamı

Zaman (dakika)	HB101		DH5 α		BJ5183	
	OD ₆₀₀	hücre/ml (x10 ⁸)	OD ₆₀₀	hücre/ml (x10 ⁸)	OD ₆₀₀	hücre/ml (x10 ⁸)
300	0.820	6.56	0.826	6.61	0.719	5.75
320	0.832	6.66	0.833	6.66	0.735	5.88
340	0.833	6.66	0.832	6.66	0.740	5.92
360	0.837	6.7	0.843	6.74	0.755	6.04
380	0.835	6.68	0.840	6.72	0.765	6.12
400	0.833	6.66	0.842	6.74	0.778	6.22
420	0.827	6.62	0.837	6.7	0.790	6.32
440	0.833	6.66	0.840	6.72	0.790	6.32
460	0.832	6.66	0.840	6.72	0.790	6.32
480	0.830	6.64	0.837	6.7	0.792	6.32

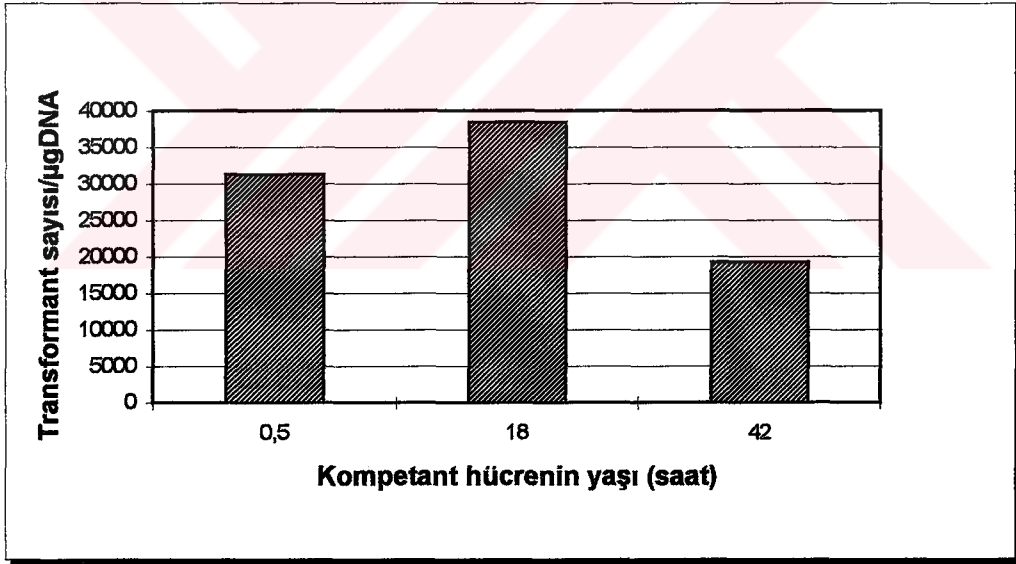


Şekil 8. *E. coli* ırklarının üreme eğrileri.

Şekil 8'de verilen *E. coli* ırklarına ait üreme eğrilerinde, HB101 ve DH5a'nın 2. saatte logaritmik evrenin ortalarına geldiği, ancak BJ5183'ün bu değere 3. saatte ulaşabildiği gözlemlendi. Buna göre, kültürdeki hücrelerin aktif durumda bulunduğu logaritmik fazın ortalarına karşılık gelen bu saatler, kompetant hücre elde edilmesi için gerekli uygulamalarda dikkate alındı.

Kompetant hücre yaşını optimize etmek üzere 0.5, 18 ve 42 saatlik kompetant hücelere (HB101) 0.1 μ g pSAB1 transfer edildi. Selektif besi ortamında üreyen kolonilerin bu verilere göre çizilen grafiği Şekil 9'da verildi.

Bu şekilden de anlaşıldığı gibi, en yüksek transformasyon etkinliğinin 18 saatlik kompetant hücrelerinin transformasyonda kullanılmasıyla sağlandığı gözlemlendi. Bununla beraber 0.5 saatlik kompetant hücrelerin transformasyon etkinliğinin oldukça yüksek olduğu, ancak 42 saatlik kompetant hücre kullanıldığında bu değerlerin hemen hemen yarıya düştüğü belirlendi.



Şekil 9. 0.5, 18, 42 saatlik kompetant HB101 hücrelerinin transformasyon etkinliği.

