

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**BİR PERİSENTROMERİK ADAPTÖR PROTEİNİ OLAN ŞUGOŞİNİN MAYOZ
BÖLÜNME SIRASINDA OLUŞAN SİLİCİ PERİSENTROMERİK
KROSOVERLARI NASIL ENGELLEDİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

BEGÜMHAN YILMAZ KARDAŞ

DOKTORA TEZİ

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Serap DOĞAN (Tez Danışmanı)
Prof. Dr. Adele MARSTON (Eş Danışman)
Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI
Prof. Dr. Zeliha ERDOĞAN
Doç. Dr. Serap UZUNOĞLU
Dr. Öğr. Üyesi Ümran ALAN

BALIKESİR, TEMMUZ - 2020

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “BİR PERİSENTROMERİK ADAPTÖR PROTEİNİ OLAN ŞUGOŞİNİN MAYOZ BÖLÜNME SIRASINDA OLUŞAN SİLİCİ PERİSENTROMERİK KROSOVERLARI NASIL ENGELLEDİĞİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Begümhan YILMAZ KARDAŞ

(imza)



ÖZET

BİR PERİSENTROMERİK ADAPTÖR PROTEİNİ OLAN ŞUGOŞİNİN MAYOZ BÖLÜNME SIRASINDA OLUŞAN SİLİCİ PERİSENTROMERİK KROSOVERLARI NASIL ENGELLEDİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

BEGÜMHAN YILMAZ KARDAŞ

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. SERAP DOĞAN)

(EŞ DANIŞMAN: PROF. DR. ADELE MARSTON)

BALIKESİR, TEMMUZ - 2020

Hücre bölünmesi esnasında kromozomlar yeni oluşan hücrelere doğru biçimde paylaştırılmalıdır. Çünkü, bölünme esnasında oluşabilecek hatalar, Down sendromu gibi doğumsal hasarlarda görülen anöploidiye sebep olabilirler. Bu çalışmada, bir perisentromerik adaptör protein olan şugoşinin (Sgo1), kardeş kromatid kohesyonuna hasar verebilen ve anöploidi riskini arttırabilen silici perisentromerik krossoverların önlemedeki rolünün ve mekanizmasının araştırılması amaçlanmıştır. Basit ökaryotik organizmalarda bile dikkat çekici bir şekilde evrimsel olarak moleküler düzeyde korunan kromozom ayrılma mekanizmaları hakkında temel bilgiler elde etmek için, deneysel olarak izlenebilir maya hücreleri (*Saccharomyces cerevisiae*) model sistem olarak kullanılmıştır. Sgo1 ve efektör proteinlerin perisentromerik krossoverları önlemedeki rolünü araştırmak için, klonlama yöntemleri ve genetik analizler kullanılarak hedef geni susturulan ve/ veya istenilen mutasyonlara sahip suşların oluşturulmasından sonra floresan krossover haberci testi gerçekleştirilmiştir. Protein komplekslerinin perisentromerik lokalizasyonlarının analiz edilmesi için Sgo1 sekansında nokta mutasyonları oluşturulmuş (D519N ve P390H) iki farklı suş kullanılarak kromatin immünopresipitasyonu gerçekleştirilmiştir. Mitoz ve mayoz sırasında komplekslerin perisentromere çekilme sürecinin de tespiti floresanlı canlı hücre görüntülemeleri ile sağlanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, Sgo1'in efektör proteini olan protein fosfataz 2A'yı perisentromere çekerek perisentromerik krossoverları önlediği ve her ikisinin de erken mayoz bölünmede eksprese edildikleri belirlenmiştir. Sgo1'in diğer efektör proteinlerinin (kondensin ve/ veya Aurora-B gibi) perisentromerik krossover önlemedeki rolleri bulunamamıştır ama incelenen iki farklı nokta mutasyonunun Sgo1'in sentromerik lokalizasyonunun bozulmasına sebep olduğu deşifre edilmiştir. Ayrıca Sgo1'in, perisentromerik krossoverları bir kohesin ayırma faktörü olan Rad61 / Wpl1'e karşı koyarak önlemediği sonucuna da ulaşılmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Şugoşin, perisentromer, krossover, anöploidi.

Bilim Kodları : 20316, 20326, 20606, 20610

Sayfa Sayısı : 91

ABSTRACT

INVESTIGATION OF HOW THE PERICENTROMERIC ADAPTOR PROTEIN, SHUGOSHIN, PREVENTS DELETERIOUS PERICENTROMERIC CROSSOVERS DURING MEIOSIS

PH.D THESIS

BEGUMHAN YILMAZ KARDAS

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. SERAP DOGAN)

(CO-SUPERVISOR: PROF. DR. ADELE MARSTON)

BALIKESİR, JULY - 2020

Chromosomes must be accurately partitioned to daughter cells during cell division because errors in this process cause aneuploidy seen in birth defects like Down's Syndrome. This study aims to understand the role and mechanisms of the pericentromeric adaptor protein, shugoshin (Sgo1), to prevent deleterious pericentromeric crossovers which can cause disturbance in sister chromatid cohesion and an increased risk of aneuploidy. To gain fundamental insight into mechanisms of chromosome segregation which are remarkably conserved, even in simple eukaryotic organisms at the molecular level, the experimentally tractable yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) was used as a model system. To investigate the role of Sgo1 and effector proteins to prevent pericentromeric crossovers, fluorescent crossover reporter assay was used after development of yeasts with target gene knockout and/ or mutations by using cloning methods and genetic analyses. Chromatin immunoprecipitation was performed to analyze recruitment of protein complexes to the pericentromere using two different strains with point mutations in Sgo1 sequence (D519N and P390H). Fluorescent live cell imagings were also done to monitor recruitment of complexes to the pericentromere during mitosis and meiosis. According to the results, it was concluded that Sgo1 prevents pericentromeric crossovers by recruiting its effector protein protein phosphatase 2A to the pericentromere and it was determined that they are both expressed in early meiosis I. Although the exact mutation in Sgo1 causing a defect only recruiting other possible effector proteins like condensin and/or Aurora-B to centromere couldn't be found, it was deciphered that two different point mutations studied here caused a disrupted localization of Sgo1 to centromere. It was also observed that Sgo1 does not prevent pericentromeric crossovers by counteracting the cohesin removal factor, Rad61/Wpl1.

KEYWORDS: Shugoshin, pericentromere, crossover, aneuploidy.

Science Codes : 20316, 20326, 20606, 20610

Page Number : 91

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO LİSTESİ	vi
KISALTMALAR LİSTESİ	vii
1. GİRİŞ	9
1.1 Hücre Döngüsü	9
1.2 Mitoz Bölünme	10
1.2.1 Mitoz Bölünme Esnasında Kardeş Kromatid Kohezyonu	10
1.2.2 Kromozomların Metafaz Plakasına Yerleşmesi.....	11
1.2.3 Anafaz.....	12
1.2.4 Mitozun Bitişi	12
1.3 Mayoz Bölünme.....	14
1.3.1 Mayoza Giriş.....	15
1.3.2 Pre-mayotik S Fazı.....	15
1.3.3 Profaz I.....	16
1.3.3.1 Mayotik Rekombinasyon	16
1.3.3.2 Perisentromerik Krossoverların Zararları	17
1.3.4 Perisentromerik Kohezyonun Sağlanmasında Şugoşin Proteinin Görevi.....	18
1.3.5 Homolog Kromozomların Mono-Oryantasyonu.....	19
1.3.6 Mayoz I'den Mayoz II'ye Geçiş	19
1.3.7 Mayoz II.....	20
2. AMAÇ VE KAPSAM	21
3. MATERYAL VE METOT	24
3.1 Sterilizasyon.....	24
3.2 Bakteriyel Metotlar	24
3.2.1 Bakteri Suşları.....	24
3.2.2 Bakteri Besiyeri ve İlaçları	24
3.2.3 Bakterilerin Büyütülmesi	25
3.2.4 Bakterilerin Saklanması	25
3.2.5 XL10-Gold <i>E. coli</i> Transformasyonu	25
3.2.6 Kimyasal Kompetan DH5 α <i>E. coli</i> Transformasyonu	25
3.3 Tomurcuklanan Maya Metotları	26
3.3.1 Tomurcuklanan Maya Suşları ve Kökenleri	26
3.3.2 Tomurcuklanan Maya Besiyeri ve İlaçları.....	31
3.3.3 Tomurcuklanan Mayalarda Vejetatif Büyüme.....	33
3.3.4 Nocodazole ile Metafaz Evresinde Tutuklanan Hücrelerin Büyütülmesi.....	33
3.3.5 Benomil Hassasiyeti Testi.....	34
3.3.6 Tomurcuklanan Mayaların Mayoz Bölünme için Büyütülmesi.....	34
3.3.7 Tomurcuklanan Mayaların Saklanması	34
3.3.8 Tomurcuklanan Mayalar için Yüksek Verimli Transformasyon	34
3.3.9 Tomurcuklanan Maya Suşu Oluşturma.....	35

3.3.9.1 Tomurcuklanan Maya Suşlarının Sporlanma veya Diploid Oluşturma Amacıyla Çaprazlanması.....	35
3.3.9.2 Tetrad Diseksiyonu.....	36
3.4 DNA Metotları.....	36
3.4.1 Çalışmada Kullanılan Plazmidler.....	36
3.4.2 Mini-prep Yöntemiyle <i>E. coli</i> 'den Plazmid İzolasyonu.....	37
3.4.3 Midi-prep Yöntemiyle <i>E. coli</i> 'den Plazmid İzolasyonu.....	38
3.4.4 Tomurcuklanan Mayadan Genomik DNA İzolasyonu.....	38
3.4.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Protokolleri.....	39
3.4.5.1 ExTaq DNA Polimeraz Kullanılarak Gerçekleştirilen PCR.....	39
3.4.5.2 Q5 DNA Polimeraz ile Gerçekleştirilen PCR.....	40
3.4.5.3 Maya Koloni PCR.....	40
3.4.5.4 Kuantitatif PCR (qPCR).....	41
3.4.6 PCR Pürifikasyonu.....	43
3.4.7 Agaroz Jel Elektroforezi.....	43
3.4.8 Etanol Presipitasyonu.....	44
3.4.9 Klonlama.....	44
3.4.9.1 Gibson Assembly Tekniği ile Klonlama.....	44
3.4.9.2 Yönlendirilmiş Mutagenizasyon.....	44
3.4.10 DNA'nın Sekanslanması.....	45
3.4.10.1 Plazmid DNA'sının Sekanslanması.....	45
3.4.10.2 Maya gDNA'sının Sekanslanması.....	46
3.5 Protein Metotları.....	47
3.5.1 Protein İzolasyonu.....	47
3.5.2 SDS- PAGE.....	48
3.5.3 Western Blot.....	49
3.5.4 Kromatin İmmünopresipitasyonu (ChIP).....	50
3.6 Mikroskopi Metotları.....	52
3.6.1 Etanol Fiksasyonu ve DAPI Sayımı.....	52
3.6.2 Floresan Krossover Haberci Testi.....	52
3.6.3 Floresan Mikroskopu ile Canlı Hücre Görüntüleme.....	53
3.6.3.1 İbidi Plakalarının Hazırlanması.....	53
3.6.3.2 Mitoz Bölünmenin Canlı Görüntülenmesi.....	53
3.6.3.3 Mayoz Bölünmenin Canlı Görüntülenmesi.....	54
3.7 İstatistik.....	55
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	56
4.1 Şugoşin (Sgo1) ve Protein Fosfataz 2A (PP2A) Perisentromerik Krossoverları Engellemektedir.....	56
4.2 Sugoşin (Sgo1) Perisentromerik Krossoverları Bir Kohezin Ayırma Faktörü Olan Rad61/Wpl1'e Karşı Koyarak Gerçekleştirmez.....	59
4.3 P390H ve D519N Mutasyonları Şugoşinin (Sgo1) Perisentromerik Lokalizasyonuna Zarar Vermektedir.....	62
4.4 Şugoşin (Sgo1) ve Protein Fosfataz 2A (PP2A) Erken Mayoz-I'de Eksprese Olmaktadır.....	73
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	77
6. KAYNAKLAR.....	79
ÖZGEÇMİŞ.....	89

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 4.1:** Perisentromerik aralıkta (*a*) ve kromozom kol aralığında (*b*) gerçekleştirilen floresan krossover haberci testinin temsili anlatımı. 57
- Şekil 4.2:** Floresan krossover haberci test sonuçları ($p < 0.05$, * olarak gösterilmiştir). 61
- Şekil 4.3:** P390H ve D519N mutasyonlarına sahip Sgo1 proteinlerinin sentromerik lokalizasyonlarındaki değişiklikler için gerçekleştirilen araştırmanın temsili anlatımı. 63
- Şekil 4.4:** ChIP testi qPCR sonuçları ($p < 0.05$, * olarak gösterilmiştir) (*a*), DAPI sayım sonuçları (*b*), sonikasyon verimi ve western blot görüntüleri (*c*). 66
- Şekil 4.5:** G1 safhasında tutuklandıktan sonra hücre döngüsüne senkronize olarak gönderilen hücrelerin floresan mikroskobu ile elde edilen görüntüleri. 70
- Şekil 4.6:** Hücrelerin floresan mikroskobu ile elde edilen görüntülerindeki ortalama perisentromerik ışımaya şiddeti ($p < 0.05$, * olarak gösterilmiştir) (*a*), sinyal süresi (*b*) ve kinetokor ayrılma zamanı karşılaştırmaları (*c*). 71
- Şekil 4.7:** Benomil hassasiyeti test sonuçları. 72
- Şekil 4.8:** *pCUP1-IME1/IME4* tutuklama/serbest bırakma testinin temsili zaman çizelgesi. 75
- Şekil 4.9:** *pCUP1-IME1/IME4* tutuklama/serbest bırakma testi ile elde edilen floresan mikroskobu görüntüleri (*a,b*), kinetokor dağılımından sonra geçen zaman (*c*) ve kinetokor ayrılmasına kadar gözlenen GFP sinyal süresi (*d*). 76

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1: Kullanılan <i>E.coli</i> suşları.	24
Tablo 3.2: Bakteri besiyerleri ve içerikleri.	24
Tablo 3.3: <i>S. cerevisiae</i> suşları.	26
Tablo 3.4: Tomurcuklanan maya besiyeri içerikleri.	31
Tablo 3.5: Tomurcuklanan maya besiyerlerinde kullanılan ilaçlar/ kimyasallar.	33
Tablo 3.6: Tomurcuklanan mayalarda gerçekleştirilen yüksek verimli transformasyon solüsyonları.	34
Tablo 3.7: Plazmid listesi.	36
Tablo 3.8: Mini-prep ve midi-prep yöntemlerinde kullanılan solüsyonlar ve içerikleri. ...	37
Tablo 3.9: Genomik DNA izolasyonu için kullanılan solüsyonlar.	38
Tablo 3.10: ExTaq PCR içeriği.	39
Tablo 3.11: ExTaq PCR programı.	39
Tablo 3.12: Q5 PCR içeriği.	40
Tablo 3.13: Q5 PCR programı.	40
Tablo 3.14: Maya koloni PCR içeriği.	41
Tablo 3.15: Maya koloni PCR programı.	41
Tablo 3.16: qPCR içeriği.	42
Tablo 3.17: qPCR programı.	42
Tablo 3.18: qPCR için kullanılan primerler.	42
Tablo 3.19: Yönlendirilmiş mutagenez reaksiyon içeriği.	45
Tablo 3.20: Plazmid DNA'sının sekanslanması için kullanılan reaksiyon içeriği.	45
Tablo 3.21: Plazmid DNA'sının sekanslanması için kullanılan PCR programı.	46
Tablo 3.22: Maya gDNA'sının sekanslanması için kullanılan reaksiyon içeriği.	46
Tablo 3.23: Maya gDNA'sının sekanslanması için kullanılan PCR programı.	46
Tablo 3.24: TCA protein izolasyonu yönteminde kullanılan solüsyonlar ve içerikleri.	47
Tablo 3.25: SDS- PAGE yükleme ve ayırma jeli solüsyonları ve içerikleri.	48
Tablo 3.26: Western Blot için kullanılan antikorlar.	49
Tablo 3.27: CHIP solüsyonları.	50

KISALTMALAR LİSTESİ

Ala, A	: Alanin
Amp	: Ampisilin
APC/C	: Anafaz Uyarıcı Kompleks/ Siklozom
ARM	: Kromozom Kol Bölgesi
Asn, N	: Asparagin
Asp, D	: Aspartik Asit
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CEN	: Sentromer
ChIP	: Kromatin İmmünopresipitasyonu
CPC	: Kromozomal Geçiş Kompleksi
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
dk	: Dakika
DMSO	: Dimethyl Sulfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DTT	: Dithioreitol
FEAR	: Cdc14 Erken Anafaz Salınım Yolağı
Gln, Q	: Glutamin
His, H	: Histidin
Ile, I	: İzolösin
Kan	: Kanamisin
LB	: Luria- Bertani
Lys, K	: Lizin
MCAK	: Mitotik Sentromerle Bağlantılı Kinesin
MEN	: Mitotik Çıkış Yolağı
Nat	: Nourseothricin
OD	: Optik Dansite
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	: Polietilen Glikol
PERI	: Perisentromer
PP2A	: Protein Fosfataz 2A
Pro, P	: Prolin
qPCR	: Kuantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SC	: Sinaptonemal Kompleks
SDS- PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
Ser, S	: Serin
Sgo1	: Şugoşin
sn	: Saniye
SOC	: Katabolit Represe Edilmiş Süper Optimal Sıvı Besiyeri
SPO	: Sporulasyon Besiyeri
TCA	: Trikloroasetik asit
TEMED	: Tetrametiletilendiamin
Thr, T	: Treonin
Tyr, Y	: Tirozin
YNB	: Yeast Nitrogen Base

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen ve tecrübelerinden her zaman faydalandığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Serap Doğan'a çok teşekkür ederim.

