

T. C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

25065

**SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE'DE
ARGİNİN BİYOSENTEZİ İLE İLİŞKİLİ BAZI GENLERİN
HARİTALANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

(Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Programı)

Semian KARAER

Danışman : Yard. Doç. Dr. Atok OLGUN

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

EYLÜL - 1992

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmamın eğitim, öğretim aşamalarında gösterdikleri ilgi ve desteklerinden dolayı Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Avni KURU'ya, tezimin gerçekleşmesi için değerli bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım tez danışmanım Sayın Yard.Doç.Dr. Atok OLGUN'a ve Sayın Prof.Dr. Güler ORALER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Sayın Doç. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI'ya, tezimin hazırlanması sırasında bana yardımcı olan Anabilim Dalımızdaki değerli arkadaşlarıma, ayrıca çalışmamın çizim işlerindeki yardımlarından dolayı Celal DAR'a ve tezin ciltlenmesini gerçekleştiren İ.Ü. Fen Fakültesi Basımevi personeline çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
I. GİRİŞ	1
II. MATERYAL ve METOD	6
A. MİKROORGANİZMA	6
B. BESİYERLERİ	7
C. SUŞLARIN SAFLIK KONTROLU VE SAKLANMASI	10
1. Haploid Hücrelerin Saflaştırılması	10
2. Eşleşme Tipinin Saflaştırılması	10
3. Genotip Saflaştırılması	11
D. GENETİK YÖNTEMLER	11
1. Eşleşme Tipinin Tayini	11
2. İkili Mutantların Elde Edilmesi	11
3. Stabil Diploidlerin Elde Edilmesi	12
4. Haploidizasyon	13
5. Tetrad Analizi	14
III. BULGULAR	17
A. arg10 GENİNİN YERLEŞİMİ	17
B. arg7 GENİNİN YERLEŞİMİ	21
IV. TARTIŞMA	23
V. ÖZET	25
VI. SUMMARY	26
VII. KAYNAKLAR	27

1. GİRİŞ

Canlı sistemlerde genetik olayların açıklanması, özellikle model olarak seçilen bazı türlerdeki ayrıntılı analiz sonuçlarının, aynı grup içinde yer alan diğer türlere uyarlanmasıyla yapılmaktadır. Bu nedenle model olarak kullanılan organizmaların genom yapılarının çok iyi bilinmesi ve buna bağlı olarak genlerinin haritalanması, sonraki aşamalarda yapılacak ayrıntılı çalışmalar için büyük önem taşımaktadır.

Genetik olayların açıklanmasında başlangıçta basit yapıları olan canlılar olan prokaryotik organizmalardan yararlanılmıştır. Bu organizmalarla yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular birçok genetik olayın çözülmesini sağlamışsa da hücresel ve moleküler düzeydeki farklılıklar nedeniyle ökaryotik organizmalardaki genetik olayları yeterli düzeyde açıklayamamıştır.

Mayalar, basit yapıları ve kolay incelenebilmelerinden dolayı ökaryotlardaki genetik ve moleküler düzeydeki biyolojik araştırmalar için oldukça uygun model organizmalardır. Maya tipi organizmalar arasında üzerinde en çok çalışılan **Saccharomyces cerevisiae** olmakla birlikte bir diğer maya türü olan **Schizosaccharomyces pombe** de günümüzde genetikçilerin

en gözde objelerinden biri haline gelmiştir. Bunun nedeni moleküler düzeydeki verilere göre bu organizmanın bazı hücresel özelliklerinin *Saccharomyces cerevisiae*'den çok memeli hücrelerine benzerlik göstermesidir (Russell, 1986).

Schizosaccharomyces pombe ilk olarak Lindner (1893) tarafından darı birasından izole edilmiştir. Tüm hayat çevrimi haploid ve sadece zigot aşamasında diploid olan ve zigotik aşamanın hemen arkasından mayoz bölünme geçirerek dört askosporlu bir askus oluşturan bu organizma üzerindeki ilk genetik çalışmalar ise Leupold (1950) tarafından yapılmıştır.

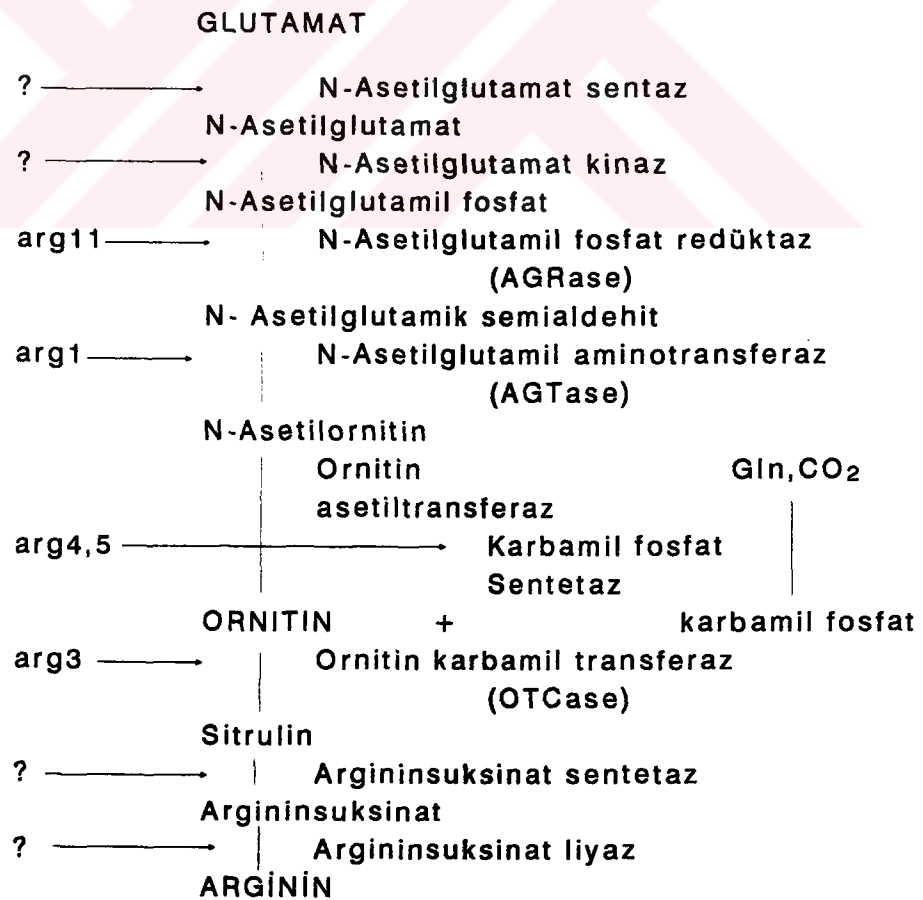
S. pombe'de ayrıntılı bağlantı çalışmaları ilk olarak eşleşme tipi genleri üzerinde yapılmıştır. Leupold (1958), eşleşme tipinin, birbirine 1.1 cM mesafede 2 gen tarafından belirlendiğini ve bu genlerin eşleşme reaksiyonlarının tayininde ortak hareket ettiklerini göstermiştir. Bu araştırmacı 4 eşleşme tipi ayırt etmiştir: bir homotallik (h^{90}), 2 heterotallik (h^{+N} , h^R) ve bir heterotallik (h^{-s}). Daha sonra bir çok araştırmacı (Flores da Cunha, 1970; Egel, 1973; Meade ve Gutz, 1975; Gutz ve Doe, 1975; Thurlaux ve ark., 1975; Kohli ve ark., 1977; Gygax ve Thurlaux, 1984; Kohli, 1987; Oraler ve ark., 1990) değişik genler üzerinde çalışarak, haritalama çalışmalarına katkıda bulunmuşlardır. Yapılan haritalama çalışmaları mayoz ve mitoz analiz sonuçlarına dayandırılmıştır.