Bu verilere göre, çalışma süresince logaritmik evrenin ortalarındaki ($\sim 3 \times 10^8$ hücre/ml) *E.coli* kültürlerinden kompetant hale getirilmiş 18 saatlik hücreler, $0.1 \mu\text{g}/10^8$ hücre oranında rekombinant moleküllerin kullanılmasıyla transformasyona uğratıldı.

III. 4. Transformantların Seçimi

pSAB1 ve pFL20 vektörleri, transformasyon etkinliklerinin yükseltilmesi amacıyla optimize edilen transformasyon koşullarında, *E. coli* HB101, DH5 α ve BJ5183 ırklarına transfer edildi. Transformasyon çalışmalarında, konak olarak *E. coli* HB101 ve DH5 α ırklarında başarılı sonuçlar alındı. Bunlardan yüksek transformasyon etkinliği gösteren HB101 ırkı, pSAB1 ve pFL20 vektörleri kullanılarak rekombinant plazmidlerin transformasyonunun yapılması için seçildi.

Transformantların seçimi amacıyla ampisilin içeren besi ortamına ekimler yapıldı. $90 \mu\text{g}$ pSAB1 vektörü kullanarak 8200 tane, $70 \mu\text{g}$ pFL20 vektörü kullanarak da 1600 tane transformant koloni belirlendi. Bu koloniler daha sonra, ampisilin ve tetrasiklin içeren besi ortamlarına aktarıldı ve pSAB1 vektörü için 7364 tanesinin, pFL20 vektörü için ise 900 tanesinin rekombinant koloni olduğu saptandı.

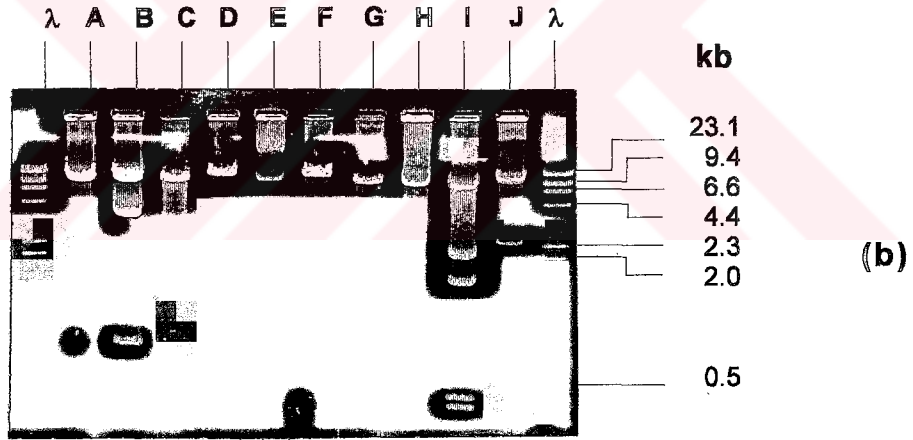
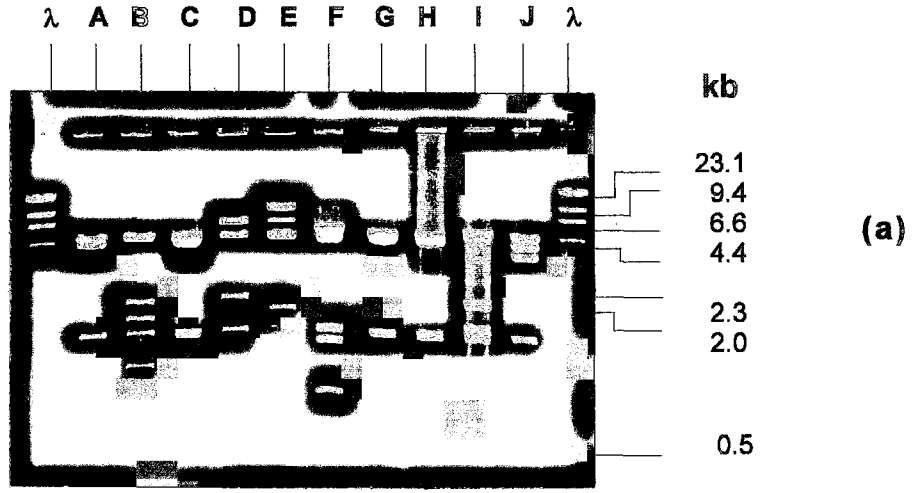
Buna göre, pSAB1 vektörü kullanılarak yapılan transformasyon çalışmaları sonucunda rekombinasyon frekansı %89, pFL20 vektörü kullanılarak yapılan transformasyon çalışmaları sonucunda ise rekombinasyon frekansı %56 olarak hesaplandı (Tablo 10).