Eş danışman hocam Prof. Dr. Adele Marston'a bana güvendiği ve ekibine beni dahil ettiği için minnettarım.

Tez izleme komitesi üyesi hocalarım Prof. Dr. Serap Çelikler Kasımoğulları ve Prof. Dr. Zeliha Erdoğan'a değerli görüşleri için teşekkür ederim.

Doktora tezim kapsamında araştırma yapmak üzere Edinburgh Üniversitesi'ne gitmem için görevlendirmemi onaylayan bölüm başkanımız Prof. Dr. Feray Köçkar'a ve Balıkesir Üniversitesi yönetimine çok teşekkür ederim.

Bu süreçte yanımda olan eşim Dr. Hulusi Kardaş'a, aileme, arkadaşlarıma ve yeğenlerim M. Buğra, A. Kağan, Şirin, Gülin, Atahan, Elif, Cansu, Mehmet ve Metehan'a teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca faydalandığım yurtiçi doktora eğitim bursu (2211-A) ve yurtdışı doktora sırası araştırma bursu (2214-A) için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) çok teşekkür ederim.

Balıkesir, 2020

Begümhan Yılmaz Kardaş

1. GİRİŞ

Tüm ökaryotlar çoğalmak için büyümeye ve bölünmeye ihtiyaç duyarlar, bunun için de hücre döngüsüne girerler. Farklı fazlara ayrılmış olan hücre bölünmeleri yüksek ökaryotlarda daha karmaşık olsa da evrimsel olarak büyük ölçüde korunmuştur. Mitotik hücre döngüsünde, atasal bir hücre iki yeni (tıpatıp aynı) hücre oluşturmak için kendini kopyalar. Üremek için ise diploid hücrelerden haploid hücrelerin mayoz bölünme ile oluşturulması gerekmektedir. Mayoz bölünmede kromozomlar iki katına çıkarıldıktan sonra mayoz I ve mayoz II olarak bilinen iki ayrı kromozom ayrılma olayı gerçekleşmektedir. Mayoz I esnasında babadan ve anneden gelen kromozomlar (homologlar) ayrılırken, mayoz II'de mitoz bölünmede olduğu gibi kardeş kromatidler ayrılmaktadır [1].

Anöploidi, haploid setten sapmış kromozom sayısını ifade etmektedir ve kanserde ya da hücre gelişimindeki hücre fonksiyon anomalileriyle bağlantılı olduğu bilinmektedir [2]. Üreme esnasında bu durum düşük, gebelik sonlanımı ve insanlarda en çok bilinen Trizomi 21 (Down Sendromu), Trizomi 13 (Patau Sendromu) ve Trizomi 18 (Edward Sendromu) gibi doğumsal hasarlara sebep olmaktadır [3]. Bu sebeple, mayoz sonrasında her bir haploid hücrede eşit ve doğru miktarda DNA bulunması şarttır.

Hücre bölünmesi mekanizmalarını tam olarak anlamadan hastalıkların ve/ veya doğumsal hasarların sebepleri hakkındaki sorulara cevap üretmek imkansızdır. Çünkü, tüm canlı organizmaların büyüme ve çoğalmasının bağlı olduğu her bir hücre bölünmesi esnasında hücre içeriği oluşacak yeni hücrelere eşit ve doğru biçimde dağıtılmalıdır [1]. Bu mekanizmaların hatalı düzenlenmesinin hücrelerde/ vücutta hasarlı ve hatta ölümcül etkileri olabilir. Çünkü, hücre döngüsündeki DNA hasarı ve mutasyonlar gibi düzeltilmemiş hatalar ya da yanlış kromozom ayrılması ve anöploidi, genomik dengesizliğe sebep olmaktadır ki bu da kanser gibi birçok hastalığın karakteristik özelliğidir [4].

1.1 Hücre Döngüsü

Aktif olarak bölünen hücreler, belirlenmiş bir program doğrultusunda DNA replikasyonu gerçekleştirir ve ana hücrenin kromozom içeriğine sahip iki yeni hücre oluşturur. Hücre döngüsü G1 adı verilen faz ile başlar. Bu fazın amacı hücrenin yeteri kadar büyümesi ve DNA replikasyonuna hazırlanmasıdır [5]. G1 fazında bir kontrol noktası bulunur. İnsan hücrelerinde bu kontrol noktasının adı restriksiyon noktasıdır. Eğer ortamda yeterli büyüme

faktörü varsa hücreler bu kontrol noktasından geçer ve hücre döngüsüne devam eder. Eğer büyüme faktörü bulunmuyorsa hücreler yeterli sinyal gelene kadar çoğalmadan bekledikleri G0 fazına girerler. Tomurcuklanan mayanın G1 fazındaki restriksiyon noktasına ise “start” denir. Bu noktada maya hücreleri, ortamdaki besin miktarını ve eşleşme ihtimalini değerlendirir. Eğer ortamda karşı cins ait bir feromon var ise hücre G1 safhasında tutuklanır ve bölünmeye devam etmeden eşleşmeyi bekler [6]–[8]. G1 fazından geçen hücreler ise S fazına girer ve bu fazda DNA’nın replikasyonu gerçekleşir. Daha sonra da hücreler G2 fazına girer ve daha fazla büyüyerek M fazına (mitoz) hazırlanırlar.

Hücre döngüsünde fazlar arasındaki geçişler siklin bağımlı kinazlar (CDK’lar) ile düzenlenir. Bu kinazlar da aktivitelerini gerçekleştirebilmek için siklinlere ihtiyaç duyarlar. Siklin- CDK kompleksleri de birçok substratı fosforile ederek hücre döngüsünün her bir basamağına özgü olayları aktive veya inaktive ederler [9]. Tomurcuklanan mayada, S fazında Clb5 and Clb6 siklinleri CDK (Cdc28) ile beraber görev alırken, Clb1, Clb2, Clb3 ve Clb4 siklinleri ise mitotik fazda görev alırlar [10].

1.2 Mitoz Bölünme

Mitoz bölünme, her bir kromozomda bulunan replike olmuş DNA moleküllerinin G2 fazından sonra eşit bir şekilde iki çekirdeğe ayrılması ile gerçekleşen nükleer bölünmedir. İlk önce çekirdek zarı parçalanır ve kromozomlar kondanse olur. Tomurcuklanan mayada ise çekirdek zarı parçalanmaz ve mitotik ağ çekirdek içinde oluşur [11]. Kromozomlar tamamen kondanse olduktan sonra, zıt kutuplardan gelen mikrotübüller, sentromerlerinde bulunan kinetokor proteinlerine bağlanır. Kromozomlar daha sonra mitotik ağın merkezine doğru hareket eder ve tüm kromozomlar merkezde dizildiğinde kardeş kromatidler hücrenin zıt kutuplarına doğru çekilirler. Daha sonra, kromozomlar etrafında yeni çekirdek zarı oluşur ve sitoplazmanın iki yeni hücreye eşit miktarda sitoplazma içeriği paylaşarak bölünmesi olayı olan sitokinez meydana gelir. Mitoz bölünme ve sitokinez sonucu oluşan iki yeni hücre de tıpatıp aynı genetik içeriğe sahiptir. Mitoz bölünme, hem haploid hem de diploid hücrelerde gerçekleşir [12].

1.2.1 Mitoz Bölünme Esnasında Kardeş Kromatid Kohezyonu

Mitoz bölünme esnasında kromozomların rastgele ayrılmaması ve dolayısıyla anöploidinin ortaya çıkmaması, kardeş kromatidlerin mitotik ağ tarafından oluşturulan kuvvete karşı gösterdiği direnç sayesinde. Bu direnci de kardeş kromatidlerin fiziksel olarak

bağlanmasını sağlayan halka şeklinde bir protein kompleksi olan kohezin sağlar [13]. Kohezinler tomurcuklanan maya kromozomlarına G1 fazının sonunda bağlanır [14] ama kardeş kromatidleri bir arada tutma görevini ancak S fazında, kardeş kromatidlerin replikasyonu tamamlandıktan sonra, gerçekleştirmeye başlar [15]. Kondensin adı verilen bir diğer protein de kromozomlara kompakt çubuk şeklindeki yapılarını vererek mikrotübüller tarafından yakalanmalarını ve doğru biçimde ayrılmalarını sağlar [13].

Kohezin ve kondensin, sentromeri çevreleyen kromozom bölgesi olan perisentromerde yüksek miktarda bulunur ve hem maya hem de memelilerde kardeş kromatidlerin ayrılması esnasında en şiddetli kuvvete maruz kalan perisentromerik kromatinin yapısı için hayati önem taşırlar. Kondensinin kromatini ağ doğrultusunda sıkılaştırması, kohezinin de kromatinin başka yönlere rastgele dağılmasını önlemesi, perisentromerik kromatinin ağ kuvvetlerine karşı dirençli kalmasını sağlamaktadır [13], [16]–[20].

Tomurcuklanan mayalarda S fazında kohezinlerin asetillenmesi ile başlayan kardeş kromatid kohezyonu anafaza kadar devam eder ve separazların kohezinleri kesmesi ile son bulur. Omurgalılarda ise, kohezin iki adımda ayrılır. Birinci adım profaz yolağı olarak adlandırılan bir mekanizma ile, ikinci adım ise anafazda separazlar ile gerçekleşir [21]. Profaz yolağında kohezinin kromozom kollarından ayrılması Wapl ismi verilen bir protein (mayalardaki homoloğu Rad 61'dir) sayesinde geç G2 veya prometafazda gerçekleşir [21], [22]. Omurgalılarda ayrıca bir Wapl antagonisti olan sororin proteini bulunmaktadır. Aurora B ve Cdk1 tarafından fosforillenen sororin inaktif hale gelir ve Wapl'ın aktivitesini engelleyemez, böylece kohezinler kromozom kollarından ayrılır [22], [23]. Ancak, profaz yolağının gerçekleşmesini sağlayan fosforilasyonlar sentromerde şugoşin ve protein fosfataz 2A (PP2A) tarafından engellenmektedir. Bunun sonucunda da kardeş kromatid kohezyonu metafaza kadar korunmaktadır [23].

1.2.2 Kromozomların Metafaz Plakasına Yerleşmesi

Tüm ökaryotlarda anafaz başlamadan önce kromozomlar, iki kutuba da eşit mesafede bulunan merkezdeki metafaz plakasında buluşurlar. Bunun için zıt kutuplardan gelen mikrotübüllerin sentromerde bulunan kinetokor proteinine bağlanması gerekmektedir [24].

Mikrotübüllerin kinetokorlara doğru olarak bağlanması hem kromozomun yapısal özelliğine (kohezin ve kondensin tarafından sağlanmış) hem de oluşan gerilime bağlıdır [13]. Eğer

yeterli gerilim sağlanamamışsa mikrotübül ve kinetokor arasındaki bağ destabilize edilerek doğru bağlanmanın sağlanması için tekrar şans verilir. Bu hata düzeltme yolağında görevli olan proteinler Sgo1 ve kromozomal geçiş kompleksinin (CPC) bir üyesi olan Aurora B kinazdır (Ipl1). Gerilimsiz bir bağlantı gerçekleşmiş ise Sgo1, Ipl1'in sentromerde kalmasını sağlarken, Ipl1 de dış kinetokordaki birçok substratı fosforilleyerek mikrotübülle olan bağlantıyı koparır [25], [26]. Ayrıca Sgo1, kondensin'i de perisentromere getirerek kinetokorların zıt kutuplardan gelen mikrotübüllere bağlanmaya meyilli olmalarını sağlamaktadır [26].

1.2.3 Anafaz

Kardeş kromatidlerin bioryantasyonu sağlandıktan sonra anafaza giriş için iki önemli olay meydana gelmektedir. Birincisi APC/C'nin (anafaz uyarıcı kompleks/ siklozom) aktifleşmesidir, ikinci de kohezinin halkalarının kesilmesidir. Bunların sonucunda kromozomların ayrılması gerçekleşir.

APC/C, mayadan insana kadar evrimsel olarak korunmuş ve birden fazla birimden oluşan bir E3 ubiquitin ligazdır. APC/C, kardeş kromatid ayrılmasını sağlayan normal hücre döngüsü için ve mitozdan çıkış için gereklidir [27]. APC/C aktivitesi, regülatör proteinlerinin (Cdc20 veya Cdh1'in) varlığına bağlıdır. Mikrotübül bağlantısının doğruluğu kontrol edildikten sonra, yüksek miktardaki Cdk1, APC/C'nin Cdc20'ye bağlanmasını sağlar. Aktive olan APC/C, separaz proteinlerinin inhibitörü olan sekürinin ubiquitinasyonunu sağlayarak ortamdaki çıkarır. Böylece serbest kalan separaz, kohezinin halkalarını Scc1 biriminden keser ve anafazın gerçekleşmesini sağlar [28].

1.2.4 Mitozun Bitişi

Mitozun bitişi için mitotik siklinlerin yıkımı (inaktivasyonu) ve mitotik kinazların sebep olduğu fosforilasyonların fosfatazlar ile defosforile edilmesi gerekmektedir. Tomurcuklanan mayada APC/C, Cdc20 ile aktive olduktan sonra S faz siklini Clb5 ve mitotik siklin Clb2'nin bazılarının yıkılmasını sağlamaktadır. Anafazın sonunda da Cdc14 (fosfataz), APC/C'nin aktivatörü olan Cdh1'i defosforilize etmektedir ve APC/C^{Cdh1} mitotik siklinleri tamamen yıkarak mitozdan çıkışı sağlamaktadır [29]–[32].

Anafaza kadar Cdc14, nükleulus içerisinde, inhibitörü Net1'e bağlı halde ve inaktif (fosforile olamamış halde) durmaktadır. FEAR (Cdc14 erken anafaz salınım yolağı) ve MEN (mitotik

çıkış yolağı) adı verilen iki yolak sayesinde sırasıyla erken ve geç anafazda Cdc14'ün nükleulustan dışarı salınımı gerçekleşir. İki yolakta da Cdc14, Net1'in fosforile olması sonucu aktifleşmektedir [33].

Erken anafazda Cdc14'ün salınmasını sağlayan FEAR yolağında separaz, separaz bağlanma proteini Slk19, polo benzeri kinaz Cdc5, Spo12, replikasyon çatalı engelleme proteini Fob1, düzenleyici birimi olan Cdc55'e bağlanmış PP2A, Zds1, Zds2, H2B ubiquitinasyonu ve H3 metilasyonu gibi histon modifikasyonları ve Clb1/Clb2 siklinleri ile ilişkili CDK'lar görev almaktadır [34]. Anafazdan önce inaktif halde bulunan Cdc14'ün inhibitörü ile olan bağlantısını Fob1'in stabilize ettiği bilinmektedir. Anafaz esnasında gerçekleşen APC/C aktivasyonu da separazın inhibitörü olan sekürinin parçalanmasına ve separaz-Slk19 kompleksinin aktifleşmesine sebep olmaktadır. Separaz- Slk19 kompleksi ise Zds1 ve Zds2'nin de rol aldığı bir mekanizma ile PP2A^{Cdc55}'nin fosfataz aktivitesini engellemektedir. Böylece Clb1-CDK ve Clb2-CDK, Net1'i fosforile edebilir hale gelmektedir. Clb1-CDK ve Clb2-CDK aynı zamanda Spo12'nin de fosforilasyonundan sorumludur. Net1'in fosforilasyonu Cdc14 ile olan bağlantıya hasar verirken Spo12'nin fosforilasyonu Fob1'in Cdc14-Net1 kompleksinden ayrılmasına sebep olmaktadır. Cdc5 de Cdc14'ün nükleulustan çıkışı için gereklidir. FEAR yolağında kromozom ayrılma mekanizmasının iki düzenleyicisi olan separaz ve Cdc5 yer almaktadır. Bunun sayesinde FEAR yolağı ve kromozom ayrılması arasında koordinasyon sağlanır. Metafaz- anafaz geçişinde separazın aktifleşmesi hem kromozom ayrılmasını hem de FEAR yolağının aktivasyonunu başlatarak Cdc14'ün genomun bölüşülmesinden daha önce aktifleşmemesini sağlar. Ayrıca separaz, FEAR yolak aktivasyonunun sekürinin stabilize olmasına neden olan mitotik ağ hasarları ve DNA hasarı gibi durumlara duyarlı olmasını da sağlamaktadır [34].