S.pombe'nin kromozom sayısı hakkında uzun süre kesin bilgiler elde edilememiştir. Flores da Cunha (1970), 32 geni 6 farklı kromozom üzerine yerleştirmiş; McCulley ve Roblnow (1971) sitogenetik analiz sonuçlarına dayanarak kromozom sayısının 5-7 arasında olduğunu ileri sürmüşlerdir. Gutz ve ark. (1974) ise *S.pombe*'nin 4 kromozom içerdiğini belirterek bu kromozomlar üzerinde 43 gen lokusunu göstermişlerdir. Kohli ve ark. (1977) tarafından yapılan kapsamlı genetik haritalama çalışmaları sonucunda, *S.pombe*'de 3 bağlantı grubunun bulunduğu ve bu

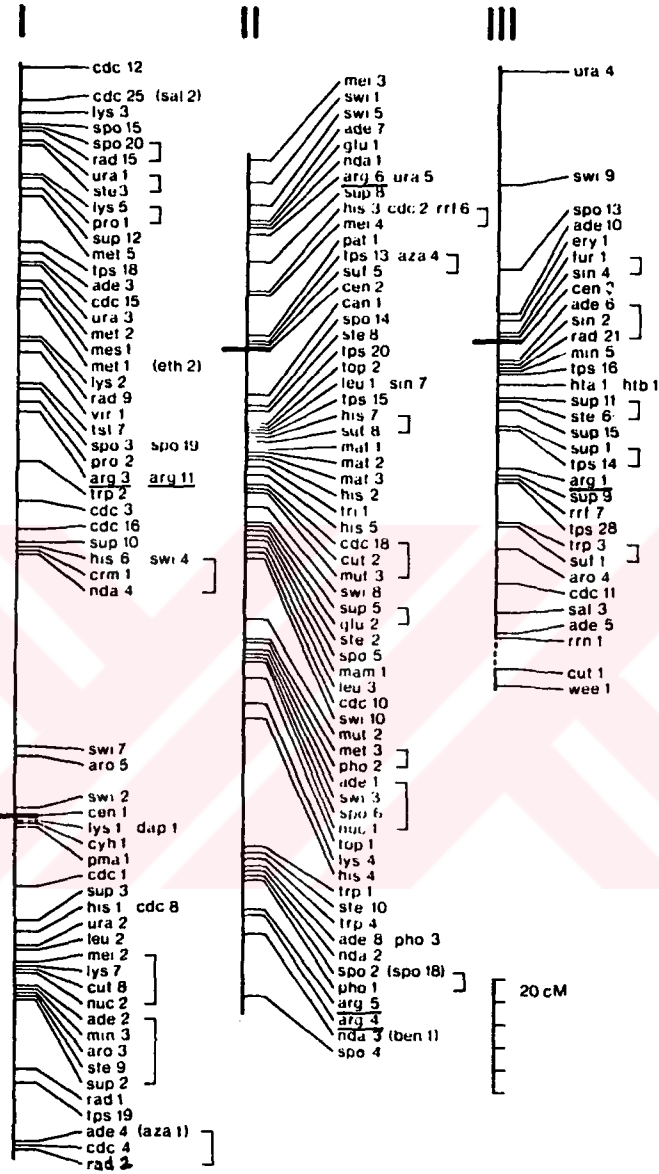
nedenle genomun 3 kromozomdan meydana geldiği ortaya konmuştur. Günümüzde *S.pombe*'nin genlerinden 460 tanesi saptanmıştır. Bunların 270'i genetik yöntemlerle haritalanmıştır (Kohli, 1987).

Bu çalışmanın konusunu oluşturan arginin biyosentezi ile ilişkili genler hakkındaki bilgiler, özellikle *Saccharomyces cerevisiae* ve *Neurospora crassa*'da yapılan ayrıntılı çalışma sonuçlarına dayanmaktadır. Bu araştırmalardaki bulgulara göre maya ve küf mantarı gibi basit ökaryotlarda arginin biyosentezi 9 kademedен oluşan bir reaksiyon zinciri ile gerçekleşir (Tablo 1).

Tablo 1- *S.pombe*'de arginin biyosentezi kademeleri ve ürünleri saptanmış genler.



S.pombe'de bu biyosentez yoluna ilişkin **Leupold (1958)** tarafından izole edilen 7 mutantın karakterizasyonunu **All (1967)** gerçekleştirmiş ve bu çalışmalar sonucunda arg1,2,3,4,5,6 olarak adlandırılan 6 lokus tanımlanmıştır. Daha sonra **Kohli ve ark. (1977)** tarafından gerçekleştirilen genetik çalışmalarda bu biyosentez yolu ile ilişkili 10 adet farklı arginin mutanı kullanılmış ve bunlar arasında 6 tanesinin (arg1-arg6) genetik haritadaki yerleri saptanmıştır. **Vissers ve Thurlaux (1985)** bu mutantlara arg11 mutantını ilave ederek bu genin kromozom üzerindeki yerini belirlemişler ve ayrıca arg1,3,4,5 ve 11'in gen ürünlerini saptamışlardır (Tablo 1). Buna göre **S.pombe**'de arginin biyosentezine ilişkin genlerden 6 tanesinin (arg1,3,4,5,6 ve arg11) genom üzerindeki yerleşim düzenleri kesin olarak saptanmıştır (Tablo 2). arg2 geninin ise II.kromozom üzerinde olduğu bilinmekle beraber, haritadaki kesin yeri belirlenmediği için bu gen Tablo 2'de yer almamaktadır.