Tablo 10. Fenotipik gözlemlere göre seçilen transformant ve rekombinant sayıları

Vektör	Transformant sayısı	Rekombinant sayısı	Rekombinasyon frekansı (%)
pSAB1	8200	7364	89
pFL20	1600	900	56

Rekombinant oldukları fenotipik düzeyde saptanan klonlardan rastgele seçilen örneklerden plazmid izolasyonu yapıldı. Plazmidlerin yabancı DNA'yı taşıyıp taşımadıklarını test etmek amacıyla izole edilen DNA'lar hem EcoRI hemde HindIII ile kesildi. Sonuçlar, standart fragmentler ve aynı enzimlerle kesilen vektöre ait fragmentlerle karşılaştırılarak değerlendirildi.

Klonlama vektörü olarak pSAB1'in kullanımıyla elde edilen rekombinant klonlara ait 9 plazmid örneğinin elektroforetik analiz sonuçları Şekil 10'de verildi. Bazı örneklerin (A, C, H), büyük olasılıkla *S. pombe*'ye ait çok küçük fragmentleri içerdikleri için, vektörünkine benzer bantlar oluşturdukları gözlemlendi. Buna karşılık, şekilde B, D, E, F, I ve J olarak işaretlenen örneklerde *S. pombe*'ye ait oldukça büyük fragmentlerin varlığı saptandı. Bunların bazılarında EcoRI ve/veya HindIII için hedef dizilerin bulunduğu belirlendi.



Şekil 10. a: Rekombinant plazmidlerin (A-F ve H-J) ve pSAB1'in (G) EcoRI, **b:** aynı DNA örneklerinin HindIII kesim ürünleri, λ/HindIII fragmentleri (λ).

III. 5. *S.pombe*'nin Genom Kitaplığının Kurulması

S. pombe genom kitaplığının kurulması için, gerekli minimum rekombinant klon sayısı (N), Clarke ve Carbon tarafından geliştirilen formüle göre (RUSSELL,1992) hesaplandı. Total genom boyutu 14000 kb (b) olan (MORENO ve ark., 1991) *S.pombe* genom kitaplığı kurulurken bu kitaplığın genomun yaklaşık %95'ini kapsamaması (p=0.95) amaçlandı ve Sau3AI kesimi ile elde edilen genom fragmentlerinin ortalama boyu 6 kb (a) olarak alındı.

$$N = \frac{\ln(1 - 0.95)}{\ln(1 - 6 / 14000)} = 6988$$

Çalışma sırasında pSAB1 vektörü kullanıldığında, transformasyon etkinliğinin, elde edilen rekombinant klon sayısının ve buna bağlı olarak rekombinasyon frekansının, pFL20'den daha yüksek değerde olduğu belirlendi. Bu nedenle, *S. pombe*'nin genomunun hemen tümünü kapsayacak bir genom kitaplığı için (yukarıdaki formülde verilen) gerekli rekombinant klon sayısına pSAB1 vektörü ile daha kolay ulaşıldı.

Buna göre, *S.pombe*'nin genomunun %95'inden daha fazlasını kapsayan genom kitaplığı pSAB1 vektöründe kuruldu.

IV. TARTIŞMA VE SONUÇ

Genom kitaplıkları organizmalara ait genlerin yapı ve fonksiyonlarının araştırılmasında temel oluşturur. Bu çalışmada ileride *S.pombe*'ye ait genlerle yapılacak bu tipteki çalışmalarda kullanılmak üzere, bu organizmanın genom kitaplığının pSAB1 ve pFL20 vektörlerinde kurulması amaçlandı.

Klonlanacak DNA fragmentlerinin seçiminde, bir genin tam olarak bulunabileceği düşünülen minimum büyüklükteki DNA parçaları ile, çalışmadaki vektörlerin (pFL20 ve pSAB1) taşıyabilecekleri maksimum büyüklükteki parçaları verecek doz dikkate alınarak, Sau3AI enziminin kullanıldığı kısmi kesim sonucu, 2-10 kb'lik fragmentler oluşturulmaya çalışıldı.