Anafazın sonunda ise Net1'in fosforilasyonunu sağlayan Cdk1'lerin (Clb1- CDK) azalması sonucu hücreler MEN yolağına girerler ve Cdc14'ün tamamen aktive olması sağlanır. MEN yolağı GTPazların yardımıyla ilerleyen bir sinyal yolağıdır. MEN yolağının başlangıcını sağlayan küçük bir G proteini olan Tem1 aktive olduktan sonra, Cdc15 protein kinazın aktivasyonunu sağlayarak Dbf2-Mob1 kinaz kompleksinin fosforile olmasını sağlar. Dbf2-Mob1 kompleksi de Cdc14'ü nükleus lokalizasyonunu sağlayan sekansının yakınlarından fosforile eder ve Cdc14'ün sitoplazmada kalmasını sağlar. Normal bir hücre döngüsünde, Bub2- Bfa1 kompleksi Cdc5 polo kinaz tarafından gerçekleştirilen fosforilasyonlar ile inaktif hale getirilene kadar MEN yolağını inhibe eder. Mitotik ağ pozisyonu kontrol

noktasının uyarılması sonucunda ise Bfa1, Kin4 kinaz tarafından fosforile edilir. Böylece Kin4, Bfa1'in Cdc5 tarafından fosforile edilerek inhibe olmasını engelleyerek (Bub2- Bfa1 kompleksinin aktif kalmasını sağlayarak) MEN aktivasyonunu inhibe etmiş olur. Sonuç olarak MEN yolağı mitotik ağı kontrol noktasındaki uyarı bitene kadar inaktif halde tutulur ve mitotik ağı doğru hizada uzaması sağlanmadan mitozun bitmesine izin verilmez [33], [35].

Omurgalılarda da mitozdan çıkış siklinlerin yıkımı ile başlar. Anafaz başladığında Siklin B1 hemen ve tamamen yıkılır. Ayrıca, regülatör B55 protein birimlerine bağlı PP1 ve PP2A fosfatazları da CDK, PLK1 ve Aurora B gibi kinazların sebep olduğu fosforilasyonları defosforilize ederek mitozdan çıkışı sağlar [36], [37].

1.3 Mayoz Bölünme

Eşeyli üreme esnasında iki gamet bir araya gelir ve genomlarını birleştirerek yeni jenerasyonu oluştururlar. Yeni oluşan jenerasyonda genetik içeriğin iki katına çıkmaması için atasal hücrelerde genomun kopya sayısı yarıya indirilmelidir. Bunu da mayoz bölünme sağlar.

Mayoz bölünme ve mitoz bölünme arasındaki en önemli fark kromozom sayısının iki katına çıkarılmasından sonra gerçekleşen kromozom ayrılma adımlarıdır. Mitotik hücreler kromozomları bir adımda ayırırken, mayoz bölünmede kromozomlar iki adımda ayrılırlar (mayoz I ve mayoz II).

Mayoz II, mitoz bölünmeye çok benzemekte iken, mayoz I'de önemli farklılıklar bulunmaktadır. Mayoz I esnasında, biri anneden diğeri babadan gelen homolog kromozomların ayrılması gerçekleşir. Bir S fazı sonrası iki kromozomal bölünme arka arkaya gerçekleştiği için mayoz bölünme sonucunda dört hücre oluşur ve oluşan her bir hücrede ata hücrenin kromozom sayısının yarısı bulunur [38].

Mayoz I'de homolog kromozomların doğru ayrılabilmesi için önemli bazı olaylar gerçekleşmektedir. Birinci önemli olay homolog kromozomların birbirine bağlı durmasıdır. Tomurcuklanan mayada mayotik rekombinasyon, kiyazma oluşturarak homolog kromozomlarının birbirine bağlı durması sağlar [25]. İkinci önemli olay kardeş kromatidlerin mayoz I'de aynı kutuba ayrılmasıdır. Monopolin olarak bilinen bir protein

bunu sağlar [39]. Üçüncü önemli olay da perisentromerik kohezinin halkalarının mayoz II'ye gelene kadar kardeş kromatidlerin arasından ayrılmamasıdır [25].

1.3.1 Mayoza Giriş

Tomurcuklanan mayada mayoza giriş kararı birçok faktöre bağlıdır. Eğer ortamda fermente edilebilecek karbon kaynağı yoksa ve azot kıtlığı varsa hücre mayoza girer. Ayrıca, hücrenin mayoz bölünme geçirebilmesi için diploid olması (*Mata/Mata*) ve mitokondrisini kaybetmemiş olması gerekmektedir. Bu faktörlerin hepsini *IME1* promotörü kontrol eder ve bu genin ekspresyonu hücrenin mayoza girişini direkt ve indirek olarak diğer mayotik genleri uyararak sağlar [40].

Mayoza girişi sağlayan bir diğer unsur da vejetatif büyüme için gerekli olan genlerin baskılanmasıdır. Bilindiği üzere mitotik hücre döngüsü CDK- siklin kompleksleri ile düzenlenmektedir. Hücre mayoza girerken bu CDK- siklin kompleksleri inaktive edilmelidir. Ancak, DNA replikasyonu için de CDK- siklin komplekslerine ihtiyaç vardır. Pre- mayotik DNA replikasyonunun gerçekleşebilmesi için, mitotik CDK- siklin komplekslerinin *IME2* geni ile düzenlenmesi gerekmektedir. *Ime2*, CDK benzeri bir kinazdır ve S fazına giriş için gerekli olan CDK- siklin (Cdc28-C1b5/6) kompleksinin aktivasyonunu sağlar. Mayozun temel düzenleyicisi olan *IME1*, *IME2*'nin ekspresyonunu sağlar [40], [41]. *IME4* adı verilen diğer bir gen ise mRNA'da bulunan adenozin bazını metilleyerek N-6-metiladenozin oluşturan metiltransferaz enzimini kodlar ve tomurcuklanan mayalarda mayoza geçiş için gereklidir [42], [43].

1.3.2 Pre-mayotik S Fazı

Mayotik rekombinasyon, homologların eşleşmesi ve sinaptonemal kompleks (SC) oluşumu gibi homolog kromozom etkileşimleri için S fazı çok önemlidir [44]–[46]. Çünkü, bir transesteraz sporulasyon proteini (Spo11) tarafından gerçekleştirilen programlı DNA çift zincir kırıklarının oluşturulması, S fazında gerçekleşen DNA sentezinden hemen sonra başlar ve bu olay mayotik rekombinasyonun başlangıcını belirler [44], [46]–[48]. S fazının gecikmesi gibi bir durumda, SC ve çift zincir kırıklarının oluşumunda da gecikmeler görüleceği bilinmektedir [45], [46]. Rekombinasyon ve homolog kromozom eşleşmelerinin gerçekleşmesi için S fazının gerekliliği, kohezinin bu fazda fonksiyonel hale gelmesi ile ilişkilendirilmiştir [15], [46].

1.3.3 Profaz I

Mayoz esnasında, homolog kromozomlar rekombinasyon ile genetik malzeme değişimi yaparak genetik çeşitliliği sağlarlar. Bu olay leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diyakinez adı verilen fazlara ayrılmış profaz I esnasında meydana gelir [49].

Premayotik replikasyon sona erdiğinde (kromozom sayısı iki katına çıktıktan sonra, leptoten fazında) kohezinler kardeş kromatidleri bir arada tutarak Red1, Hop1, kohezinler ve kondensinlerden oluşan bir kardeş kromatid axisi oluşturur [49]. Tomurcuklanan mayada, mayoza özgü ZMM proteinleri (Zip1, Zip2, Zip3, Mer3, Msh4, Msh5, Spo22/Zip4 ve Spo16) erken mayoz I'de eksprese edilmektedir ve homolog kromozomlar arasındaki sinapsisi kurar. Eşleşen homolog kromozomlar arasında oluşan fermuar benzeri SC yapısı, eşleşmiş kromozomların birbirine yaklaşmasını sağlayarak sinapsisi desteklemektedir. Sinapsis tamamen oluşuktan sonra pakiten fazında homolog kromozomlar arasında krossover oluşur ve genetik içeriğin değişimi sağlanır [49].

1.3.3.1 Mayotik Rekombinasyon

Mayotik profaz sırasında, her biri bir kardeş kromatid çifti tarafından temsil edilen homolog kromozomlar, ilk mayotik bölünmedeki ayrışmalarına hazırlık olarak birbirine bağlanır. Bu bağlantılar genellikle iki homolog üzerindeki tamamlayıcı DNA bölgelerinin birbirleriyle etkileşime girdiği homolog rekombinasyona bağlıdır.

Çoğu organizmada, mayotik DNA rekombinasyonunun iki ana sonucu vardır: ya krossover oluşturmayan (non-krossover) ama homologların eşleşmesini desteklemeye yardımcı olan (kalıcı olmayan) bir interhomolog bağlantı oluşur, ya da homolog kromozomların ayrılması için çok önemli olan ve güçlü bir interhomolog bağlantı sağlayan bir krossover olayı (genetik rekombinasyon) gerçekleşir. Krossover oluşturma/ oluşturmama kararı, her bir homolog çiftinin en az bir krossovera sahip olmasını ve her bir krossoverın kromozomlar üzerinde birbirinden uzağa dağılma eğiliminde olmasını sağlamak için titizlikle kontrol edilir.

Mayotik rekombinasyon, DNA çift sarmalının her iki zincirindeki birçok bölgenin Spo11 enzimi tarafından kesilmesi ile başlar. Açıkta kalan DNA 5' uçları tekrar kesilir (rezeksiyon) ve ortaya çıkan (çıkıntı yapan) 3' tek zincirleri Rad51 ve Dmc1 rekombinazları ile kaplanır. Sonuçta ortaya çıkan protein-DNA filamentleri (zincir-aktarma kompleksleri) başka bir çift zincirli DNA'yı istila etme ve DNA dizisinin tamamlayıcı bölgelerini tarama kabiliyetine

sahiptir. Mayozda, bir homologdan gelen zincir diğer homolog kromozomun bir kromatidini işgal etmekte iken, kardeş kromatidler üzerindeki özdeş diziler arasındaki rekombinasyon baskılanmaktadır. İstilacı filament homolog kromozomdaki tamamlayıcı zincirle eşleşir ve D-halkası olarak bilinen bir yer değiştirme döngüsü oluşturur. Bu aşamada, krossover oluşturma ya da oluşturmama kararı verilir.

Krossover oluşturmayacak bölgelerde DNA onarım enzimleri istilacı zinciri 3' ucundan uzatır, fakat istilacı zincir sonunda ayrılır ve geldiği kromatide geri döner. DNA onarım proteinleri daha sonra boşlukları doldurur ve artık diğer homolog kromozomla ilişkisi kalmayan sağlam bir kromozom üretir.

Krossover olması planlanan bölgelerde ise ilk önce istilacı zincir tek uçlu istila adı verilen sabit bir kompleks oluşturur. Daha sonra D-halkası orjinal çift zincir kırığının olduğu yerdeki diğer tek zincir ucuna doğru genişler. DNA sentezi ve ligasyon boşlukları doldurur ve oluşan yeni yapıya çift Holliday bağlantısı adı verilir. DNA kesim reaksiyonları ve DNA tamir mekanizmaları ile bu yapı krossovera dönüşür [5].

1.3.3.2 Perisentromerik Krossoverların Zararları

Hiç krossover gerçekleşmeyen veya az sayıda gerçekleşen hücrelerde mayoz I esnasında homologların aynı kutuba gitmesi ve mayoz II'de eşit ayrılma gerçekleşmesi durumu sıklıkla gözlenmektedir. Bu durumda yeni oluşan iki hücrede iki kromozom kopyası bulunurken, diğer iki hücrede hiç kromozom bulunmaz. Örneğin, insanlarda görülen Trizomi 21 (Down), Trizomi 15, Trizomi 16 ve Trizomi 18 gibi sendromların da sıklıkla mayotik rekombinasyonun az sayıda olması sebebiyle gerçekleştiği bilinmektedir [50]–[52].

Krossoverların sentromer yakınlarında gerçekleşmesi, hiç krossover gerçekleşmemesi kadar tehlikelidir ve kromozomların doğru ayrılmamasına sebep olabilir. Perisentromerde gerçekleşen krossoverlar bu bölgedeki kohezyona zarar verebilmektedir ve dolayısıyla kinetokorların ağ kutuplarına yönlendirilmesinde hasara sebep olmaktadır. İnsanlarda anneden gelen cinsiyet kromozom trizomilerinin birçoğunda sentromerde ve yakınında krossoverların gerçekleştiği bilinmektedir [52]–[54]. Tomurcuklanan mayada ise mayoz I'de oluşan kromozom ayrılmama hasarlarının yaklaşık % 60'ının perisentromerik rekombinasyonlardan kaynaklandığı bilinmektedir [52], [55]. Ayrıca, tomurcuklanan mayada sentromer yakınındaki krossoverların kardeş kromatidlerin erken ayrılmasına sebep

olduğu, bunun sonuçlarının da hem mayoz I'de hem de mayoz II'de gözlenebileceği bilinmektedir. Kardeş kromatidlerin erken ayrılması durumunun ileri yaş sebebiyle ortaya çıkan trizomilerinin çoğunda gözleendiği bilinmektedir. Perisentromerik krossoverların ayrıca mayoz II'de ayrılmamaya da sebep olabileceği bilinmektedir. Bunun sonucunda, iki hücrede olması gerektiği gibi birer kardeş kromatid bulunurken, bir hücrede iki kardeş kromatid bulunur ve bir hücrede de hiç kromozom bulunmaz. İnsan hücrelerinde meydana gelen kromozom ayrılmama olaylarının yaklaşık % 22'sinin bu tür hasarlardan meydana geldiği bilinmektedir [3], [52].

1.3.4 Perisentromerik Kohezyonun Sağlanmasında şugoşin Proteinin Görevi

şugoşin proteini (*Saccharomyces cerevisiae*'da Sgo1, *Schizosaccharomyces pombe*'de Sgo1, *Arabidopsis thaliana*'da Sgo1 ve Sgo2, *Oryza sativa*'da Sgo1, *Zea mays*'da Sgo1, *Drosophila melanogaster*'da Mei-S332 ve *Mus musculus*'ta Sgo2), mayoz I esnasında perisentromerdeki kohezini korur ve bu görevi evrimsel olarak korunmuştur [1].

Birçok organizmada mayoz esnasında kohezini proteininin Scc1/Rad21/Mcd1 α -kleisin birimi yerine mayozla özđü Rec8 kleisin birimi bulunmaktadır. Rec8 ieren kohezini mayoz II'ye kadar perisentromerik kohezyonun sürdürülmesi gibi Scc1 biriminin asla yerine getiremeyeceği görevleri gerçekleştirmektedir. Rec8'in kinazlar ile (Hrr25, Cdc5 ve DDK) fosforilasyonu kohezini separazlar ile kesilmesi için şarttır [56], [57]. Ancak, Sgo1 efektör proteini olan PP2A'yı perisentromere çekerek Rec8 fosforilasyonunu engeller ve kohezini kesilemez. PP2A, iskelet, düzenleyici ve katalitik birimleri olan bir komplekstir. Tomurcuklanan mayada ve insanlarda Sgo1 sadece düzenleyici birimi olan spesifik bir holoenzimle etkileşim kurarlar. *S. cerevisiae* ve *S. pombe*'de Sgo1 tarafından perisentromere mayoz esnasında çekilen PP2A regülatör birimi, perisentromerik kohezyonun sağlanması için gereklidir. Benzer olarak fare oositlerinde de Sgo2 tarafından çekilen PP2A perisentromerik kohezyonun korunmasını sağlar. *S. pombe* ile gerçekleştirilen bir çalışmada kromozom koluna yapay olarak takılan PP2A'nın kromozomlar arasındaki kohezini (Rec8) koparılmasını engellediği ortaya konmuştur [58]. Fare oositleri ile yapılan benzer bir çalışmada da yapay olarak kromozom koluna takılan Sgo1 sadece PP2A ile etkileşime girdiğinde homolog kromozomların ayrılmasını engellemiştir [59]. Yapılan tüm çalışmalar şugoşinin PP2A'yı çekerek perisentromerde kohezini halkasının kesilmesini önlediğini göstermiştir [1].