Tablo 2- *S.pombe*'nin Genetik haritası

Bu çalışmada *S.pombe*'nin genetik haritadaki yeri henüz saptanmamış olan arginin genleri arasında arg7 ve arg10'un hangi kromozoma ait oldukları ve bu kromozomlardaki yerleşim bölgeleri saptanmaya çalışılmıştır.

II. MATERYAL VE METOD

A. MİKROORGANİZMA

Bu çalışmada, **Ascomycetes** sınıfından tek hücreli basit bir ökaryotik organizma olan **Schizosaccharomyces pombe** Lindner str. **Liquefaciens** (Osterwalder)'in 8 değişik suşu kullanıldı. Bu suşlara ait özellikler Tablo 3'de verildi. Tabloda verilmiş olan **arg10 h⁻**, **arg7 h⁻**, **lys1 h⁻**, **leu2 h⁺**, **ade6-M210** ve **mat2-B102** suşları **S.pombe**'nin 968 h⁹⁰, 972 h⁻⁹ ve 975 h⁺ⁿ suşları üzerindeki mutasyon çalışmalarından elde edilmişlerdir.

S.pombe'de 3 eşleşme tipi bilinmektedir. Eşleşme, heterotalik olan ve h⁺, h⁻ diye adlandırılanlarda sadece karşıt tipler arasında meydana gelebilmektedir. Homotalik olan ve h⁹⁰ olarak adlandırılan tip ise h⁺ ve h⁻ ile döllenemediği gibi kendi içinde de eşemli üreme yapabilmektedir (Leupold, 1970).

Kullanılan **arg10 h⁻** ve **arg7 h⁻** suşları İngiltere'den (National Collection of Yeast Cultures - Norwich), diğerleri ise İ.Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Maya Kültür Koleksiyonundan sağlandı. İkili mutantlar ise tez çalışması sırasında elde edildi.

Tablo 3- Çalışmada kullanılan *Schizosaccharomyces pombe* suşlarının özellikleri.

Suş	Özellikleri
972 h ⁻	Yabani tip
975 h ⁺	Yabani tip
arg10 h ⁻	Arginin gereksinimli
arg7 h ⁻	Arginin gereksinimli
lys1 h ⁻	Lizin gereksinimli
leu2 h ⁺	Lösin gereksinimli
mat2-B102	Mayoz bölünme kusurlu
ade6-M210	Adenin gereksinimli, 5-aminoimidazol ribonukleotid karboksilaz enzimi kusurlu.

B. BESİYERLERİ

Çalışmada kullanılan suşların üretilmesinde, **Gutz ve ark. (1974)**'nin önerdikleri besiyerleri kullanıldı. Besiyerlerinin kullanım amaçları ve formülleri aşağıda verildi.

Vegetatif üreme için kullanılan besiyerleri:

Maya ekstreli katı besiyeri (YEA)

% 0.5 Maya ekstresi (Yeast extract, Difco)

% 3.0 Glukoz (Merck)

% 2.0 Agar (Difco)

Maya ekstreli sıvı besiyeri (YEL)

% 3.0 Glukoz (Merck)

% 0.5 Maya ekstresi (Yeast extract, Difco)

Genotip tayini için kullanılan besiyeri:

Minimal katı besiyeri (MMA)

Stok A ₂	100 ml/l
Stok 3 _a	1 ml/l
Stok 3 _b	1 ml/l
Glukoz	10 g/l
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	1 g/l

Minimal besiyerinde kullanılan stok çözeltiler aşağıda gösterildiği şekilde hazırlandı:

Stok A₂

KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.5 g
NaCl	0.1 g
CaCl ₂ .6 H ₂ O	0.15 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
A ₁	1 ml
Destile su	100 ml

Stok A₁

H ₃ BO ₄	54 mg
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	4 mg
KI	10 mg
FeCl ₃ . 6 H ₂ O	20 mg
MnSO ₄ . 4 H ₂ O	53 mg
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	19.5 mg
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	40 mg
Destile su	100 ml

Stok 3a

Kalsiyum pantotenat	100 mg
Nikotinic asit	1 g
Meso-inositol	1 g
Destile su	100 ml

Stok 3b

Biotin	1 mg
% 50 etil alkol	100 ml

Çaprazlama ve spor oluşumu amacıyla kullanılan besiyerleri:

Sentetik sporulasyon katı besiyeri (SPA)

Glukoz	10 g
KH ₂ PO ₄	1 g
3a	1 ml
3b	1 ml
Agar	30 g
Destile su	1000 ml

Malt ekstrelili katı besiyeri (MEA)

Malt ekstresi (Malt extract, Difco)	30 g
Agar	20 g
Destile su	1000 ml

Minimal katı besiyerine eklenen metabolitler:

Uygun metabolitler final konsantrasyonları 50 mg/l olacak şekilde minimal katı besiyerine eklendi ve besiyerinin pH'sı IN NaOH veya 2N H₃PO₄ kullanılarak 5.7'ye ayarlandı.

Diploid ve haploid hücreleri ayırt etmek amacıyla, MMA'ya final konsantrasyonu 20 mg/l olacak şekilde magdala kırmızısı (Phloxin B) ilave edildi.

Haploidizasyonu teşvik için kullanılan m-florofenilalanin besiyerine final konsantrasyonu 500 mg/l olacak şekilde eklendi.

Tüm besiyerleri otoklavda 121°C'da (1 atmosferde) 20 dakika tutularak, kullanılan metabolitler 0.22 µm por açıklığına sahip millipore (millex - GS) filtre ile steril edildiler.

C. SUŞLARIN SAFLIK KONTROLU VE SAKLANMASI

Çalışmada kullanılan suşlar silikajel (Merck, çap : 0.2 - 0.5 mm) içinde, +4°C'da saklanan (Gutz ve ark., 1974) stoklardan alındı. Zengin besiyerine ekilen 3 günlük kültürlerden tek koloni elde etmek için azaltma yöntemiyle YEA'ya ekim yapıldı.