Rekombinant DNA molekülleri oluşturmada, vektör ve *S. pombe* fragmentlerinin moleküler ağırlıklarının ve ligasyon ortamındaki oranlarının önemli olduğu bilindiğinden (RODRIGUEZ ve TAIT, 1983), ön denemelerde *S. pombe* fragment ve vektör oranları μg olarak; 1:1, 1:2, 1:4 ve 2:1 olacak şekilde ligasyon ortamları hazırlandı. Bunların arasından 1:1 oranında hazırlanan ortamda en başarılı ligasyonun olduğu gözlemlendi ve bu durum özellikle pFL20 (7.9 kb) ve *S. pombe* fragmentlerinin (ortalama 6 kb) eşit oranda bulunduğu ligasyon ortamında gösterildi.

Kompetant hale getirilecek *E. coli* hücreleri, canlı hücre oranının yüksek olduğu logaritmik fazın ortalarındaki kültürden alındı. Bunun için çalışmada kullanılan konak organizmaların (HB101, DH5 α ve

BJ5183) hangi saatte bu evreye ulaştıkları üreme eğrilerinden yararlanılarak belirlendi. Rec A mutanti olan HB101 ve DH5 α 'nın ikinci saatte, Rec BC mutanti olan BJ5183'ün ise 3. saatte bu evreye ulaştığı saptandı. Bu sonuç Rec BC mutantlarında hücre gelişiminin yavaş olmasından (AUSUBEL ve ark., 1989) kaynaklanmaktadır. Ayrıca çalışma sırasında, yukarıdaki veriye uygun olarak, BJ5813'ün diğerlerine göre daha küçük çaplı koloniler oluşturduğu gözlemlendi.

Kompetant hale getirilen hücrelerin transformasyonda etkin bir şekilde kullanılabilirliğini araştırmak üzere, bu hücreler ardışık 3 gün (0.5., 18. ve 42. saatlerde) transformasyona uğratıldılar. Hücrelerin transformasyon etkinliğinin 18. saatte en yüksek olduğu, ama daha sonra (42. saat) düştüğü saptandı. Benzer şekilde (DAGERT ve EHRLICH, 1979) yaptıkları çalışmada da ilk 12-24 saat içerisinde transformasyon etkinliğinin 4-6 kat arttığını ve ilerleyen saatlerde ise azaldığını göstermişlerdir.

Çalışmada belirlenen en uygun koşullarda oluşturulan rekombinant plazmidlerle *E. coli* HB101 transformasyonu yapıldığında pSAB1 vektörüyle 8200, pFL20 ile ise 1600 transformant elde edildi. Buna göre pSAB1'in kullanıldığı durumda rekombinasyon frekansı %89 bulunurken pFL20 için bu oranın oldukça düşük (%56) olduğu saptandı.

YE_p vektörlerinin *S. pombe* içerisine sokulduklarında kopya sayıları az (5-10) olmakla birlikte seçici ortamlardaki stabilitelerinin yüksek olduğu bilinmektedir (RUSSELL, 1992). Bu nedenle bir YE_p vektörü olan pSAB1'de kurulan gen kitaplığının ileride yapılacak olan

S. pombe'ye ait genlerin izolasyonu ve klonlanmasına ilişkin çalışmalarda başarılı bir şekilde kullanılabilceği düşünölmektedir.

YRp vektörlerinin kopya sayılarının fazla olmasına karşın stabiliteleri oldukça düşöktür (RUSSELL, 1992). Bununla beraber, bu gruptan olan pFL20, yapısına eklenmiş olan "stb" elementleri sayesinde kazandığı stabilite nedeniyle *S. pombe* genom kitaplıklarının oluşturulmasında tercih edilen vektörlerden biri haline gelmiştir (LOSSON ve LACROUTE, 1983). HEYER ve ark. (1986) pFL20 ve pSAB1'in türevlendiği pDB248 vektörlerini kullanarak *S. pombe*'de yaptıkları transformasyon çalışmalarında her iki vektörün de transformasyon etkinliğinin aynı olduğunu saptamalarına karşın, pFL20'deki stabilitenin (taşıdığı stb elementleri nedeniyle), pDB248'e göre daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

Bu çalışmanın süresi içerisinde pSAB1'e göre *E.coli*'deki transformasyon etkinliğinin ve aynı zamanda rekombinasyon frekansının düşük olması nedeniyle, pFL20 ile *S. pombe* genomunun büyük bir kısmını (örneğin %95'ini) kapsayan klon sayısına ulaşamadı. Bununla beraber *S. pombe* hücresi içerisinde kopya sayısının fazla olması ve yukarıda değinildiği gibi stabil olmaları nedeniyle *S. pombe* genom kitaplığının bu vektörde de kurulma çalışmaları sürdürölmektedir.