1.3.5 Homolog Kromozomların Mono-Oryantasyonu

Mitozdan ve mayoz II'den farklı olarak mayoz I'de, homolog kromozomlar zıt kutuplara ayrılmaktadır. Bu sebeple, kromozom ayrılma mekanizmaları mayoz I esnasında homolog kromozomların ayrılmasını sağlayabilmek için modifikasyonlar geçirmiştir. Bu mekanizmaların temelinde kardeş kromatidlerin mono-oryantasyonu vardır. Bunu sağlayabilmek için metafaz I'de kardeş kinetokorlar monopolin kompleksi tarafından birleştirilerek aynı kutuba giden mikrotübüllere bağlanırlar ve anafaz I'de kardeş kromatidlerin beraber kalmaları sağlanır [39].

Monopolin, 4 protein biriminden (Mam1, Csm1, Lrs4 ve Hrr25) oluşan bir komplekstir ve bu protein birimleri V- şekli alarak kardeş kinetokorların etrafını sarar. Böylece, kardeş kinetokorların bir arada hareket etmesi ve aynı mikrotübüle bağlanması sağlanır [60]. Mayoza özgü bir protein olan Spo13 de monopolin kompleksinin kinetokorlara yerleşmesi için gereklidir [60]. Spo13, Cdc5 kinaz ile etkileşerek sentromerik bölgeye yerleşmesini sağlar. Cdc5'in sentromere yerleşmesi monopolinlerin kinetokorun etrafını sarması için gereklidir ve bunu Lrs4'ü fosforile ederek gerçekleştirdiği düşünülmektedir [61]–[63].

1.3.6 Mayoz I'den Mayoz II'ye Geçiş

Anafaz I sonunda her bir nükleusta birbirine bağlı kardeş kromatidler içeren iki nükleus içeren bir hücre ortaya çıkar. Mitoz bölünmede kromozom ayrılmasını her zaman yeni bir DNA replikasyonu takip eder. Ancak, mayoz II'de gerçekleşen kardeş kromatid ayrılması mayoz I'den hemen sonra arada yeni bir DNA replikasyonu olmadan gerçekleşir. Mayoz I sonunda FEAR yolağı aktif hale gelerek Cdc14 salınımı gerçekleşir, böylece CDK bağımlı fosforilasyonlar defosforile edilir, mikrotübül ağı dağılır ve ağı kutupları tekrar kopyalanır [25].

FEAR yolağı mitoz esnasında Clb- CDK'nın baskılanması için önemlidir ama olmazsa olmaz değildir. Ancak, mayoz I'den mayoz II'ye geçiş için FEAR yolağı çok önemlidir. Eğer FEAR yolağı çalışmazsa veya Cdc14 görevini gerçekleştiremezse hücreler mayoz I'in sonunda Clb-CDK aktivitesini baskılayamaz ve mikrotübül ağı dağılımında ciddi gecikmeler ortaya çıkar. Ayrıca, Cdc14 ve FEAR yolağındaki mutasyonların bazı kromozomların mayoz I'de olduğu gibi ayrılmasına, bazılarının da mayoz II'de olduğu gibi ayrılmasına sebep olduğu bilinmektedir. Bu mutasyonlara sahip hücrelerin anafaz I'de tutuklansalar bile her iki mayotik kromozom ayrılmasını aynı anafaz I mikrotübül ağı üzerinde

gerçekleştirmesi, Cdc14 ve FEAR yolağının iki mayotik bölünmenin ardışık olarak inşa edilmiş iki mikrotübül ağı üzerinde gerçekleşmesini sağladığını göstermektedir [34].

MEN yolağı ise mayoz I sonunda aktif hale getirilmez. Bunun sonucunda da DNA replikasyonu tekrar başlatılmaz. Çünkü, MEN yolağının sebep olduğu Cdc14 aktivasyonu, Clb-CDK'ların tamamen inaktivasyonuna ve hücrenin G1 durumuna geri dönmesine yol açar. Anafaz I'de meydana gelen FEAR yolağının sebep olduğu Cdc14 aktivasyonu ise Clb-CDK seviyesinin mayoz I'e ait mikrotübül ağının dağılmasına yetecek kadar düşmesini, replikasyon komplekslerinin replikasyon orijini üzerinde birleştirilmesine izin vermeyecek kadar da düşük olmamasını sağlamaktadır. Böylece mayoz I sonunda, tekrar DNA replikasyonu olmadan ikinci tur kromozom ayrılma mekanizması (mayoz II) başlar [25], [34].

1.3.7 Mayoz II

Mayoz II'de kardeş kromatidler mitoz bölünmedeki gibi ayrılırlar. Ancak, sentromerik kohezinin korunması iptal edilmelidir ve Rec8 separazlar tarafından kesilebilmesi için fosforile edilmelidir. Tomurcuklanan mayada, Sgo1- PP2A'nın mayoz II'de lokalize olmasını Mps1 kinaz sağlar. Mps1 kinaz APC/C tarafından yıkılır ve Sgo1- PP2A sentromerden ayrılır. Sgo1 de daha sonra APC/C tarafından yıkılır [64]. Sentromerden ayrılan PP2A Hrr25'in Rec8'i fosforile etmesini sağlar ve Rec8 separazlar ile kesilebilir hale gelir [65]. Daha sonra kardeş kromatidler birbirinden ayrılır ve 4 nükleusa eşit olarak dağıtılır. Tomurcuklanan mayada, mayoz II sonunda dört nükleus spor duvarları içerisinde paketlenerek bir tetrad oluşturur.

2. AMAÇ VE KAPSAM

Kardeş kromatidler tomurcuklanan mayalarda bir kinetokor proteini olan Ctf19 kompleksine bağımlı olarak kinetokorun etrafında yoğunlaşmış bir şekilde duran kohezinler sayesinde birlikte tutulurlar [1], [14]. Mayoz I esnasında homolog kromozomlar bir araya gelir ve krossoverlar ortaya çıkar. Sentromerleri çevreleyen yüksek miktarda kohezinin bu bölgedeki krossover oluşumunu engellediği bilinmektedir [66]. Ancak, sentromer merkezi yakınındaki krossover oluşumunun risk faktörleri hala tam olarak bilinmemektedir.

Nambiar ve arkadaşları [52] kromozom ayrılması esnasında sentromer çevresindeki krossoverların bu bölgedeki kohezyona hasar verdiğini veya ağ kutuplarındaki düzgün kinetokor yerleşimini engellediğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar derlemelerinde mayotik rekombinasyonda perisentromerik baskılamaya sebep olan muhtemel faktörlerin sentromerik sekans tekrarlılığı, kinetokor fonksiyonları veya çevredeki yüksek yoğunluklu ve ulaşılamaz heterokromatinin varlığı olduğunu belirtmişlerdir [52]. Ancak, daha önce yapılan çalışmalarda diğer sentromerlerin aksine DNA tekrarları içermeyen ama bunun dışındaki tüm özellikleri diğer sentromerlerle aynı olan pirince ait *CEN8*'de yaklaşık 2.3 Mbp'lik belirgin krossoverları olmayan bir bölge olduğu bildirilmiştir [67], [68]. Bu da perisentromerik baskılama için tekrarlayan DNA'ya ihtiyaç olmadığını göstermektedir. Perisentromerik krossover baskılamasının bir diğer muhtemel sebebi olarak da heterokromatin varlığı gösterilmiştir. Ancak, perisentromerik heterokromatine sahip olmamasına rağmen *S. cerevisiae*'de sentromer yakınındaki rekombinasyon yoğunluğunun çok az olduğu bilinmektedir [69]–[71]. Ayrıca, araştırmacılar *S. cerevisiae*'ye ait CDEIII (sentromerik DNA elementi III)'de oluşturulmuş ve sentromerik fonksiyonu engelleyen bir baz çifti mutasyonunun sentromer çevresinde krossoverı teşvik ettiğini ve yabancı türe göre yaklaşık 2.5 kat gen çevrimine sebep olduğunu bildirmişlerdir [70]. Tüm bu veriler heterokromatin varlığının perisentromerik krossoverları engelleme işlevi göstermediğini açıklamaktadır. Nambiar ve arkadaşlarının da belirttiği gibi üçüncü muhtemel sebep olan kinetokorların sentromer etrafında toplanması gibi bir sentromerik fonksiyon rekombinasyon baskılamasından da sorumlu olabilir [52]. Literatüre bakıldığında Vincenten ve arkadaşları bunun doğru olduğunu göstermiştir [66]. Araştırmacılar, Ctf19 kompleksi gibi kinetokor komplekslerinin, sentromeri çevreleyen yaklaşık 6 kb'lık bir bölgede krossoverların oluşması için gerekli olan çift zincir kırık oluşumunu azaltmakta olduğunu göstermişlerdir ve Ctf19 kompleksinin perisentromerik bölgelerdeki kohezin yüklemesini

teşvik ederek çift zincir kırık tamirindeki eş seçimini (kardeş mi homolog mu) de etkileyebileceğini belirtmişlerdir [66].

Sentromeri çevreleyen kromozomal bölge ile ilişkide bulunan proteinler olan şugoşinler mayoz I esnasında perisentromerik kohezyonun korunması, memeli mitozu esnasında kohezyonun korunması, mitoz esnasında kardeş kromatidlerin bioryantasyonu, ağ kontrol noktası susturulması ve mayoz I esnasında homolog kromozomların bioryantasyonu gibi önemli rollere sahiptir [1]. Şugoşin bir adaptör proteindir [59] ve adaptör proteinler üyelerini kendisine ve birbirlerine bağlayan birimleri içerir ve daha geniş sinyal komplekslerinin yaratılmasını sağlarlar [72]. Şugoşinin spesifik rolleri için gerekli olan bazı önemli efektörler günümüzde bilinmektedir. Örneğin Xu ve arkadaşları [59], şugoşinlerin kohezini defosforile ederek mayoz I'de separazlar ile kesilmesine engel olan protein fosfataz 2A (PP2A) ile ilişkisini ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar ayrıca PP2A'ya bağlanma sorunu yaşayan mutant şugoşin proteinlerinin mayoz I esnasında sentromerik kohezini separaz ile kesilmekten kurtaramadığını veya mayada ağ birleşme kontrol noktasını destekleyemediğini göstermişlerdir [59]. Bunlara ek olarak, Tang ve arkadaşları [73] insan şugoşininin bağlanma proteinleri olarak PP2A birimlerini belirlemişlerdir. Araştırmacılar PP2A'nın okadaik asit ile inhibisyonunun veya PP2A_A α 'nın RNA interferans (RNAi) ile yok edilmesinin HeLa hücrelerinde kromozom ayrılmamasına yol açtığını göstermişlerdir [73]. Buna ek olarak, *Drosophila melanogaster* şugoşin proteini olan MEI-S332'e ait allel 9'daki bir nokta mutasyonunun insan şugoşinine tanıtılması sonucunda şugoşinin PP2A ile ilişkisinin, sentromerik lokasyonunun ve normal fonksiyonunun bozulduğu belirtilmiştir [73]. Tüm bu sonuçlara göre araştırmacılar insan hücrelerinde mitoz esnasındaki kromozom ayrılmasında şugoşin-PP2A ilişkisinin gerekli olduğu sonucuna ulaşmışlardır [73]. Literatürdeki iki ayrı çalışmada ise [26], [74] şugoşinin (tomurcuklanan mayadaki adı Sgo1) *Saccharomyces cerevisiae* mayasının sentromerik kromatinine kondensini çektiği belirtilmiştir ve bu konudaki bir başarısızlığın gerilimsiz kromozom bağlanmasının düzeltilmesini engellediği, bunun da perisentromerik bölgenin normal olmayan konformasyonu sebebiyle olabileceği fikri ortaya koyulmuştur. Araştırmacılar ayrıca metafaz esnasında AuroraB/Ipl1'in (gerilimsiz kromozom bağlanmasını engelleyen mitotik kinaz) kinetokor üzerinde lokalizasyonu için şugoşinin gerekli olduğunu bulmuşlardır ve şugoşinin kromozom bioryantasyonu için gerekli işlevsel bir moleküler adaptör olduğu sonucuna ulaşmışlardır [74]. Fare oositleri ile yapılan bir başka çalışmada Rattani ve arkadaşları [75], şugoşin benzeri protein 2'nin (Sgol2) kohezini korumanın yanında ağ birleşme kontrol noktasını

susturma, mayoz I ağlarında bivalentlerin toplanmasını ve bioryantasyonunu sağlamak, kinetokor-mikrotübül ilişkilerini sağlamak ve bivalent gerilimi sınırlandırmak gibi önemli rolleri olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar Sgo2'nin kohezini koruma yeteneğinin PP2A ile olan ilişkisine ve ağ birleşim kontrol noktasını susturmasına (Mad2'ye direk bağlanarak) bağlı olabileceğini önermişlerdir [75]. Tomurcuklanan maya, fizyon maya ve fare gibi birçok ökaryotik organizmada homolog kromozomların doğru ayrılması için şugoşinlerin gerekli olduğu bilinmektedir [1]. Araştırmacılar farede bulunan şugoşinin (Sgo2) Aurora B/C bağımlı fosforilasyonu sayesinde mitotik sentromerle bağlantılı kinesin (MCAK) ile birleştiğini, bunun da büyük ihtimalle mikrotübüllerdeki çekme kuvvetlerini ayarlayarak homolog kromozomların gerilimini kısıtladığını ve Sgo2'nin Aurora B/C kinazları kinetokorda mikrotübül ilişkisini sağlamlaştırmak için inhibe ettiğini belirtmişlerdir [1], [75]. Bu bilgiler bir arada düşünöldüğünde hem Aurora B/C'nin inhibisyonu hem de MCAK'ın Sgo2 ile olan ilişkisinin homolog kromozomların bioryantasyonunu teşvik ettiği düşünölmektedir. Aurora B/C kinazlarının Sgo2 tarafından inhibe edilebilme ihtimali, diğer şugoşinlerin bioryantasyonunu sağlamak için Aurora B'yi temin etmedeki pozitif rolü olduğu fikriyle ters düşmektedir. Marson, A. derleme makalesinde [1] Sgo2 tarafından Aurora B/C kinazların inhibisyonunun kardeş kinetokor bioryantasyonunun spesifik olarak baskılanmasına izin veren mayoz I'e özđü bir mekanizma olabileceğini belirtmiştir.

Literatür taraması sonucunda sentromer merkezi yakınındaki krossover oluşumunu engelleyen faktörlerinin hala tam olarak ortaya çıkmadığı görölmektedir. Ancak, daha önceki çalışmalarda şugoşini olmayan maya hücrelerinde sentromer çevresindeki kohezine yoğunluğunun devam ettiği gözlenmiştir [26]. Bu da şugoşinin Ctf19'dan sonra yolağa girdiğini göstermektedir. şugoşinin perisentromer ile doğru biçimde birleşmek için kohezine ihtiyacı olduğu bilinmektedir [76], bu yüzden bu sonuçlar şugoşinin krossover baskılanmasının direk yöneticisi olabilme ve Ctf19 kompleksinin kohezine yükleyerek (ki bu da şugoşini çekiyor) krossover baskılanmasını desteklemesi gibi heyecan verici ihtimalleri ortaya koymaktadır. Dolayısıyla, bu çalışmada bu hipotez test edilmiştir.

Bu çalışmada, şugoşinin perisentromerik krossoverları engellemedeki rolünü araştırmak, eğer rolü varsa bunu nasıl/hangi efektör proteinler vasıtası ile ve ne zaman gerçekleştirdiğini kolay kontrol edilebilen tomurcuklanan mayayı model sistemi kullanarak belirlemek hedeflenmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Sterilizasyon

Kimyasal solüsyonlar 0.2 µm polietersülfon membran filtre sistemi (Nalgene Rapid Flow) ile steril edilmiştir. Bakteri ve mayalar için kullanılan besiyerleri 120 °C’de 15 dk süreyle 1 atm basınç altında otoklavlanmıştır. Cam malzemeler de 250 °C’de 16 saat ısıtılarak steril edilmiştir.

3.2 Bakteriyel Metotlar

3.2.1 Bakteri Suşları

Bu çalışmada kullanılan kompetan *E. coli* suşlarına ait bilgiler Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1: Kullanılan *E.coli* suşları.

Suş Adı	Genotip	Kullanma Amacı
DH5α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20</i> φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17(rK⁻mK⁺)</i> , λ ⁻	Plazmidlerin çoğaltılması ve klonlama
XL10-Gold	<i>endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>tet^R</i> F'[<i>proAB lacI^qZ</i> ΔM15 Tn10(<i>Tet^R Amy Cm^R</i>)]	Yönlendirilmiş Mutagenez

3.2.2 Bakteri Besiyeri ve İlaçları

Bu çalışmada *E. coli* için kullanılan besiyerleri Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2: Bakteri besiyerleri ve içerikleri.