1. Haploid Hücrelerin Saflaştırılması:

Çalışma süresince haploid hücreler zaman zaman saflaştırıldı. Bunun için suşlar magdala kırmızısı (Phloxin B, 20 mg/l) içeren besiyerine azaltma yöntemi ile ekildi ve 3 gün 30°C'da üretildi. Magdala kırmızısına karşı sadece ölü hücreler geçirgen olduğundan kolonilerin renginin koyuluğu, içerdikleri ölü hücrelerin oranına bağlıdır (Schupbach, 1971). Diploid kolonilerin koyu kırmızı, haploid kolonilerin ise pembe renkli oldukları bilindiğinden (Gutz ve ark., 1974), pembe renkli koloniler saf haploid hücreler olarak seçildi.

2. Eşleşme Tipinin Saflaştırılması

Eşleşme tipinin saflığı kontrol edilecek koloniler azaltma yöntemi ile MEA'ya ekildi, 3 gün 30°C'da üremeden sonra iyot buharı ile muamele edildi. Bunun için koloni içeren petriyerler, içinde birkaç iyot kristali bulunan cam kap üzerine ters çevrilerek yerleştirildi. Cam kap iyot buharı oluşuncaya kadar ısıtıldı ve koloniler yaklaşık 2-3 saniye iyot buharına tutuldu. h^{+n} koloniler sarı, h^{90} koloniler ise siyah renk oluşturduğundan dolayı sarı renkli koloniler seçildi.

3. Genotip Saflaştırılması

Azaltma yöntemiyle ekim yapılan petrilere gözlenen kolonilerden birkaçı genotip kontrolü için seçici besiyerlerine alındı. Kontrolü yapılacak işaret genini taşıyan her suş için ayrı ayrı seçici besiyerleri hazırlandı. Minimal besiyerinde üremeyen fakat metabolit ilaveli besiyerinde üreyen kolonilerden eğri YEA'ya ekim yapıldı, 3 gün 30°C'da üretildi.

Kültürler +4°C'da saklandı ve çalışma süresince ayda bir kere pasajları, zaman zaman da saflık kontrolleri yapıldı.

D. GENETİK YÖNTEMLER

1. Eşleşme Tipinin Tayini

Kullanılacak suşun eşleşme tipini saptamak için stoklardan alınan örnekler, eşleşme tipi bilinen yabancı suşlarla (975h⁺ ve 972 h⁻) replikasyon yöntemi ile çaprazlandı. Bu amaçla, daha önce YEA'ya çizgi şeklinde ekilerek üretilen suşlar MEA üzerinde birbirine dikey gelecek şekilde çaprazlandı. 25°C'da 5 gün bırakıldıktan sonra MEA'lı petrilere iyot buharına tutulduğunda karşıt eşleşme tipindeki suşla birleşip spor meydana getirenler koyu kahverengi görünüm almakta; buna karşılık aynı eşleşme tipinde oldukları için döllenmeyenler sarı renkli olmaktadır (Leupold, 1970).

2. İkili Mutantların Elde Edilmesi:

İkili mutantlar elde etmek amacıyla, farklı işaretli genleri taşıyan suşlar ayrı ayrı eğri YEA üzerine ekilerek 3 gün 30°C'da üretildi. Daha sonra 5 ml destile su ile süspansiyon haline getirildi ve her iki suşa ait süspansiyondan alınan 0.1 ml'lik örnekler eğri SPA üzerinde karıştırıldı. 3 gün 25°C'da tutulduktan sonra Fonbrune tipi (Şekil 1) bir mikromanipülatör yardımıyla ayrılan askosporlar YEA üzerinde koloniler oluşturduktan sonra replikasyon yöntemi ile seçici besiyerlerine geçirilerek genotipleri tayin edildi ve bu kolonilerden ikili mutant olanlar

seçildi. Bu mutantların eşleşme tipleri yukarıda anlatıldığı şekilde saptandı.



Şekil 1- Fonbrune tipi bir mikromanipülâtör.

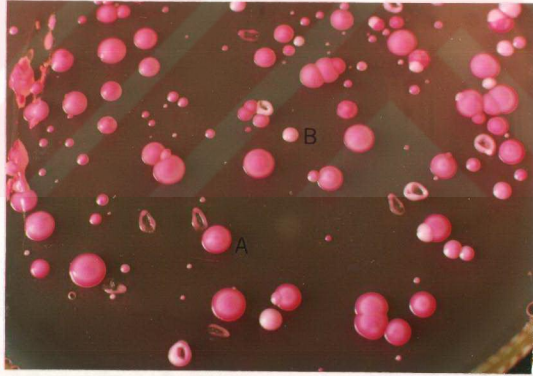
3. Stabil Diploidlerin Elde Edilmesi:

Diploid hücrelerin sporulasyon geçirmesini engellemek maksadıyla mat2-B102 mutanlığı kullanıldı; bu suş h^{90} ve h^{+n} suşları ile eşleşebilir ve spor oluşturur. Buna karşılık aynı genotipe sahip bireyle ve h^{-} suş ile de eşleşebilir fakat meydana gelen zigot mayoz geçiremez (Egel, 1973).

Gerekli işaret genlerini taşıyan mat2-B102 ile h^{-} haploid suşlarının YEA'da üretilen 3 günlük eğri kültürleri, mililitresinde 10^8 hücre bulunacak şekilde destile su ile süspansiyon haline getirildi. Farklı suşları içeren her bir tüpten eşit hacim alınıp bir tüpte karıştırıldıktan sonra karışımdan 0.1 ml alındı ve eğri SPA üzerine ekildi. Zigot oluşumu için 3 gün 25°C 'da bırakıldı. Bu kültürün 10^{-1} ve 10^{-2} sulandırılmalarından 0.1 ml alınıp magdala kırmızısı içeren minimal besiyerine yayma yöntemi ile ekim yapıldı ve 5 gün 30°C 'da üremeye bırakıldı.