V. ÖZET

SCHİZOSACCHAROMYCES POMBE'NİN GENOM KİTAPLIĞININ KURULMASI

Ökaryotların moleküler biyolojisinin araştırılmasında bir model organizma olarak kullanılan *Schizosaccharomyces pombe*'nin genom kitaplığının kurulmasında, iki farklı *S.pombe-Escherichia coli* mekik tipi vektörü (pSAB1 ve pFL20) denendi.

S.pombe'nin genom DNA'sı Sau3AI ile kısmi kesime uğratıldı ve 2-10 kb'lık fragmentler seçildi. Vektörler, BamHI ile doğrusal hale getirildikten sonra defosforile edildi.

Ligasyon ve transformasyon aşamaları ile ilgili optimizasyon çalışmalarından sonra, *S.pombe* DNA fragmentleri ve defosforile doğrusal plazmidler (1:1 oranında) 12 saat ligasyon koşullarında tutularak, rekombinant DNA molekülleri oluşturuldu. Kompetant hale getirilmiş 18 saatlik *E.coli* hücreleri 0.1µg DNA ile transformasyona uğratıldı. Seçici besi ortamlarında transformantların seçimi yapıldı.

Vektör olarak pSAB1'in kullanıldığı transformasyon çalışmalarında 7364, pFL20'nin kullanıldığı çalışmalarda ise 900 rekombinant koloni elde edildi.

Buna göre; *S.pombe* genomunun yaklaşık %95'ini içeren genom kitaplığı pSAB1 vektöründe kuruldu.

SUMMARY

CONSTRUCTION OF GENOMIC LIBRARY OF *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*

Two different *S.pombe-E.coli* shuttle vectors (pSAB1 and pFL20) were tested in the construction of the genomic library of *S.pombe* using as a model organism in the researchs of molecular biology of eukaryotes.

The genomic DNA of *S.pombe* was partially digested with *Sau3AI*, and then 2-10 kb fragments were selected. The vectors were dephosphorylated, after linearization with *BamHI*.

After the optimization studies related to ligation and transformation steps, *S.pombe* DNA fragments and dephosphorylated linear plasmids (1:1 proportion) were kept in the conditions of ligation for 12 hours, recombinant DNA molecules were obtained. 18 hours competent *E.coli* cells were transformed with 0.1 μ g DNA. The selection of transformants was done on the selective medium.

7364 recombinant colonies were obtained when pSAB1 used as vector in the transformation studies while 900 colonies were obtained with pFL20.

As a result, the genomic library containing approximately 95% of genome of *S.pombe* was constructed in the pSAB1 vector.

VI. KAYNAKLAR

- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., STRUHL, K. (1989): Selected Topics from Classical Bacterial Genetics. Current Protocols in Molecular Biology, 0-471-50338-X, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore,1, Unit1.4.
- BARBET, N., MURIEL, W. J., CARR, A. M. (1992): Versatile Shuttle Vectors and Genomic Libraries for Use with *Schizoccharomyces pombe*. Gene, 114, 59-66.
- BEACH, D., NURSE, P. (1981): High-frequency Transformation of the Fission Yeast *Schizoccharomyces pombe*. Nature, 290, 140-142.
- BEACH, D., PIPER, M., NURSE, P. (1982): Construction of a *Schizosaccharomyces pombe* Gene Bank in a Yeast Bacterial Shuttle Vector and Its Use to Isolate Genes by Complementation. ~~Molecular General Genetics, 187, 326-329.~~
- BIRNBOIM, H. C., DOLY, J. (1979): A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. Nucleic Acids Res., 7(6), 1513-1523.

- BROACH, J. R., STRATHERN, J. N., HICKS, J. B. (1979): Transformation in Yeast: Development of a Hybrid Cloning Vector and Isolation of the CAN1 Gene. *Gene*, 8, 121-133.
- BROWN, T. A. (1990): Purification of DNA from Living Cells. *Gene Cloning an Introduction*. Second edition, 0-412-34210-3, Chapman & Hall, London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, 27-48.
- COHEN, S. N., CHANG, A. C. Y., HSU, L. (1972): Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69, 2110.
- COTTAREL, G., BEACH, D., DEUSCHLE, U. (1993): Two New Multi-purpose Multicopy *Schizosaccharomyces pombe* Shuttle Vectors, pSP1 and pSP2. *Current Genetics*, 23, 547-548.
- DAGERT, M., EHRLICH, S.D. (1979): Prolonged Incubation in Calcium Improves the Competence of *Escherichia coli* Cells. *Gene*, 6, 23
- GUTZ, H., HESLOT, H., LEUPOLD, U., LOPRIENO, N. (1974): *Schizosaccharomyces pombe*. *Handbook of Genetics*, Ed: Robert C. K., Plenum Press, 1, 395-446.