Besiyeri	İçeriği
LB (Luria-Bertani) sıvı besiyeri	Tripton (% 1, w/v) Maya ekstraktı (% 0.5, w/v) NaCl (% 0.5, w/v), pH: 7.2
LB (Luria-Bertani) katı besiyeri	Tripton (% 1, w/v) Maya ekstraktı (% 0.5, w/v) NaCl (% 0.5, w/v) Agaroz (% 2, w/v), pH: 7.2
SOC besiyeri (Katabolit represe edilmiş süper optimal besiyeri)	Tripton (% 2, w/v) Maya ekstraktı (% 0.5, w/v) NaCl (20 mM) Glukoz (20 mM) MgCl ₂ (10 mM) MgSO ₄ (10 mM) KCl (10 mM)

Bu çalışmada kullanılan tüm plazmidlerde Ampisilin direnç markörü bulunmaktadır. Bu nedenle, plazmidlerin *E. coli*'deki varlığının tespit edilmesi ve sürdürülmesi amacıyla 100 µg/ml Ampisilin içeren besiyerleri kullanılmıştır.

3.2.3 Bakterilerin Büyütülmesi

E. coli suşları 100 µg/ml Ampisilin içeren LB katı besiyerine (LB+Amp) ekilerek 37 °C'de büyütülmüştür. 100 µg/ml Ampisilin içeren LB sıvı besiyerine (LB+Amp) alınan bakteriler ise 37 °C'de 200 rpm'de 16 saat kadar çalkalanarak inkübe edilmiştir.

3.2.4 Bakterilerin Saklanması

100 µg/ml Ampisilin içeren LB sıvı besiyerinde 37 °C'de 16 saat boyunca inkübe edilmiş 500 µl hücreye % 40'luk gliserolden 500 µl eklenmiştir ve bu karışım -80°C'de saklanmıştır.

3.2.5 XL10-Gold *E. coli* Transformasyonu

XL10-Gold *E. coli* transformasyonu QuikChange XLII yönlendirilmiş mutagenез kitinde (Agilent Technologies) belirtilen protokole göre gerçekleştirilmiştir [77]. -80 °C'den alınan 45 µl XL10-Gold kompetan *E. coli* bakterileri buz üzerinde yavaşça çözdürülmüş ve önceden buz üzerinde soğumaya bırakılmış 14 ml'lik polipropilen tüpe (BD Falcon) transfer edilmiştir. 2 µl β- merkaptotanol karışımı eklenen hücreler 10 dk buzda bırakılmıştır. Daha sonra, Dpn-1 enzimi eklenmiş plazmid DNA karışımına eklenerek 30 dk boyunca buzda bekletilmiştir. 42 °C'de 30 saniye ısı şoku uygulanmıştır ve tekrar buza alınarak 2 dk bekletilmiştir. Önceden 42 °C'ye getirilmiş 500 µl SOC besiyeri eklenen hücreler 37 °C'de 200 rpm'de 1 saat çalkalanarak toparlanmaları sağlanmıştır. Steril cam bilyeler ile LB+Amp katı besiyerine ekilen hücreler 37 °C'de 15 saat boyunca inkübe edilmiştir.

3.2.6 Kimyasal Kompetan DH5α *E. coli* Transformasyonu

50 µl *E. coli* buzda yavaşça çözdürülmüştür ve 5 µl plazmid DNA'sı eklenerek 30 dk buzda bekletilmiştir. 42 °C'de 45 saniye ısı şokuna maruz bırakılan hücreler buzda 2 dk bekletilmiştir. 450 µl SOC besiyeri eklenen karışım 37 °C'de 200 rpm'de 1 saat çalkalanarak inkübe edilmiştir. 3000 rpm'de 3 dk santrifüj edilen karışımın süpernatant kısmı atılmıştır ve hücreler 100 µl SOC besiyeri ile çözdürülerek LB+Amp katı besiyerine ekilmiştir ve 37 °C'de 15 saat boyunca inkübe edilmiştir.

3.3 Tomurcuklanan Maya Metotları

3.3.1 Tomurcuklanan Maya Suşları ve Kökenleri

Bu çalışmada kullanılan maya suşları ve genotipleri Tablo 3.3'de gösterilmiştir. Mitoz bölünme çalışmalarında kullanılan mayaların kökeni w303 iken mayoz bölünme çalışmalarında kullanılan mayalar SK1 kökenine sahiptir.

Tablo 3.3: *S. cerevisiae* suşları.

Suş Adı	Genotipik Özellik	Cinsiyet	Köken
AMy827	<i>sgo1Δ::KanMX6</i>	<i>MATa</i>	W303
AMy906	<i>SGO1-6HA::TRP1</i>	<i>MATa</i>	W303
AMy1176	<i>Yabanıl Tür</i>	<i>MATa</i>	W303
AMy8066	<i>SGO1-GFP::KanMX6</i> <i>MET-CDC20::URA3</i> <i>Mtw1-tdTomato::NAT</i>	<i>MATa</i>	W303
AMy9126	<i>SGO1-yeGFP::KanMX6</i>	<i>MATa</i>	W303
AMy13149	<i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP (CEN8'in yaklaşık 50kb sağı)</i> <i>CEN8::pYKL050c-RFP::LEU</i> <i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP (CEN8'in yaklaşık 50kb sağı)</i> <i>SGD.115024-115572::pYKL050c-GFP*::URA(CEN8'in yaklaşık 10kb sağı)</i>	<i>MATa</i> <i>MATα</i>	SK1
AMy14087	<i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i> <i>ARG4::pYKL050c-GFP*::URA</i> <i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i> <i>SGD.150521-151070::pYKL050c-RFP::LEU (ARG4'ün yaklaşık 10kb sağı)</i>	<i>MATa</i> <i>MATα</i>	SK1
AMy14636	<i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i> <i>SGD.150521-151070::pYKL050c-RFP::LEU (ARG4'ün yaklaşık 10kb sağı)</i> <i>sgo1::KanMX6::PCLB2: 3HA-SGO1</i> <i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i> <i>ARG4::pYKL050c-GFP*::URA</i> <i>sgo1::KanMX6::PCLB2-3HA-SGO1</i>	<i>MATa</i> <i>MATα</i>	SK1

Tablo 3.3 (devam).

Suş Adı	Genotipik Özellik	Cinsiyet	Köken
AMy14637	<i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i> (CEN8'in yaklaşık 50kb sağı) <i>SGD.115024-115572::pYKL050c-GFP*::URA</i> (CEN8'in yaklaşık 10kb sağı) <i>sgo1::KanMX6::P_{CLB2}:3HA-SGO1</i> <i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i> <i>CEN8::pYKL050c-RFP::LEU</i> <i>sgo1::KanMX6::PCLB2-3HA-SGO1</i>	<i>MATa</i> <i>MATα</i>	SK1
AMy15389	<i>sgo1(Y47A;Q50A;S52A)-6HA::TRP1</i> <i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i> (CEN8'in yaklaşık 50kb sağı) <i>SGD.115024-115572::pYKL050c-GFP*::URA</i> (CEN8'in yaklaşık 10kb sağı) <i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i> <i>CEN8::pYKL050c-RFP::LEU</i> <i>sgo1(Y47A;Q50A;S52A)-6HA::TRP1</i>	<i>MATa</i> <i>MATα</i>	SK1
AMy26925	<i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i> <i>SGD.150521-151070::pYKL050c-RFP::LEU</i> (ARG4'ün yaklaşık 10kb sağı) <i>sgo1(Y47A;Q50A;S52A)-6HA::TRP1</i> <i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i> <i>ARG4::pYKL050c-GFP*::URA</i> <i>sgo1(Y47A;Q50A;S52A)-6HA::TRP1</i>	<i>MATa</i> <i>MATα</i>	SK1
AMy26603	<i>sgo1::SGO1-D519N-6HA::TRP1::LEU2</i>	<i>MATa</i>	W303
AMy26979	<i>sgo1::SGO1-P390H-6HA::TRP1</i>	<i>MATa</i>	W303
AMy27409	<i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i> <i>ARG4::pYKL050c-GFP*::URA</i> <i>spo11Δ::NAT</i> <i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i> <i>SGD.150521-151070::pYKL050c-RFP::LEU</i> (ARG4'ün yaklaşık 10kb sağı) <i>spo11Δ::NAT</i>	<i>MATa</i> <i>MATα</i>	SK1

Tablo 3.3 (devam).

Suş Adı	Genotipik Özellik	Cinsiyet	Köken
AMy27414	<p><i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP (CEN8'in yaklaşık 50kb sağı)</i></p> <p><i>SGD.115024-115572::pYKL050c-GFP*::URA(CEN8'in yaklaşık 10kb sağı)</i></p> <p><i>sgo1::KanMX6::P_{CLB2}: 3HA-SGO1</i></p> <p><i>spo11Δ::NAT</i></p> <p><i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i></p> <p><i>CEN8::pYKL050c-RFP::LEU</i></p> <p><i>sgo1::KanMX6::PCLB2-3HA-SGO1</i></p> <p><i>spo11Δ::NAT</i></p>	<p><i>MATa</i></p> <p><i>MATα</i></p>	SK1
AMy27419	<p><i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP (CEN8'in yaklaşık 50kb sağı)</i></p> <p><i>SGD.115024-115572::pYKL050c-GFP*::URA(CEN8'in yaklaşık 10kb sağı)</i></p> <p><i>spo11Δ::NAT</i></p> <p><i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP (CEN8'in yaklaşık 50kb sağı)</i></p> <p><i>CEN8::pYKL050c-RFP::LEU</i></p> <p><i>spo11Δ::NAT</i></p>	<p><i>MATa</i></p> <p><i>MATα</i></p>	SK1
AMy27426	<p><i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i></p> <p><i>SGD.150521-151070::pYKL050c-RFP::LEU (ARG4'ün yaklaşık 10kb sağı)</i></p> <p><i>sgo1::KanMX6::P_{CLB2}: 3HA-SGO1</i></p> <p><i>spo11Δ::NAT</i></p> <p><i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i></p> <p><i>ARG4::pYKL050c-GFP*::URA</i></p> <p><i>sgo1::KanMX6::PCLB2-3HA-SGO1</i></p> <p><i>spo11Δ::NAT</i></p>	<p><i>MATa</i></p> <p><i>MATα</i></p>	SK1
AMy27632	<i>sgo1::SGO1-D519N-yeGFP::KanMX6::LEU2</i>	<i>MATa</i>	W303
AMy27633	<i>sgo1::SGO1-P390H-yeGFP::KanMX6</i>	<i>MATa</i>	W303

Tablo 3.3 (devam).

Suş Adı	Genotipik Özellik	Cinsiyet	Köken
AMy27799	<i>MTW1-tdTomato::NAT</i> <i>MET-CDC20::URA3</i> <i>sgo1::SGO1-D519N-yeGFP::KanMX6::LEU2</i>	<i>MATa</i>	W303
AMy27843	<i>sgo1::SGO1-P390H-yeGFP::KanMX6</i> <i>MTW1-tdTomato::NAT</i> <i>MET-CDC20::URA3</i>	<i>MATa</i>	W303
AMy27993	<i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP (CEN8'in yaklaşık 50kb sağı)</i> <i>SGD.115024-115572::pYKL050c-GFP*::URA(CEN8'in yaklaşık 10kb sağı)</i> <i>sgo1::KanMX6::PCLB2: 3HA-SGO1</i> <i>rad61Δ::KanMX6</i> <i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i> <i>CEN8::pYKL050c-RFP::LEU</i> <i>sgo1::KanMX6::PCLB2-3HA-SGO1</i> <i>rad61Δ::KanMX6</i>	<i>MATa</i> <i>MATα</i>	SK1
AMy28083	<i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i> <i>SGD.150521-151070::pYKL050c-RFP::LEU (ARG4'ün yaklaşık 10kb sağı)</i> <i>sgo1::KanMX6::PCLB2: 3HA-SGO1</i> <i>rad61Δ::KanMX6</i> <i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i> <i>ARG4::pYKL050c-GFP*::URA</i> <i>sgo1::KanMX6::PCLB2-3HA-SGO1</i> <i>rad61Δ::KanMX6</i>	<i>MATa</i> <i>MATα</i>	SK1
AMy28084	<i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i> <i>SGD.150521-151070::pYKL050c-RFP::LEU (ARG4'ün yaklaşık 10kb sağı)</i> <i>rad61Δ::KanMX6</i> <i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i> <i>ARG4::pYKL050c-GFP*::URA</i> <i>rad61Δ::KanMX6</i>	<i>MATa</i> <i>MATα</i>	SK1

Tablo 3.3 (devam).

Suş Adı	Genotipik Özellik	Cinsiyet	Köken
AMy28085	<p><i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP (CEN8'in yaklaşık 50kb sağı)</i></p> <p><i>SGD.115024-115572::pYKL050c-GFP*::URA(CEN8'in yaklaşık 10kb sağı)</i></p> <p><i>rad61Δ::KanMX6</i></p> <p><i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i></p> <p><i>CEN8::pYKL050c-RFP::LEU</i></p> <p><i>rad61Δ::KanMX6</i></p>	<p><i>MATa</i></p> <p><i>MATα</i></p>	SK1
AMy28163	<p><i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i></p> <p><i>SGD.150521-151070::pYKL050c-RFP::LEU (ARG4'ün yaklaşık 10kb sağı)</i></p> <p><i>sgo1(Y47A;Q50A;S52A)-6HA::TRP1</i></p> <p><i>rad61Δ::KanMX6</i></p> <p><i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i></p> <p><i>ARG4::pYKL050c-GFP*::URA</i></p> <p><i>sgo1(Y47A;Q50A;S52A)-6HA::TRP1</i></p> <p><i>rad61Δ::KanMX6</i></p>	<p><i>MATa</i></p> <p><i>MATα</i></p>	SK1
AMy28298	<p><i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP (CEN8'in yaklaşık 50kb sağı)</i></p> <p><i>SGD.115024-115572::pYKL050c-GFP*::URA(CEN8'in yaklaşık 10kb sağı)</i></p> <p><i>sgo1(Y47A;Q50A;S52A)-6HA::TRP1</i></p> <p><i>rad61Δ::KanMX6</i></p> <p><i>THR1::pYKL050c-CFP::TRP</i></p> <p><i>CEN8::pYKL050c-RFP::LEU</i></p> <p><i>sgo1(Y47A;Q50A;S52A)-6HA::TRP1</i></p> <p><i>rad61Δ::KanMX6</i></p>	<p><i>MATa</i></p> <p><i>MATα</i></p>	SK1

Tablo 3.3 (devam).

Suş Adı	Genotipik Özellik	Cinsiyet	Köken
AMy28420	<i>irt1::NAT::pCUP-IME1</i>	<i>MATα</i>	SK1
	<i>pIME4::NAT::pCUP-IME4</i>		
	<i>MTW1-tdTomato::NAT</i>		
	<i>SGO1-yeGFP::KanMX</i>		
	<i>irt1::NAT::pCUP-IME1</i>		
	<i>pIME4::NAT::pCUP-IME4</i>		
	<i>MTW1-tdTomato::NAT</i>		
	<i>SGO1-yeGFP::KanMX</i>		
AMy28423	<i>irt1::NAT::pCUP-IME1</i>	<i>MATα</i>	SK1
	<i>pIME4::NAT::pCUP-IME4</i>		
	<i>MTW1-tdTomato::NAT</i>		
	<i>RTS1-yEGFP::KanMX</i>		
	<i>irt1::NAT::pCUP-IME1</i>		
	<i>pIME4::NAT::pCUP-IME4</i>		
	<i>MTW1-tdTomato::NAT</i>		
	<i>RTS1-yEGFP::KanMX</i>		

3.3.2 Tomurcuklanan Maya Besiyeri ve İlaçları

Bu çalışmada kullanılan tomurcuklanan maya besiyerleri ve içerikleri

Tablo 3.4’de verilmiştir. Besiyerlerine eklenen ilaçlar ve kimyasallar ise Tablo 3.5’de verilmiştir.

Tablo 3.4: Tomurcuklanan maya besiyeri içerikleri.

Besiyeri	İçerik
YEPDA katı besiyeri	Maya ekstraktı (% 1, w/v) Pepton (% 2, w/v) Glukoz (% 2, w/v) Adenin (0.3 mM) Agar (% 2, w/v)

Tablo 3.4 (devam).