4. Haploidizasyon

Elde edilen stabil diploidlerin haploid hale geçmeleri sağlandı ve dölün analizi yapıldı. Haploidizasyon, **Kohli ve ark. (1977)**'nin önerdiği şekilde yapıldı. Tek bir stabil diploid koloni, kromozom kaybını teşvik eden m-florofenilalanin içeren (**Adondi ve Heslot, 1970**) eğri minimal besiyerine ekildi. Bu besiyerine m-florofenilalaninin yanısıra, oluşacak çeşitli haploid hücrelerin üremesini sağlamak için gerekli metabolitler (arginin, lizin, adenin) de eklendi. 5 gün boyunca 30°C'da bırakılan kültür destile su ile 10^{-2} ve 10^{-3} oranında sulandırıldı, her bir sulandırmadan alınan 0.1 ml'lik örnekler MR ve metabolit içeren zengin besiyerli petrilere yayma yöntemi ile ekildi. Meydana gelen pembe renkli haploid kolonilerden (Şekil 2) en az 100 tanesi farklı kombinasyonlarda metabolitleri içeren besiyerlerine steril kürdanla aktarıldı.



Şekil 2- Diploid ve haploid kolonilerin YEA+MR'li petrideki görünüşleri.

A:Diploid koloni B:Haploid koloni

Elde edilen farklı genotipler incelendi ve genler arasındaki ayrışımın bağlantılı ya da bağımsız olduğuna, "2x2 contingency" testi (**Snedecor ve Cochran, 1967**) ile karar verildi.

'2x2 contingency' testi:

$$x^2 = \frac{[|(ABxab) - (aBxAb)| - (\frac{1}{2}N)]^2 \times N}{n_1 \times n_2 \times n_3 \times n_4}$$

AB= A ve B genini birlikte taşıyanların sayısı

ab= a ve b genini birlikte taşıyanların sayısı

aB= a ve B genini birlikte taşıyanların sayısı

Ab= A ve b genini birlikte taşıyanların sayısı

N = Toplam birey sayısı

n₁ = AB + aB birey sayısı

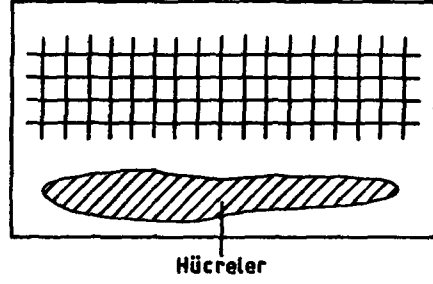
n₂ = Ab + ab birey sayısı

n₃ = AB + Ab birey sayısı

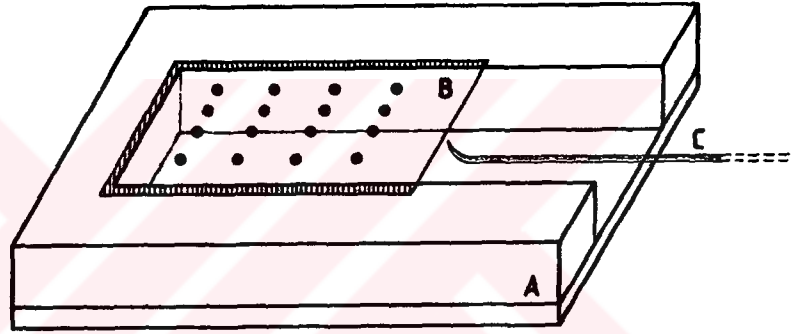
n₄ = aB + ab birey sayısı

5. Tetrad Analizi

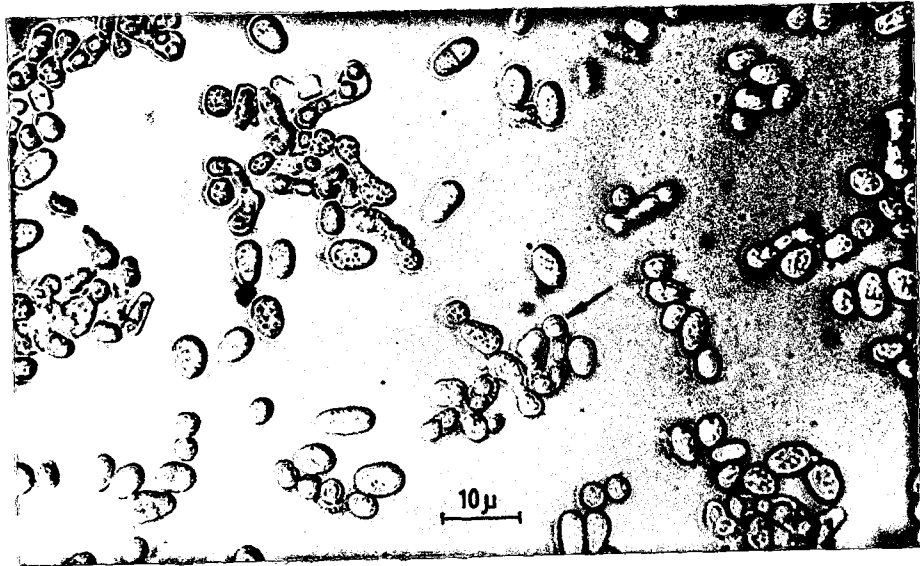
Uzaklık tayini yapılacak genleri taşıyan suşlar, aynı kromozomda bulunan işaret genlerini taşıyanlarla çaprazlandı ve askus oluşumu için 3 gün 25°C'da bırakıldı. Bu sürenin sonunda, henüz çeperleri patlamamış askuslardan hazırlanan süspansiyon, zengin besiyeri içeren lamel üzerine (Şekil 3) yayılarak pleksiglastan yapılmış (7.5cm x 3.5cm x 1.0cm) özel diseksiyon odalarına (Şekil 4) yerleştirildi. Askuslar (Şekil 5), mikromanipülatör yardımıyla mikroskop altında ve her diseksiyon odasına yaklaşık 15 tetrad düşecek şekilde belirli aralıklarla YEA üzerine yerleştirildi, 30°C'da 2-3 saat bırakılarak çeperlerin patlaması beklendi. Her bir tetrada ait askosporlar mikromanipülatör ile belirli aralıklarla dizilip, yeniden 30°C'lik etüve konuldu. 2-3 gün sonra, bu askosporlardan üreyen koloniler steril kürdanlarla zengin besiyerine ve burada üredikten sonra da replikasyon yöntemi ile metabolit(ler) içeren minimal besiyerlerine ekilerek, genotipleri incelendi.



Şekil 3- İnce agar üzerindeki hücrelerden askusları ayırmak için kullanılan lamel (şematik)



Şekil 4- Askusları ayırmak için kullanılan düzenek
A. Pleksiglastan yapılmış diseksiyon odası
B. İnce agar yayılmış lamel
C. Ayırma işleminde kullanılan cam iğne.