HINNEN, A., HICK, J.B., FINK, G. R. (1978): Transformation of Yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75, 1929-1933.

KOHLI, J., HOTTINGER, H., MUNZ, P., STRAUSS, A., THURIAUX, P. (1977): Genetic Mapping in *Schizosaccharomyces pombe* by Mitotic and Meiotic Analysis and Induced Haploidization. Genetics, 87, 471- 489.

LOSSON, R., LACROUTE, F. (1983): Plasmids Carrying the Yeast OMP Decarboxylase Structural and Regulatory Genes: Transcription Regulation in a Foreign Environment. Cell, 32, 371-377.

MORENO, S., KLAR, A., NURSE, P. (1991): Molecular Genetic Analysis of Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Methods in Enzymology, 194, 795-823.

MUNZ, P., WOLF, K., KOHLI, J., LEUPOLD, U. (1989): Genetics Overview. Molecular Biology of the Fission Yeast. 0-12-514085-1, Academic Press, Inc., San Diego, New York, Berkeley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, Ed: Nasim, A., Young, P., Johnson, B. F., 1, 1-25.

RODRIGUEZ, R. L., TAIT, R. C. (1983): Ligation of DNA. Recombinant DNA Techniques an Introduction. 0-201-10870-4,

Addison-Wesley Publishing Company, Massachusetts, London, Amsterdam, Sydney, Tokyo, 81-90.

RUSSELL, P., NURSE, P. (1986): *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*: A Look at Yeast Divided. Cell, 45, 781-782.

RUSSELL, P. (1989): Gene Cloning and Expression in Fission Yeast. Molecular Biology of the Fission Yeast. 0-12-514085-1, Academic Press, Inc., San Diego, New York, Berkeley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, Ed: Nasim, A., Young, P., Johnson, B. F., 243-271.

RUSSELL, P. (1992): Cloning Vectors and Cloning Recombinant DNA Technology and the Manipulation of DNA. Genetics, third edition, 0-673-52143-5, Harper Collins Publishers, U.S.A., 436-439.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989): Appentixes. Molecular Clonning, a Laboratory Manuel, Book 3, Second edition, 0-87969-309-6, Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A., A.10, E.5.

SINGER, M., BERG, P. (1991): Molecular Anatomy, Expression and Regulation of Eukaryotic Genes. Genes and Genomes, a changing perspective, 0-935702-17-2, University Science Books, 433-858.

STEINER, N. C., KAHNENBERGER, K. M., CLARKE, L. (1993): Centromeres of the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe* Are Highly Variable Genetic Loci. *Molecular and Cellular Biology*, Aug., 4578-4587.

WRIGHT, A.P., MAUNDRELL, K., HEYER, W-D., BEACH, D., NURSE, P. (1986): Vectors for the Construction of Gene Banks and the Integration of Cloned Genes in *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Plasmid*, 15, 156-158.

WRIGHT, A.P., MAUNDRELL, K., SHALL, S. (1986): Transformation of *Schizosaccharomyces pombe* by Non-homologous, Unstable Integration of Plasmids in the Genome. *Current Genetiks*, 10, 503-508.

VII. ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Çayeli'nde doğdum. İlk öğrenimimi İstanbul Sururi İlkokulu'nda, orta öğrenimimi Mecidiyeköy Lisesi'nde tamamladım. 1987 yılında girmiş olduğum İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 1991 yılında mezun oldum. 1992 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün açmış olduğu Moleküler Biyoloji-Genetik Yüksek Lisans programına girmeye hak kazandım.

6-8 Temmuz 1994 tarihleri arasında Trakya Üniversitesi tarafından düzenlenen XII. Ulusal Biyoloji Kongresi'ne ve 22-23 Eylül 1994 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi tarafından düzenlenen II. Ulusal Biyoteknoloji Simpozyumu'na katıldım.

Halen, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda 27. 09. 1993 tarihinden itibaren Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.