Besiyeri	İçerik
% 4 YEPDA katı besiyeri	Maya ekstraktı (% 1, w/v) Pepton (% 2, w/v) Glukoz (% 4, w/v) Adenin (0.3 mM) Agar (% 2, w/v)
YPG katı besiyeri	Maya ekstraktı (% 1, w/v) Pepton (% 2, w/v) Gliserol (% 2.5, w/v) Adenin (0.3 mM) Agar (% 2, w/v)
Amino asit eksiltilmiş katı besiyeri	Glukoz (% 2, w/v) Amino asitsiz YNB (yeast nitrogen base) besiyeri (% 1, w/v) İstenilen amino asitsiz sentetik tam karışım (1X) Adenin (0.3 mM) Agar (% 2, w/v)
Minimal katı besiyeri	Glukoz (% 2, w/v) Amino asitsiz YNB (yeast nitrogen base) besiyeri (% 1, w/v) Agar (% 2, w/v)
SPO (sporulasyon) katı besiyeri	C ₂ H ₃ KO ₂ (potasyum asetat, % 1, w/v) Sentetik amino asit karışımı (1X) Agar (% 2, w/v)
YEPDA sıvı besiyeri	Maya ekstraktı (% 1, w/v) Pepton (% 2, w/v) Glukoz (% 2, w/v) Adenin (0.3 mM)
Amino asit eksiltilmiş sıvı besiyeri	Amino asitsiz YNB (yeast nitrogen base) besiyeri (% 1, w/v) İstenilen amino asitsiz sentetik tam karışım (1X) Glukoz (% 2, w/v) Adenin (0.3 mM)
BYTA sıvı besiyeri	Maya ekstraktı (% 1, w/v) Tripton (% 2, w/v) C ₂ H ₃ KO ₂ (potasyum asetat, % 1, w/v) C ₈ H ₅ KO ₄ (potasyum fitalat, 50 mM)
YPA sıvı besiyeri	Maya ekstraktı (% 1, w/v) Pepton (% 2, w/v) C ₂ H ₃ KO ₂ (potasyum asetat, % 1, w/v)
SPO (sporulasyon) sıvı besiyeri	C ₂ H ₃ KO ₂ (potasyum asetat, % 0.3) pH:7 (glasiyel asetik asitle ayarlandı)

Tablo 3.5: Tomurcuklanan maya besiyerlerinde kullanılan ilaçlar/ kimyasallar.

İlaç/ Kimyasal Adı	Kullanım Amacı	Konsantrasyonu
G418	KanMX markörünün tespiti	400 µg/ml
Clonat	NatMX6 markörünün tespiti	100 µg/ml
α-Faktör	Diploid hücrelerin izolasyonu	10 µg/ml
Nocodazole	Mikrotübül depolimerizasyonu	30 µg/ml
Benomil	Mikrotübül depolimerizasyonu	30 µg/ml
CuSO ₄	<i>pCUP1</i> promotorunun ekspresyonu	25 µM

3.3.3 Tomurcuklanan Mayalarda Vejetatif Büyüme

-80 °C’de tutulan w303 suşları YEPDA katı besiyerinde 30 °C sıcaklıkta büyütülmüştür. Haploid SK1 suşları ise -80 °C’den alınarak hücrelerdeki mitokondrinin varlığını sürdürmesini sağlayan YPG katı besiyerinde 30 °C sıcaklıkta 16 saat büyütülmüştür [78]. Daha sonra YEPDA katı besiyerine transfer edilen hücreler 30 °C sıcaklıkta büyütülmüştür. Tüm suşlarda seçici amino asit eksiltilmiş veya ilaç eklenmiş YEPDA katı besiyerleri spesifik markörlerin seçilmesi amacıyla kullanılmıştır. Sıvı besiyeri kullanıldığı zaman hacim erlenin % 10’unu aşmamıştır. Diploid SK1 suşları da -80 °C’den alınarak YPG katı besiyerinde 30 °C sıcaklıkta 16 saat büyütülmüştür. Ancak, sabah % 4 YEPDA katı besiyerine transfer edilmiştir ve 30 °C sıcaklıkta büyütülmüştür. Diploid SK1 hücrelerinin vejetatif büyümesini sağlamak için de az miktarda hücre YEPDA veya seçici sıvı besiyerlerie hacimleri % 10’u aşmayacak şekilde aktarılmıştır ve 30 °C sıcaklıkta 250 rpm’de çalkalanarak büyütülmüştür.

3.3.4 Nocodazole ile Metafaz Evresinde Tutuklanan Hücrelerin Büyütülmesi

Kromatin immünopresipitasyonu (ChIP) deneyi için metafaz evresinde tutuklanacak haploid hücreler 10 ml YEPDA sıvı besiyerinde 30 °C sıcaklıkta 250 rpm ’de 16 saat çalkalanarak büyütülmüştür. Daha sonra hücreler, 100 ml YEPDA sıvı besiyerinde OD₆₀₀= 0.2 olacak şekilde seyreltilmiştir ve oda sıcaklığında 3 saat boyunca çalkalanarak büyütülmüştür. Absorbansı tekrar ölçülen hücreler, OD₆₀₀= 0.2 olacak şekilde 1 ml nocodazole (1.5 mg/ml) eklenmiş ve 30 µg/ml benomil içeren YEPDA sıvı besiyerine (100 ml) alınmıştır ve 1 saat daha oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Bu sürenin sonunda tekrar 1 ml nocodazole (1.5 mg/ml) hücrelere eklenmiştir. 1 saat sonra hücreler deney için izole edilmiştir.

3.3.5 Benomil Hassasiyeti Testi

Bu test için 8, 10 ve 12 µg/ml benomil içeren YEPDA katı besiyerleri kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise benomil içermeyen YEPDA katı besiyeri kullanılmıştır. Test edilecek tüm suşlar deneye başlamadan önce YEPDA üzerinde tek koloni oluşturacak şekilde yayılmıştır ve 2 gün süreyle kolonilerin oluşması beklenmiştir. Steril 96 kuyucuklu plaka içerisinde 1:2.5 oranında seri dilüsyonlar yapılmıştır ve her kuyuya aynı anda girmeyi sağlayan metal mühür aracılığıyla alınan hücreler benomilli katı besiyerlerine ekilmiştir. 25 °C’de 3 gün boyunca hücrelerin büyümesi beklenmiştir.

3.3.6 Tomurcuklanan Mayaların Mayoz Bölünme için Büyütülmesi

Diploid hücreler YPG katı besiyerine ekilmiştir ve 16 saat 30 °C’de inkübe edilmiştir. Daha sonra % 4 YEPDA katı besiyerine alınan hücreler 8 saat 30 °C’de bekletilmiştir ve süre sonunda YEPDA sıvı besiyerine transfer edilerek 250 rpm hızda 30 °C’de büyütülmüştür. 24 saat sonra hücreler BYTA sıvı besiyerine OD600 = 0.2 olacak şekilde aktarılmıştır ve 16 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde 30 °C’de inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler steril su ile iki defa yıkanmıştır ve SPO sıvı besiyerine OD600 = 1.8 olacak şekilde eklenmiştir. Hücreler iki gün boyunca sporlanmaya bırakılmıştır.

3.3.7 Tomurcuklanan Mayaların Saklanması

Hücreler kısa süreliğine saklanacaksa uygun katı besiyeri üzerinde +4 °C’de saklanmıştır. Uzun süreli saklama amacıyla ise w303 suşları YEPDA, SK1 suşları da YPG katı besiyerleri üzerinde 30 °C’de 16 saat boyunca büyütülmüştür ve 1 ml % 20 ’lik gliserol çözeltisi içerisine transfer edilen hücreler -80 °C’de saklanmıştır.

3.3.8 Tomurcuklanan Mayalar için Yüksek Verimli Transformasyon

Tablo 3.6’da tomurcuklanan mayalarda gerçekleştirilen yüksek verimli transformasyon için gerekli solüsyonlar ve içerikleri verilmiştir.

Tablo 3.6: Tomurcuklanan mayalarda gerçekleştirilen yüksek verimli transformasyon solüsyonları.

Solüsyon	İçeriği
LiTE	LiAc (100 mM, pH: 7.5) Tris-HCl (10 mM, pH: 7.5) EDTA (1 mM, pH: 7.5)

Tablo 3.6 (devam).

Solüsyon	İçeriği
% 40 PEG solüsyonu	PEG4000 (% 40) LiAc (100 mM, pH: 7.5) Tris-HCl (10 mM, pH: 7.5) EDTA (1 mM, pH: 7.5)
TE	Tris-HCl (10 mM, pH: 7.5) EDTA (1 mM, pH: 7.5)

Tomurcuklanan maya 10 ml YEPDA besiyerinde 30 °C’de 250 rpm’de çalkalanarak 16 saat büyütülmüştür. Süre sonunda hücreler, OD₆₀₀ = 0.2 olacak şekilde tekrar 10 ml YEPDA sıvı besiyerinde seyreltilmiştir ve 30 °C’de çalkalanarak 4- 5 saat OD₆₀₀ = 0.6- 1 olana kadar inkübe edilmiştir. Hücreler 3000 rpm’de 3 dk santrifüj edilerek 10 ml saf su ile yıkanmıştır. Hücreler daha sonra 1.5 ml’lik eppendorf tüplerine alınarak 1 ml saf su ile 3000 rpm’de 2 dk santrifüj edilerek yıkanmıştır. Pellet 1 ml LiTE ile yıkanmıştır ve tekrar 50 µl LiTE içerisinde çözülmüştür. 200 µl ExTaq PCR ile çoğaltılmış DNA, 10 µl taşıyıcı somon sperm DNA’sı (10 mg/ml) ve 300 µl steril % 40 PEG solüsyonu hücrelere eklenerek 30 °C’de çalkalanarak 30 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra, 42 °C’de 15 dk ısı şokuna sokulan hücreler 6000 rpm’de 5 sn santrifüj edilmiştir. Pellet 150 µl TE solüsyonu ile çözdürülerek steril cam bilyeler kullanılarak katı besiyerine ekilmiştir ve 30 °C’de inkübe edilmiştir. Kullanılan plazmidte bulunan markör oksotrofik ise hücreler direk amino asit eksiltilmiş katı besiyerine ekilmiştir. Eğer ilaç seçicisi bir markör kullanılmışsa hücreler önce YEPDA katı besiyerine ekilmiştir ve 16 saat sonra ilgili ilacı içeren YEPDA katı besiyerine aktarılmıştır. Ortalama 2 gün sonra katı besiyerlerinde oluşan kolonilerden seçici katı besiyerleri üzerine tek koloni ekimi yapılmıştır. Oluşturulan suşların doğruluğu koloni PCR yöntemiyle kontrol edilmiştir.

3.3.9 Tomurcuklanan Maya Suşu Oluşturma

3.3.9.1 Tomurcuklanan Maya Suşlarının Sporlanma veya Diploid Oluşturma

Amacıyla Çaprazlanması

İki ayrı cinsiyetteki haploid tomurcuklanan mayalar -80 °C’den alınarak YPG (SK1) veya YEPDA (w303) üzerinde 30 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün kullanılacak seçici özelliği içeren suştan küçük bir miktar, seçici özelliği içermeyen karşı cinsiyetteki suştan ise büyük bir miktar alınarak YEPDA katı besiyerinde karıştırılmıştır ve 30 °C’de 8 saat eşleşmeleri için inkübe edilmişlerdir. Süre sonunda iploid hücreleri seçebilmek için seçici besiyerine tek koloni ekimi yapılmıştır. 2 gün sonra ortaya çıkan tek koloniler YEPDA katı besiyerine yayılmıştır ve 30 °C’de 16 saat inkübe edilmiştir. Diseksiyon yapabilmek için

hücrelerin sporlanmasını sağlayabilmek amacıyla diploidler SPO katı besiyerine koyulmuştur ve oda sıcaklığında 72 saat sporlanmaya bırakılmıştır.

Diploid SK1 hücreleri oluşturmak için ise büyük miktarda *MATa* hücreler, çok az miktarda *MATa* hücreler ile YEPDA katı besiyerinde karıştırılmıştır ve 30 °C'de 16 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra 10 µg/ml alfa faktör içeren YEPDA katı besiyerine tek koloni ekimi yapılmıştır ve besiyerinde kalan *MATa* haploid hücrelerinin tutuklanması sağlanmıştır. 30 °C'de 48 saat sonunda elde edilen tek koloniler (diploid hücreler) YEPDA katı besiyerine yayılarak 30 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Katı besiyerindeki diploid hücrelerin hem çiftleşme test suşları içeren minimal katı besiyerine hem de % 4 YEPDA besiyerine replika ekimi yapılmıştır ve 24 saat boyunca 30 °C'de büyümeleri beklenmiştir. *MATa* ve *MATa* içeren besiyerlerinin ikisinde de büyümeyen hücreler diploid olarak kabul edilmiştir ve % 4 YEPDA'dan alınan hücreler YPG katı besiyerine alınmıştır ve daha sonra dondurulmuştur.

3.3.9.2 Tetrad Diseksiyonu

SPO katı besiyerinde 72 saat sporulasyona bırakılan diploid hücrelere 20 µl zimolaz (1.2 M sorbitolde 1 mg/ml) eklenmiştir ve 15 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 1 ml saf su eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Önceden 37 °C'de 20dk ısıtılmış YEPDA katı besiyeri üzerine bu karışımdan petrinin ortasına bir çizgi halinde 20 µl damlatılmıştır ve Nikon Eclipse 50i ışık mikroskobuna bağlı mikromanipülatör sayesinde her bir tetrada ait sporların tek tek diseksiyonu yapılmıştır. YEPDA katı besiyeri 30 °C'de 48 saat bekletilmiştir ve sporların koloni oluşturması beklenmiştir. Oluşan koloniler YEPDA katı besiyeri üzerine yayılmıştır ve 24 saat 30 °C'de inkübe edilmiştir. Selektif besiyerleri üzerinde replika ekim testleri ve koloni PCR teknikleri ile sporların genotipleri doğrulanmıştır.

3.4 DNA Metotları

3.4.1 Çalışmada Kullanılan Plazmidler

Bu çalışmada kullanılan plazmidlerin listesi Tablo 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.7: Plazmid listesi.

Plazmid Adı	Detay
AMp470	6HA etiketi. Maya işaretçisi: TRP1 [79].

Tablo 3.7 (devam).

Plazmid Adı	Detay
AMp890	yEGFP etiketine sahip plazmid. Maya işaretçisi: KAN [80].
AMp899	SGO1 sekansı ve promotörü (sekansın ~1000 bp öncesi) YIPlac128'e klonlanmıştır. Maya işaretçisi LEU2.
AMp925	SGO1-P390H, YIPlac128'e klonlanmıştır.
AMp926	SGO1-D519N, YIPlac128'e klonlanmıştır.

3.4.2 Mini-prep Yöntemiyle *E. coli*'den Plazmid İzolasyonu

Mini-prep yöntemiyle plazmid izolasyonu için kullanılan solüsyonlar ve içerikleri Tablo 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.8: Mini-prep ve midi-prep yöntemlerinde kullanılan solüsyonlar ve içerikleri.

Solüsyon	İçerik
Glukozlu Tris EDTA Tamponu (GTE)	Tris-HCl (25 mM, pH: 7.5) Glukoz (50 mM) EDTA (10 mM, pH: 7.5)
Alkalın SDS (Taze Hazırlanır)	SDS (% 1, v/v) NaOH (200 mM)
Yüksek Tuzlu Tampon	C ₂ H ₃ KO ₂ (potasyum asetat, 2.5 M, pH: 4.8)
Tris EDTA Tamponu (TE)	Tris-HCl (10 mM, pH: 7.5) EDTA (1 mM, pH: 7.5)

2 ml LB+Amp içeren besiyerinden 37 °C'de 16 saat plazmidlerin çoğaltılması için büyütülmüş *E.coli* kültüründen 1.5 ml alınarak 13000 rpm'de 10 dk santrifüj gerçekleştirilmiştir ve süpernatant kısmı atılmıştır. Dibe çöken pellet kısmı 100 µl GTE solüsyonu ile çözdürülmüştür ve vortexlenmiştir. 150 µl Alkalın SDS çözeltisi ve 150 µl Yüksek Tuzlu Tampon eklenmiştir ve çözeltiler hafifçe çalkalanmıştır. Oluşan karışım 15 dk buz üzerinde bekletilmiştir ve 13000 rpm'de 5 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant 900 µl soğuk % 100 Etanol çözeltisi üzerine eklenmiştir ve tekrar 13000 rpm'de 5 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılmıştır ve dipte kalan DNA pelleti 200 µl soğuk % 70 Etanol çözeltisi içerisinde çözdürülmüştür. 13000 rpm'de 5 dk 4 °C'de santrifüj edilerek yıkanan DNA havada kurutulmaya bırakılmıştır ve 50 µl TE içerisinde çözülmüştür. 5ul RNAz (0.01 µg/ml) eklenen çözelti -20 °C'de saklanmıştır.