Şekil 5- Askusların ve vejetatif hücrelerin morfolojisi. Askuslar ok işareti ile gösterilmektedir.

Askuslar, ana-baba'ya ait karakterleri taşıyan (PD), ana-babadan farklı karakterleri taşıyan (NPD) ve hem ana-baba hem de farklı karakterleri taşıyan (T) tetradlar olmak üzere 3 farklı grup halinde ele alındı.

Bu üç değişik tipin ortaya çıkma frekansları, işaret genleri ile uzaklık tayini yapılacak genin aynı kromozom üzerinde olup olmadıklarını, eğer aynı kromozom üzerinde ise aralarındaki mesafeyi tayin etmeye olanak verdi. Bu frekanslar arasındaki orantılar aşağıda gösterildi.

<u>PD</u>		<u>NPD</u>		<u>T</u>	
1	:	1	:	4	Bağlantı yok
>1	:	<1			Bağlantı var
1	:	1	<	4	Genler sentromere çok yakın

Bağlantı gösteren genler arasındaki uzaklığın belirlenmesinde;

$$100 \times \frac{6(NPD) + T}{2(PD + NPD + T)} = cM$$

formülünden yararlanıldı (Perkins, 1949). Formülde 1 cM, %1 frekansındaki rekombinasyonu göstermektedir.

III. BULGULAR

A. arg10 GENİNİN YERLEŞİMİ

arg10 geninin hangi kromozomda olduğunu saptamak üzere I. kromozoma ait lys1 (Kohli ve ark., 1977), II. kromozoma ait mat2 (Beach, 1983; Shimoda ve ark., 1985), III. kromozoma ait ade6 (Gutz ve ark., 1974; Gygax ve Thurlaux, 1984) işaret genlerini taşıyan stabil diploidler oluşturuldu. arg10 lys1 h⁻ / mat2 - B102 ade6 - M210 genotipinde olan bu diploid zigotun haploidizasyonu ile elde edilen bulgular Tablo 4'de gösterildi.

Tablo 4- arg10 lys1 h⁻/mat2-B102 ade6-M210 heterozigot diploidinin haploidizasyonundan elde edilen sonuçlar.

(a) Genotip (diploidin genotipi)

	I	II	III
	arg10	lys1	h-
	+	+	mat2-B102
			ade6-M210

(b) 104 haploid arasında 16 muhtemel genotipin gözlenen sayıları

Genotip	arg10	lys1	ade6	mat	Gözlenen sayı
1	+	+	+	h ⁻	11
2	+	+	+	mat2-B102	7
3	+	+	-	h ⁻	10
4	+	+	-	mat2-B102	15
5	+	-	-	h ⁻	4
6	+	-	-	mat2-B102	6
7	+	-	+	h ⁻	7
8	+	-	+	mat2-B102	5
9	-	+	+	h ⁻	0
10	-	+	+	mat-2B102	2
11	-	-	+	h ⁻	9
12	-	-	+	mat2-B102	10
13	-	+	-	h ⁻	0
14	-	+	-	mat2-B102	0
15	-	-	-	h ⁻	9
16	-	-	-	mat2-B102	9
Yabani tip allellerinin frekansları	%62.50	%43.26	%49.03	%48.07	104

(c) arg10 geninin sentromer işaret genleri ile bağlantılı olup olmadığının saptanması.

		lys1		Toplam	X ² =34.5 P<0.01 bağlantılı
arg10		+	-		
	+	43	22	65	
	-	2	37	39	
	Toplam	45	59	104	
		ade6		Toplam	X ² =0.3 P>0.05 bağlantı yok
arg10		+	-		
	+	30	35	65	
	-	21	18	39	
	Toplam	51	53	104	
		mat		Toplam	X ² =0.01 P>0.05 bağlantı yok
arg10		mat2-B102	h ⁻		
	+	33	32	65	
	-	21	18	39	
	Toplam	54	50	104	

+ Yabani tipi
- Mutant tipi ifade etmektedir.

"2x2 contingency" testi ile elde edilen Tablo 4- (c)deki verilerden, arg10 ile lys1 için P değeri < 0.01; arg10 ile ade6 için P değeri > 0.05; arg10 ile mat için ise P değeri > 0.05 olduğu görülmektedir. Bu verilere göre arg10 ile lys1 genlerinin bağlantılı olduğu, buna karşılık arg10 geninin ade6 ve mat genleri ile bağlantılı olmadığı ortaya çıkmaktadır. arg10 geninin lys1 ile bağlantı göstermesi, bu genin I. kromozom üzerinde olduğunu gösterir.

arg10 geninin I. kromozom üzerinde bulunduğu bölgeyi saptamak için bu kromozom üzerinde bulunan lys1 ve leu2 işaret genleri (Kohli ve ark., 1977) kullanıldı. Bu amaçla arg10 h⁻ suşu ile lys1 leu2 h⁺ ikili mutanti çaprazlandı ve tetrad analizi yapıldı. Tetrad analizi sonuçları Tablo 5'de verildi.

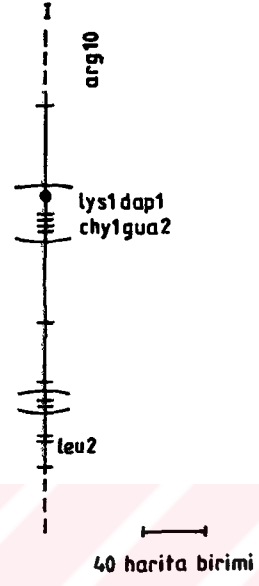
Tablo 5- arg10 geninin I. kromozom üzerinde bulunduğu bölgeyi gösteren tetrad analizi sonuçları.

Gen çifti	PD ^a	NPD ^a	T ^a	Harita uzaklığı ^b
arg10-leu2	143	100	193	90.9
arg10-lys1	173	63	200	66.2
lys1-leu2	113	35	288	57.1

a. PD: Ana-baba tipi, NPD: Ana-babadan farklı tip, T: Hem ana-baba hem de farklı karakterleri gösteren tip.

b. Perkins (1949)'e göre hesaplandı.

Tablodan da görüldüğü gibi, arg10 ile lys1 arasındaki mesafe lys1 ile leu2 arasındaki uzaklığa oldukça yakındır. Fakat arg10 ile leu2 arasındaki mesafenin oldukça büyük olması arg10 geninin I. kromozomun sağ kolu üzerinde olduğunu göstermektedir. Buna göre arg10 geninin I. kromozom üzerindeki lys1 ve leu2 genlerine göre konumunun aşağıda gösterilen biçimde olduğu söylenebilir (Şekil 6).



Şekil 6- *Schizosaccharomyces pombe*'de *arg10* geninin bulunduğu bölge. Koyu nokta sentromeri göstermektedir.

B. arg7 GENİNİN YERLEŞİMİ

arg7 geninin yerinin saptanmasında da arg10 için kullanılan işaret genlerinden (I. kromozom için lys1, II. kromozom için mat2, III. kromozom için ade6) yararlanıldı. Yine arg10 geninin yerinin saptanmasında izlenen yöntemler kullanılarak ikili mutantlar elde edildi. Bu ikili mutantlardan seçilen arg7 lys1 h⁻ tipi mat2 - B102 ade6 - M210 ile çaprazlandı ve diploid zigot oluşturuldu. Bu stabil diploid zigotların haploidizasyonu ile elde edilen 100 haploid koloniye ait bulgular Tablo 6'da verildi.

Tablo 6- arg7 lys1 h⁻ / mat2- B102 ade6-M210 heterozigot diploidinin haploidizasyonundan elde edilen sonuçlar.

(a) Genotip (Diploidin genotipi)					
	arg7	I lys1	II h ⁻	III +	
	+	+	mat2-B102	ade6-M210	
(b) 100 haploid arasında 16 muhtemel genotipin gözlenen sayıları .					
Genotip	arg7	lys1	ade6	mat	Gözlenen sayı
1	+	+	+	h ⁻	0
2	+	+	+	mat2-B102	0
3	-	-	+	mat2-B102	0
4	-	-	+	h ⁻	23
5	-	-	-	mat2-B102	6
6	-	-	-	h ⁻	26
7	+	-	+	mat2-B102	15
8	+	-	+	h ⁻	3
9	+	-	-	mat2-B102	22
10	+	-	-	h ⁻	4
11	+	+	-	mat2-B102	0
12	+	+	-	h ⁻	0
13	-	+	+	mat2-B102	0
14	-	+	+	h ⁻	0
15	-	+	-	mat2-B102	0
16	-	+	-	h ⁻	1
Yabani tip allellerinin frekansları	%44	%1	%41	%57	100

+ Yabani tipi

- Mutant tipi ifade etmektedir.

(c) arg7 geninin sentromer işaret genleri ile bağlantılı olup olmadığına saptanması.

		lys1			
		+	-	Toplam	
arg7	+	0	44	44	$\chi^2=0.014$
	-	1	55	56	$P>0.05$
Toplam		1	99	100	bağlantı yok

		ade6			
		+	-	Toplam	
arg7	+	18	26	44	$\chi^2=0.035$
	-	23	33	56	$P>0.05$
Toplam		41	59	100	bağlantı yok

		mat			
		mat2-B102	h ⁻	Toplam	
arg7	+	37	7	44	$\chi^2=54.1$
	-	6	50	56	$P<0.01$
Toplam		43	57	100	bağlantılı

Contingency testi ile elde edilen Tablo 6 (c)'de arg7 ile lys1 için P değeri >0.05 ; arg7 ile ade6 için P değeri >0.05 ; arg7 ile mat için P değeri <0.01 olduğu görülmektedir. P değerinin 0.05'ten büyük olması, sözkonusu genler arasında bağımsız ayrışımı gösterdiği için, arg7-ade6 ve arg7-lys1 gen çiftleri arasında bağlantının olmadığı, buna karşın arg7 ile mat geni arasında bağlantı bulunduğu ortaya çıkmaktadır.

Bu sonuçlara göre arg7 geni, mat geninin yer aldığı II. kromozom üzerinde bulunmaktadır.

IV. TARTIŞMA

Aynı metabolik yola ait enzimleri şifreleyen genler prokaryotlarda operon biçiminde gruplandıkları halde, ökaryotik genomlarda genellikle ayrı ayrı bölgelerde lokalize olmuşlardır. Basit bir ökaryotik organizma olan *S.pombe*'de de arginin biyosentezine ilişkin genlerden şimdiye kadar genetik haritada yerleri saptanmış olanların, genomda birbirlerinden bağımsız oldukları bilinmektedir (Kohl ve ark., 1977; Vissers ve Thurlaux, 1985). Bu çalışmada da *arg7* geninin II. kromozom, *arg10* geninin ise I. kromozom üzerinde olduğunun saptanması yukarıda anlatılan özelliğe uygunluk göstermektedir.

arg10 geninin I.kromozomdaki gerçek yerleşim bölgesinin bulunmasına ilişkin tetrad analizi sonuçlarına göre Tablo 5'de verilen *lys1-leu2* arasındaki uzaklık birimi ile ilgili değer Oraler ve ark. (1990)'nın elde ettiği değer ile uygunluk göstermesi, *arg10-leu2* ve *arg10-lys1* için elde edilen verilerin güvenilir olduğunu ortaya koymaktadır. Bu sonuçlara göre bulunan *arg10-leu2* arasındaki 90.9 cM'lık uzaklık, bize bu genin I.kromozomun sağ kolu üzerinde yer aldığını düşündürmektedir. Bununla beraber iki gen arasındaki uzaklığın 70-75 cM'dan fazla

olduğunun saptanması durumunda, gerçek yerin kesin olarak belirlenebilmesi için bu gene daha yakın işaret genleri kullanarak mesafe belirlenmesi gereklidir (Perkins, 1949). Buna göre I.kromozomun sağ kolu üzerinde bulunan arg10 genine yakın yerleşim gösteren işaret genlerini içeren suşlarla yapılacak ek çaprazlamalar ve tetrad analizleri genin kesin yerinin saptanmasını sağlayacaktır.

Bu çalışmada arg7 geninin II.kromozom üzerinde bulunduğu saptandı. Aynı Şekilde bu genin kesin yerleşim bölgesinin saptanabilmesi için bu kromozomda bulunan çeşitli işaret genlerini taşıyan suşları kullanarak çaprazlama ve tetrad analizleri sürdürülmektedir.

S.pombe'nin genetik haritasında arg7 ve arg10 genlerinin ilk kez tarafımızdan saptanmış olmasının, bu organizmanın genetik haritasının tamamlanmasına ve arginin biyosentezine ilişkin genetik çalışmalara yardımcı olacağı düşünülmektedir.

V. ÖZET

Bu çalışmada, ökaryotik bir mikroorganizma olan **Schizosaccharomyces pombe**'nin arginin biyosentez yolu enzimlerini sifreleyen genlerden, **arg7** ve **arg10**'un genetik haritalaması yapıldı.

Genetik haritalama için haploidizasyon ve tetrad analizi yöntemleri kullanıldı. Haploidizasyon **arg lys** ikili mutanrı ile mayoz kusurlu bir mutant arasındaki çaprazlamadan elde edilen diploid hücrelerde gerçekleştirildi.

arg10 geninin I.kromozomun sağ kolu, **arg7** geninin ise II.kromozom üzerinde olduğu belirlendi.

arg7 geninin II.kromozom üzerindeki gerçek yerinin belirlenmesi için tetrad analizi çalışmaları halen sürdürülmektedir.

VI. SUMMARY

In this study, the location of the *arg7* and *arg10* genes encoding enzymes for arginin biosynthetic pathway in *Schlzosaccharomyces pombe*, an eucaryotic microorganism, on the chromosomal map were identified.

For genetic mapping, haploidization and tetrad analysis methods were employed. The haploidization was carried out on diploid cells obtained from crosses between a meiosis-deficient mutant and *arg lys* double mutants.

It was found that the *arg10* gene is on the right arm of the chromosome I and the *arg7* gene on the chromosome II.

Tetrad analysis studies are being continued in order to determine the exact location of *arg7* gene on chromosome II.

VII. KAYNAKLAR

- ADONDI, G. and HESLOT, H. (1970): Etude des conversions mitotiques au niveau du gène ad-9 de **Schizosaccharomyces pombe**. *Mutation Res.* 9: 41-58.
- ALİ, A.M.M. (1967): Biochemical characterization of arginine mutants in **Schizosaccharomyces pombe** and the possibility repression. *Can. J. Genet. Cytol.* 9: 462-472.
- BEACH, D. H. (1983): Cell type switching by DNA transposition in fission yeast. *Nature (London)*. 305: 682-688.
- EGEL, R. (1973): Genes involved in mating-type expression of fission yeast. *Mol. Gen. Genet.* 122: 339-343.
- FLORES DA CUNHA, M. (1970): Mitotic mapping of **Schizosaccharomyces pombe**. *Genet. Res.* 16: 127-144.
- GUTZ, H. and DOE, F.J. (1975): On homo-and heterothallism in **Schizosaccharomyces pombe**. *Mycologia*. 67: 748-759.
- GUTZ, H., HESLOT, H., LEUPOLD, U. and LOPRIENO, N. (1974): **Schizosaccharomyces pombe**. In "Handbook of Genetics" 1: 395-446, Edit. KING, R.C., Plenum Press, New York.
- GYGAX, A. and THURIAUX, P. (1984): A revised chromosome map of the fission yeast **Schizosaccharomyces pombe**. *Curr. Genet.* 8: 85-92.
- KOHLI, J., (1987): Genetic nomenclature and gene list of the fission yeast **Schizosaccharomyces pombe**. *Curr. Genet.* 11: 575-589.

- KOHLI, J., HOTTINGER, H., MUNZ, P., STRAUSS, A. and THURIAUX, P. (1977): Genetic mapping in **Schizosaccharomyces pombe** by mitotic and meiotic analysis and induced haploidization. *Genetics*. 87: 471-489.
- LEUPOLD, U. (1950): Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei **Schizosaccharomyces pombe**. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Physiol.* 24: 381-480.
- LEUPOLD, U. (1958): Studies on recombination in **Schizosaccharomyces pombe**. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 23: 161-170.
- LEUPOLD, U. (1970): Genetical methods for **Schizosaccharomyces pombe**. In "Methods in Cell Physiology" 4: 169-177, Edit. PRESCOTT, D. M., Academic Press, New York.
- LINDNER, P. (1893): **Schizosaccharomyces pombe** n. sp., ein neuer Gährerregere. *Wochenschr. Brau.* 10: 1298-1300.
- Mc CULLY, E. K. and ROBINOW, C. F. (1971): Mitosis in the fission yeast **Schizosaccharomyces pombe**: A comparative study with light and electron microscopy. *J. Cell Sci.* 9: 475-507.
- MEADE, J. H. and GUTZ, H. (1975): A new type of mutation in **Schizosaccharomyces pombe**: Vegetative iodine reaction. *Genetics*. 80: 711-714.
- MEADE, J. H. and GUTZ, H. (1976): Mating-type mutations in **Schizosaccharomyces pombe**. Isolation of mutants and analysis of strains with an h^- or h^+ phenotype. *Genetics*. 83: 259-273.

- ORALER, G., OLGUN, A. and KARAER, S. (1990): An addition to the chromosome map of **Schizosaccharomyces pombe**: the localization of *gua* genes. *Curr. Genet.* 17: 543-545.
- PERKINS, D. D. (1949): Biochemical mutants in the smut fungus **Ustilago maydis**. *Genetics.* 34: 607-626.
- RUSSELL, P. and NURSE, P. (1986): **Schizosaccharomyces pombe** and **Saccharomyces cerevisiae**: A look at yeasts divided. *Cell.* 45: 781-782.
- SCHÜPBACH, M., (1971): The isolation and genetic classification of UV- sensitive mutants of **Schizosaccharomyces pombe**. *Mutation Res.* 11: 361-371.
- SHIMODA, C., HIRATA, A., KISHIDA, M., HASHIDA, T., and TANAKA, K. (1985): Characterization of meiosis-deficient mutants by electron microscopy and mapping of four essential genes in the fission yeast **Schizosaccharomyces pombe**. *Mol. Gen. Genet.* 200: 252-257.
- SNEDECOR, G. W. and COCHRAN, W. G. (1967): Statistical methods, Iowa State University Press, Ames.
- THURIAUX, P., MINET, M., HOFER, F. and LEUPOLD, U. (1975): Genetic analysis of antisuppressor mutants in the fission yeast **Schizosaccharomyces pombe**. *Mol. Gen. Genet.* 142: 251-261.
- VISSERS, S., and THURIAUX, P. (1985): Genetical evidence of carbamoyl phosphate compartmentation in **Schizosaccharomyces pombe** and **Schizosaccharomyces japonicus**. *Curr. Genet.* 9: 561-565.