3.4.3 Midi-prep Yöntemiyle *E. coli*'den Plazmid İzolasyonu

Midi-prep yöntemiyle plazmid izolasyonu için kullanılan solüsyonlar ve içerikleri Tablo 3.8'de verilmiştir. LB+Amp içeren besiyerinde 37 °C'de 16 saat plazmidlerin çoğaltılması için büyütülmüş 50 ml *E. coli* kültürü 3600 rpm'de 10dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Pellet 2.5 ml GTE içerisinde çözülmüştür ve kısaca vortexlendikten sonra 5 ml Alkaline SDS solüsyonu yavaşça eklenmiştir. Soğuk 2.5 ml Yüksek Tuzlu Tampon da eklendikten sonra karışım 3600 rpm'de 5 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı yeni bir tübe steril mendil aracılığıyla süzülerek aktarılmıştır ve 10 ml % 100 izopropanol eklenerek 3600 rpm'de 5 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Pellet 750 µl TE içerisinde çözülmüştür ve 1 ml 5M LiCl eklenerek 20 dk buz üzerinde RNA'nın çökmesi için bekletilmiştir. 3600 rpm'de 5 dk 4 °C'de santrifüj edilen karışımdan süpernatant ayrılarak 3.5 ml soğuk % 100 etanol üzerine eklenmiştir ve -20 °C'de 10 dk bekletilmiştir. 3600 rpm'de 5 dk 4 °C'de tekrar santrifüj edilerek pellet 200 µl TE ile çözülmüştür ve 500 µl 0.3 M etanolde çözdürülmüş NaAc eklenerek -20 °C'de 10 dk bekletilmiştir. Sonrasında oluşan pellet tekrar 13000 rpm'de 5 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir ve 200 µl % 70'lik soğuk etanol eklenerek santrifüj edilmiştir. Havada kurutulan DNA 200 µl TE ile çözülmüştür ve -20 °C'de saklanmıştır.

3.4.4 Tomurcuklanan Mayadan Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için kullanılan solüsyonlar Tablo 3.9'da verilmiştir.

Tablo 3.9: Genomik DNA izolasyonu için kullanılan solüsyonlar.

Solüsyon	İçerik
Parçalama tamponu	Tris-HCl (10 mM, pH: 8) NaCl (100 mM) Triton X-100 (% 2, v/v) SDS (% 1, v/v) EDTA (1 mM, pH: 8)
Tris EDTA Tamponu (TE)	Tris-HCl (10 mM, pH: 7.5) EDTA (1 mM, pH: 7.5)

Haploid veya diploid tomurcuklanan mayalar 24 saat boyunca YEPDA katı besiyeri üzerinde 30 °C'de büyütülmüştür. Bir kürdanın ucu kadar miktarda hücre 200 µl parçalama tamponu içerisinde çözülmüştür ve üzerine bir miktar cam bilye (0.5 mM zirkonya/silika cam bilyeler, Biospec Products) ve 200 µl fenol: kloroform çözeltilisinin (25:24:1, Sigma P3803) alt katmanından eklenmiştir. Karışım multi-vortex aracılığıyla 3 dk karıştırılmıştır ve 13000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı 1 ml soğuk % 100 etanol üzerine

eklenmiştir ve hafifçe sallanarak karıştırılmıştır. 13000 rpm’de 5 dk santrifüj edildikten sonra oluşan DNA pelleti 50 µl TE içerisinde çözülmüştür ve -20 °C’de saklanmıştır.

3.4.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Protokolleri

3.4.5.1 ExTaq DNA Polimeraz Kullanılarak Gerçekleştirilen PCR

Maya transformasyonu veya sekanslama gibi amaçlarla DNA’nın yüksek doğrulukta çoğaltılması için PCR, ExTaq (TaKaRa RR001) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Primerler 55 °C bağlanma sıcaklığı (annealing) olacak şekilde dizayn edilmiştir. Kullanılan reaksiyon içeriği ve programı Tablo 3.10 ve Tablo 3.11 ’de verilmiştir.

Tablo 3.10: ExTaq PCR içeriği.

Solüsyon	Hacim (µl)
dH ₂ O	155
10x ExTaq PCR Tamponu	20
ExTaq dNTP karışımı	16
İleri primer (100 µM)	2
Geri primer (100 µM)	2
ExTaq	1
DNA	4

Tablo 3.11: ExTaq PCR programı.

	Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
30 Kere Tekrar	1	98	5:00
	2	98	0:30
	3	55	0:45
	4	72	1 dk/ kb
	5	72	1dk/ kb
	6	10	Sonsuz

3.4.5.2 Q5 DNA Polimeraz ile Gerçekleştirilen PCR

DNA'nın klonlama amacıyla çoğaltılması için Q5 polimeraz (NEB) kullanılarak PCR gerçekleştirilmiştir. Primerler 55 °C bağlanma sıcaklığı (annealing) olacak şekilde dizayn edilmiştir. Kullanılan reaksiyon içeriği ve programı Tablo 3.12 ve Tablo 3.13 'de verilmiştir.

Tablo 3.12: Q5 PCR içeriği.

Solüsyon	Hacim (µl)
dH ₂ O	69
5x Q5 Reaksiyon Tamponu	20
2.5 mM dNTP karışımı (Promega)	8
İleri primer (100 µM)	0.5
Geri primer (100 µM)	0.5
Q5 Polimeraz	1
DNA	1

Tablo 3.13: Q5 PCR programı.

	Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
	1	98	0:30
30 Kere Tekrar	2	98	0:10
	3	55	0:30
	4	72	1 dk/ kb
	5	72	2:00
	6	10	Sonsuz

3.4.5.3 Maya Koloni PCR

Koloni PCR tekniğinin uygulanması için Prof. Dr. Adele Marston'ın laboratuvarında saflaştırılmış Taq polimeraz, 2.5 mM dNTP (Promega) ve 10x PCR tamponu (100 mM Tris-HCl pH: 8.3, 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂, % 0.1 jelatin) kullanılmıştır. Primerler 55- 60 °C aralığında bağlanma sıcaklığına sahip olacak şekilde dizayn edilmiştir. Reaksiyon buz üzerinde kurulmuştur ve çok küçük miktarda maya hücresi direk olarak PCR tüpüne eklenmiştir, hafifçe karıştırılan tüpler hızlıca önceden ısısı ayarlanmış PCR cihazına konulmuştur. Reaksiyon içeriği Tablo 3.14'te, PCR programı ise Tablo 3.15'te verilmiştir.

Tablo 3.14: Maya koloni PCR içeriği.

Çözelti	Hacim (µl)
10x PCR tamponu	2
dNTP	1.6
İleri Primer (20 µM)	1
Geri Primer (20 µM)	1
Taq Polimeraz	0.4
dH ₂ O	14

Tablo 3.15: Maya koloni PCR programı.

	Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
	1	95	10:00
30 Kere Tekrar	2	95	0:30
	3	55- 60	0:30
	4	72	3: 00
	5	72	5: 00
	6	10	Sonsuz

3.4.5.4 Kuantitatif PCR (qPCR)

qPCR için bölüm 3.5.4'te verilen kromatin immünopresipitasyonu (ChIP) protokolünden elde edilen DNA örnekleri kullanılmıştır. Input DNA 1: 300 oranında, ChIP DNA ise 1:6 oranında steril ultra saf su (Hypure Molecular Biology Grade Water, GE Lifesciences) içerisinde çözülmüştür. Tablo 3.16'da verilen reaksiyon içeriği 96 kuyucuklu plaka (Roche) kullanılarak 3 tekrarlı halde hazırlanmıştır.

Tablo 3.17'de verilen qPCR programı Lightcycler 480 Roche cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primerler ise Tablo 3.18'de verilmiştir.

Tablo 3.16: qPCR içeriği.

Solüsyon	Hacim (µl)
Luna Universal qPCR Master Mix (NEB)	5
İleri Primer (20 µM)	0.125
Geri Primer (20 µM)	0.125
Steril Ultra Saf Su	1.750
DNA	3

Tablo 3.17: qPCR programı.

Adım	Sıcaklık (°C)	Süre	Yakalama (Acquisition)
Pre-inkübasyon	95	1 dk	Yok
Amplifikasyon	95	15 sn	Yok
	60	30 sn	Bir kere
	Amplifikasyon basamağı 42 defa tekrar edilmiştir.		
Erime eğrisi (Melting curve)	95	5 sn	Yok
	65	40 sn	Yok
	97	65 - 97 arası sıcaklıklarda 0.3 °C/ sn artış	Her 1 °C sıcaklık artışı başına iki adet
Tutma	55	Sonsuz	Yok

Tablo 3.18: qPCR için kullanılan primerler.

Lokus	Primer Adı	Oligonükleotid Sekansı	Primer Verimi
Sentromer	8172	GCCGAGGCTTTCATAGCTTA	2.098
Sentromer	8173	GACGATAAAACCGGAAGGAAG	2.098
Kol	8175	GCTACCACCAATAACACAGTTGAG	1.881
Kol	8176	GTACCTTCCCTGATAATCCGTCT	1.881

Tablo 3.18 (devam).

Lokus	Primer Adı	Oligonükleotid Sekansı	Primer Verimi
Perisentromer	8601	GGTCATGGTTGTCCTTCCTCTAAG	2.228
Perisentromer	8602	AACCTCATTCGTCATGTGAGAG	2.228

Roche Lightcycler 480 yazılımı kullanılarak her bir qPCR reaksiyonunun eşik döngüsü (Ct) 2. türev maksimum algoritması kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen değerler daha sonra Microsoft Excel ile aşağıda verilen formüller (3.1 ve 3.2) ile hesaplanmıştır;

$$\Delta Ct = Ct_{CHIP} - (Ct_{Input} - \log_{\text{primer verimliliği}}^{\text{Input sulandırma katsayısı}}) \quad (3.1)$$

$$\frac{CHIP}{Input} \text{ Zenginliği} = \text{Primer Verimliliği}^{-\Delta Ct} \quad (3.2)$$

3.4.6 PCR Pürifikasyonu

PCR sonu elde edilen ürünün pürifikasyonu Qiagen QIAquick PCR pürifikasyon kiti ile markanın sağladığı protokol kullanılarak gerçekleştirilmiştir [81]. Bu amaçla 200 µl örnek üzerine 1000 µl PB tamponu eklenmiştir ve kolona yüklenmiştir. 13200 rpm’de 1 dk santrifüj edilen kolondan akan kısım atılmıştır ve 750 µl PE tamponu eklenmiştir. 13200 rpm’de 2 defa 1dk santrifüj edilen kolondan akan kısım tekrar atılmıştır. Temiz bir tüpe alınan kolon üzerine 35 µl saf su eklenerek 13200 rpm’de 1 dk santrifüj gerçekleştirilmiştir ve tüp dibinde saf PCR örneği elde edilmiştir.

3.4.7 Agaroz Jel Elektrofrez

PCR, klonlama veya sonikasyon (ChIP) sonucunda elde edilen DNA ürünlerini gözlemleyebilmek amacıyla etidyum bromür ile agaroz jel elektrofrez gerçekleştirilmiştir. Agaroz jelinin hazırlanması için % 1 w/v agaroz (ChIP sonikasyon verimliliği testi için % 2), TAE tamponu (40 mM Tris, 1 mM EDTA, % 0.11 v/v asetik asit) içerisinde mikrodalga fırın kullanılarak çözdürülmüştür. Sıvı haldeki agaroz ılıdıktan sonra 0.5 µg/ml etidyum bromid eklenerek jel küvetine dökülmüştür ve kuyucukları oluşturan tarak takılmıştır. Kuyucukları oluşmuş ve donmuş agaroz jel TAE solüsyonu içine yerleştirilmiştir. 5- 20 µl DNA ürünü Orange G boyası (% 0.1 w/v Orange G, %10 Gliserol, 1 mM EDTA pH: 8) ile

karıştırılmıştır. Karışımlar ve DNA ürününün büyüklüğünün saptanması için kullanılan 7.5 µl DNA markörü (NEB 1 kb DNA ladder) kuyucuklara yüklenmiştir ve 90 V 'da 30- 45 dk elektrik akımı verilerek DNA yürütülmüştür. UV trans-ilüminatörü kullanılarak DNA ürünü gözlemlenmiştir.

3.4.8 Etanol Presipitasyonu

DNA'nın etanol ile çöktürülmesi için toplam hacminin % 10'u kadar 3M NaAc ve 2.5 kat hacimde soğuk % 100 etanol eklenmiştir. 30 dk süre ile - 20 °C'de bekletilen karışım 13000 rpm'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmıştır ve DNA 400 µl soğuk % 70 etanol ile yıkanmıştır. Havada kurutulan DNA 5- 10 µl su ile çözülmüştür ve - 20 °C'de saklanmıştır.

3.4.9 Klonlama

3.4.9.1 Gibson Assembly Tekniği ile Klonlama

Eklenecek parça ve iskelet DNA'nın çoğaltılması için iki ayrı Q5 polimeraz kullanılarak PCR gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel ile istenen boyutlarda elde edildiği doğrulanan 95 µl PCR ürünü üzerine 15 µl Cutsmart Tamponu (NEB), 37 µl su ve 3 µl DpnI (NEB) eklenerek 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra PCR pürifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA'nın konsantrasyonu nanodrop cihazı ile ng/ µl olarak ölçülmüştür. Birleştirilecek DNA fragmanlarının molaritelerinin eşit olmasına dikkat edilerek toplamda 5 µl alınmıştır ve 15 µl Gibson solüsyonuna (Gibson Assembly Cloning Kit, NEB) eklenmiştir [82]. 50 °C'de 30 dk süre ile inkübe edilen karışım kimyasal kompetan DH5α *E. coli* hücrelerine transforme edilmiştir.

3.4.9.2 Yönlendirilmiş Mutagenез

Plazmidlerde yönlendirilmiş mutagenез QuikChange II XL kiti (Agilent Technologies) kullanılarak gerçekleştirilmiştir [1]. Bu amaçla Tablo 3.19'da içeriği verilen PCR reaksiyonu Tablo 3.13'deki koşullarda bağlanma sıcaklığı 55- 60 °C olacak şekilde 17 devir ile gerçekleştirilmiştir. 50 µl PCR ürünü üzerine 10 µl Cutsmart Tamponu (NEB), 39 µl su ve 1 µl DpnI (NEB) eklenerek 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra etanol presipitasyonu ve XL10-Gold *E. coli* transformasyonu gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.19: Yönlendirilmiş mutagenез reaksiyon içeriği.

Solüsyon	Hacim (µl)
10x PCR tamponu	5
dNTP	1
İleri Primer (20 µM)	2
Geri Primer (20 µM)	2
Quik Solüsyonu	3
dH ₂ O	36
PfuUltra High Fidelity DNA Polimeraz	1

3.4.10 DNA'nın Sekanslanması

3.4.10.1 Plazmid DNA'sının Sekanslanması

Plazmid DNA'sının sekanslanması için Big Dye Terminator Kit versiyon 3.1 (Applied Biosystems) kullanılmıştır. Primerler sekanslanması istenen bölge içerisinde, klonlama merkezine yakın ve her bir primer yaklaşık 500 baz çiftlik alana bağlanacak şekilde dizayn edilmiştir. Kullanılan reaksiyon içeriği ve PCR programı Tablo 3.20 ve Tablo 3.21'de verilmiştir. Sekanslama analizi ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems) ile gerçekleştirilmiştir. Sekanslama sonuçları Benchling online yazılımı ile analiz edilmiştir.

Tablo 3.20: Plazmid DNA'sının sekanslanması için kullanılan reaksiyon içeriği.

Solüsyon	Hacim (µl)
dH ₂ O	4.5
Plazmid DNA	1
5 µM Primer	0.5
5X Sekanslama Tamponu	2
BigDye V3.1	2

Tablo 3.21: Plazmid DNA'sının sekanslanması için kullanılan PCR programı.

	Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
	1	95	5:00
25 Kere Tekrar	2	95	0:30
	3	55	0:15
	4	60	4:00
	5	10	Sonsuz

3.4.10.2 Maya gDNA'sının Sekanslanması

Tomurcuklanan mayada genomik bir bölgenin sekanslanabilmesi için öncelikle DNA bölgesi ExTaq PCR ile çoğaltılmıştır. Daha sonra PCR pürifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ürün Tablo 3.22'de verildiği gibi sekanslama reaksiyonuna eklenmiştir ve Tablo 3.23'de verilen program uygulanmıştır. Sekanslama analizi ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems) ile gerçekleştirilmiştir. Sekanslama sonuçları Benchling online yazılımı ile analiz edilmiştir.

Tablo 3.22: Maya gDNA'sının sekanslanması için kullanılan reaksiyon içeriği.

Solüsyon	Hacim (µl)
PCR ürünü	4
Sekanslama Primeri (8 µM)	2
BigDye V3.1	4
Sekanslama Tamponu	1

Tablo 3.23: Maya gDNA'sının sekanslanması için kullanılan PCR programı.

	Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
25 Kere Tekrar	1	96	0:30
	2	50	0:15
	3	60	4:00
	4	10	Sonsuz

3.5 Protein Metotları

3.5.1 Protein İzolasyonu

Tomurcuklanan mayadan protein izolasyonunun gerçekleştirilmesi için TCA (trikloroasetik asit) ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Bu metot için kullanılan solüsyonlar ve içerikleri Tablo 3.24’de verilmiştir. 10 ml YEPDA sıvı besiyeri içerisinde büyütülmüş ($OD_{600} = 0.8 - 1.2$) hücreler 3000 rpm’de 3 dk santrifüj edilmiştir ve süpernatant atılmıştır. Pellet üzerine % 5 TCA solüsyonundan (w/v) 5 ml eklenmiştir ve örnekler buzda 10 dk bekletilmiştir. 3000 rpm’de 3 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülmüştür ve pellet dipte kalan TCA sıvısında çözdürülerek 2 ml fast-prep tüplerine (MP Biomedicals) alınmıştır. 13200 rpm’de 30 sn 4 °C’de santrifüj edilen tüplerdeki süpernatant aspire edilmiştir ve tüpler sıvı azotta aniden dondurulmuştur ve -80 °C’de saklanmıştır.

Örnekler oda sıcaklığında çözdürüldükten sonra 1 ml aseton eklenmiştir ve örnekler vortexlenmiştir. 13200 rpm’de 7 dk santrifüj edilen örneklerin süpernatant kısmı atılmıştır. Pellet minimum 4 saat oda sıcaklığında çeker ocak içerisinde kurutulmuştur ve aseton tamamen uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hücrelere 100 µl protein ortaya çıkarma tamponu ve bir miktar cam bilye (0.5mM zirconia/silica cam bilyeler, Biospec Products) eklenerek Fastprep Bio- Pulveriser FP120 cihazında 6.5 hızda 3 defa 45 saniye boyunca çalkalanarak parçalanması sağlanmıştır. Örneklerin üzerine 50 µl 3x SDS örnek tamponu eklenmiştir ve 95 °C’de 5 dk kaynatılmıştır. 13200 rpm’de 5 dk santrifüj gerçekleştirildikten sonra süpernatant kısmı temiz bir tüpe alınarak -20 °C’de saklanmıştır.

Tablo 3.24: TCA protein izolasyonu yönteminde kullanılan solüsyonlar ve içerikleri.

Solüsyon	İçeriği
Tris EDTA Tamponu (TE)	Tris-HCl (10 mM, pH: 7.5) EDTA (1 mM, pH: 7.5)
Protein Ortaya Çıkarma Tamponu	Tris EDTA Tamponu (TE, 1 ml) Dithioreitol (DTT, 2.75 µl, 1M) Roche EDTA-free proteaz inhibitörü (1 tablet 1 ml dH ₂ O’da çözdürülmüştür ve 20 µl kullanılmıştır.)

Tablo 3.24 (devam).

Solüsyon	İçeriği
3x SDS Örnek Tamponu	Tris-HCl (187 mM, pH: 6.8) β-mercaptoethanol (% 6, v/v) Gliserol (% 30, v/v) SDS (% 9, v/v) Bromofenol mavisini (% 0.05, w/v)

3.5.2 SDS- PAGE

Biorad SDS- PAGE jel sistemi kullanılarak 5 ml ayırma jeli, 2 ml yükleme jeli Tablo 3.25'te verilen içerikler kullanılarak hazırlanmıştır. İki cam plaka etanol ile temizlenmiştir ve arasına 5 ml ayırma jeli karışımı eklenmiştir. Üzerine ince bir tabaka halinde isopropanol eklenmiştir ve jel donmaya bırakılmıştır. Donan jel üzerindeki isopropanol dökülerek 2 ml yükleme jel karışımı jel üzerine eklenmiştir ve tarak koyularak kuyucukların oluşması beklenmiştir. Ayırma jeli de donduktan sonra jel içeren cam plakalar SDS yürütme tamponu (25 mM Tris, 190 mM glisin, % 0.01 w/v SDS) içeren tank içerisine alınmıştır. 10 µl protein örneği ve 8 µl protein markörü (NEB P7712S) kuyucuklara yüklenmiştir. SDS- PAGE jeli önce 120 V'da 15 dk, sonra 180 V'da yaklaşık 1 saat yürütülmüştür.

Tablo 3.25: SDS- PAGE yükleme ve ayırma jeli solüsyonları ve içerikleri.

Solüsyon	İçeriği
% 8 Ayırma Jeli	3.59 ml dH ₂ O 1.25 ml 4X Ayırma Tamponu, pH: 8.8 (% 0.4 w/v SDS, 1.5 M Tris) 1.33 ml % 30 akrilamid : % 0.8 bisakrilamid 0.08 ml % 10 ammonyum persulfat (APS) 0.01 ml tetrametiletildiamin (TEMED)
Yükleme Jeli	1.778 ml dH ₂ O 0.667 ml % 30 akrilamid : % 0.8 bisakrilamid 2.5 ml 2x Yükleme Tamponu (250 mM Tris, % 0.2 w/v SDS, pH: 6.8) 0.050 ml % 10 ammonyum persulfat (APS) 0.005 ml tetrametiletildiamin (TEMED)

3.5.3 Western Blot

Küçük Biorad SDS-PAGE jeli nitroselüloz membran (0.45 µM, GE Healthcare) ve blot kağıtları arasında sandviç hale getirilerek transfer tamponu (25 mM Tris, % 1.5 w/v glisin, % 0.02 w/v SDS, % 10 v/v MeOH) içeren tank içerisine konulmuştur. Tank içerisine aşırı ısınmayı engelleyen buz aküleri koyulmuştur ve 90 V'da 90 dk transfer gerçekleştirilmiştir. Transfer tamamlandıktan sonra nitroselüloz membran su ile yıkandıktan sonra Ponceu boyası (% 0.47 w/v Ponceau S, % 3 w/v TCA, % 1 v/v asetik asit) ile 2 dk boyunca yıkanarak protein bantları gözlenmiştir ve transferin gerçekleştiği doğrulanmıştır. Su ile yıkanan nitroselüloz membran % 0.05 Tween20 içeren PBS (13.7 mM NaCl, 270 µM KCl, 1 mM Na₂PO₄, 176 µM KH₂PO₄) içerisinde hazırlanmış (PBST) % 5 süt ile 1 saat oda sıcaklığında bloklanmıştır. Primer antikor (Tablo 3.26) ise PBST içerisinde hazırlanmış % 2 süt karışımına eklenmiştir ve nitroselüloz membran primer antikor çözeltisi ile 16 saat boyunca 4 °C'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. PBST ile 3 defa oda sıcaklığında 15 dk çalkalanarak yıkanan membrana PBST içerisinde hazırlanmış % 2 süt çözeltisi içerisinde çözülmüş sekonder antikor eklenmiştir (Tablo 3.26) ve 1 saat oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edilmiştir. Membran daha sonra 3 defa PBST ve 1 defa PBS ile 5 dk yıkanmıştır. Proteinlerin gözlenebilmesi için SuperSignal West Pico chemiluminescence kiti (Thermo Scientific) kullanılmıştır. Zayıf protein sinyallerinin tespiti için ise SuperSignal West Femto chemiluminescence kit (Thermo Scientific) kullanılmıştır. Nitroselüloz membran, karanlık odada Konica-Minolta SRX-101A cihazı kullanılarak X- ray filmine basılmıştır.

Tablo 3.26: Western Blot için kullanılan antikorlar.

Antikor	Kaynak Tür	Konsantrasyon	Primer/ Sekonder	Marka
HA (12CA5)	Fare	1/ 1000	Primer	Roche (11666606001)
GFP	Fare	1/ 1000	Primer	Roche (11814460001)
Pgk1	Tavşan	1/ 10000	Primer	Adele Marston lab. üretimi (C. Fox)
Kar2	Tavşan	1/ 100000	Primer	Adele Marston lab. üretimi (C. Fox)
Anti- fare	Koyun	1/ 5000	Sekonder	VWR GE healthcare (NXA931)

Tablo 3.26 (devam).

Antikor	Kaynak Tür	Konsantrasyon	Primer/ Sekonder	Marka
Anti- tavşan	Eşek	1/ 5000	Sekonder	VWR GE healthcare (NA934)

3.5.4 Kromatin İmmünopresipitasyonu (ChIP)

Kromatin immünopresipitasyonu (ChIP), Vezijlbergen ve arkadaşlarının (2014) metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir [26] ve bu test için kullanılan solüsyonlar Tablo 3.27’de verilmiştir.

Tablo 3.27: ChIP solüsyonları.

Solüsyon Adı	İçeriği
Diluent	Hepes-KOH (71.43 mM, pH: 7.5) NaCl (143 mM) EDTA (1.43 mM)
Fikse Edici Solüsyon	Formaldehid (3 ml, % 37) Diluent (7 ml)
TBS	Tris-HCl (20 mM, pH: 7.5) NaCl (150 mM)
2X FA lizis tamponu	Hepes-KOH (100 mM, pH: 7.5) NaCl (300 mM) EDTA (2 mM) Triton X-100 (% 2, v/v) Na Deoxycholate (0.2, % v/v)
ChIP Yıkama Tamponu No:1	FA lizis tamponu (1X) SDS (% 0.1, v/v) NaCl (275 mM)
ChIP Yıkama Tamponu No:2	FA lizis tamponu (1X) NaCl (500 mM) SDS (% 0.1, v/v)
ChIP Yıkama Tamponu No:3	Tris-HCl (10 mM , pH: 8) NP-40 (%0.5, v/v) LiCl (250 mM) EDTA (1 mM) Na Deoxycholate (% 0.5, v/v)

Tablo 3.27 (devam).

Solüsyon Adı	İçeriği
ChIP Yıkama Tamponu No:4	Tris-HCl (10 mM, pH: 8) EDTA (1 mM)

100 ml maya kültürünü metafazda yakalamak için mikrotübülleri depolarize eden 30 µg/ml nocodazole ve benomyl kullanılmıştır. TCA örneği hazırlamak için 10 ml ve DAPI sayımı için 200 µl ayırdıktan sonra hücreler, fikse edici solüsyon ile 2 saat boyunca oda sıcaklığında düşük frekansta çalkalama ile fikse edilmiştir. Daha sonra hücreler 3000 rpm’de 4 °C’de 3 dk santrifüj edilmiş ve pelet TBS solüsyonu ile iki defa, % 0.1 SDS içeren FA lizis solüsyonu ile 1 defa yıkanmıştır. Hücreler daha sonra Fastprep tüplerine (MP biomedical) alınmıştır ve 13200 rpm’de santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelet sıvı azot içerisinde dondurulmuştur ve örnekler -80 °C’de saklanmıştır. 16 saat sonra hücrelere buz üzerinde çözülmüştür ve % 0.5 SDS, 1x proteaz inhibitörü (Sigma, cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail) ve 1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) içeren 400 µl FA lizis tamponu, yaklaşık 200 µl silika boncuklar ile birlikte eklenmiştir. Lizis işlemi MP Biomedicals™ FastPrep cihazında 3 defa 30 saniye süresince 6.5 hızda 10 dakikalık molalar ile (buz üzerinde) gerçekleştirilmiştir. Silika boncuklardan ayrılan hücre lizatları daha sonra 13200 rpm’de 4°C’de 15 dakika santrifüj edilmiştir ve pelet önce 1 ml % 0.1 SDS, 1x proteaz inhibitörü ve 1 mM PMSF içeren soğuk FA lizis solüsyonunda çözdürülmüştür ve tekrar santrifüj edilerek 300 µl’lik aynı solüsyonda çözdürülmüştür. DNA’yı 300- 500 bp’lık parçalara ayırmak için hücreler BioRuptor Twin sonicator (Diagenode) cihazında yüksek ayarda 30 saniye aç- 30 saniye kapa modunda 30 defa sonike edilmiştir. Daha sonra örnekler 13200 rpm’de 4 °C sıcaklıkta santrifüj edilmiştir ve süpernatant üzerine % 0.1 SDS, 1x proteaz inhibitörü ve 1 mM PMSF içeren 500 µl FA lizis tamponu eklenmiştir. Örnekler 15 dk 13200 rpm’de 4 °C’de tekrar santrifüj edilmiştir ve 1 ml süpernatant “IP” örneği olarak, 100 µl sonikasyon verimini test etmek için ve 10 µl ise “input” örneği olarak ayrılmıştır. Input örnekleri - 20 °C’de saklanmıştır.

Sonikasyon verimi için ayrılan 100 µl lizat üzerine 80 µl TE ve 20 µl proteinaz K (10 mg/ml, Promega) eklenmiştir. 42 °C’de 1 saat inkübe edilen örnek daha sonra 65 °C’de 16 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra PCR pürifikasyonu gerçekleştirilmiştir ve örnekler % 2’lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir.

IP örneklerine, daha önceden 4 kere % 0.1 SDS, 1x proteaz inhibitörü ve 1 mM PMSF içeren FA lizis tamponu ile yıkanmış Protein G Dynabeads bilyeleri (herbir IP için 15 µl) eklenmiştir. 7.5 µl 12CA5 α-Ha (Fare, 0.4 mg/ml, Roche) antikoru da bilye-lizat karışımına eklenerek 4 °C'de 16 saat rotasyona bırakılmıştır. Bilyeleri içeren IP örnekleri dönen mıknatıslı tüplük üzerinde 5 dakikalık bekleme aralıklarıyla 4 farklı ChIP yıkama tamponu ile yıkanmıştır. IP ve input örneklerine 200 µl % 10'luk Chelex (Bio-Rad) eklendikten sonra, tüpler 100°C'de 10 dk kaynatılmış ve 2000 rpm'de santrifüj edilerek 2.5 µl proteinaz K (10 mg/ml, Promega) ile 55 °C'de 30dk bekletilmiştir. Proteinaz K'yı inaktive edebilmek için örnekler tekrar 100 °C'de 10 dk kaynatılmıştır ve santrifüj sonrası yaklaşık 120 µl süpernatant qPCR analizi için ayrılmıştır ve - 20 °C'de saklanmıştır.

3.6 Mikroskopi Metotları

3.6.1 Etanol Fiksasyonu ve DAPI Sayımı

ChIP esnasında hücrelerin senkronize olarak metafazda yakalandığından emin olabilmek için hücreler etanol ile fikse edilmiştir ve DAPI ile boyanmıştır. Bu sebeple, ChIP protokolünde belirtildiği gibi ayrılmış olan 200 µl hücre 3000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra pellet üzerine 800 µl % 80 etanol eklenerek fikse edilen hücreler 4 °C'de saklanmıştır. Daha sonra etanolde fikse edilmiş hücreler 13200 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir ve etanol atılmıştır. Pellet üzerine 20 µl DAPI boyası (1 µg/ml) eklenmiştir. Her örnekten 3 µl alınarak 1 mm cam lam üzerine koyulmuştur ve 18 x 18 mm lamel ile kapatılmıştır. 100x Plan ApoChromat NA 1.4 oil lensine sahip Zeiss Axioplan 2 floresan mikroskobu ile 200 hücre sayılmıştır.

3.6.2 Floresan Krossover Haberci Testi

10 ml SPO besiyeri içerisinde mayoz bölünmeye bırakılmış hücrelerden 2 günün sonunda 1.5 ml alınmıştır ve 3000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir. Sporların ascustan ayrılmasına sebep olmadan ascus duvarını gevşetmek amacıyla pellet üzerine 100 µl zimolaz (10 mg/ml) eklenmiştir [83] ve 30 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir. 3000 rpm'de 3 dk santrifüj edilen hücrelere 100 µl 1.2 M sorbitol eklenmiştir. Örneklerden 5 µl alınarak lam üzerine konulmuştur ve lamel kapatılarak preparatlar hazırlanmıştır. 100x Plan ApoChromat NA 1.4 oil lensine sahip Zeiss Axioplan 2 floresan mikroskobu, Micro Manager yazılımının Multi-D Acquisition modunda DAPI (CFP etiketi için), YFP (GFP etiketi için) ve TRITC (RFP etiketi için) kanalları kullanılarak tetradların fotoğrafları çekilmiştir. Fotoğraflar daha sonra

Image J yazılımı ile David Kelly (Edinburgh Üniversitesi) tarafından hazırlanmış bir eklenti kullanılarak skorlanmıştır. Bu eklenti ile sadece benzer DAPI şiddetine sahip (en az % 80 benzerlik) sporların bulunduğu tetradlar skorlanmıştır. Yeşil/ kırmızı ışımalar için maksimum şiddetin 1000 ve üzeri olduğu tetradlar yeşil/ kırmızı olarak belirlenmiştir. Bir sporda hem yeşil hem de kırmızı sinyal 1000 ve üzeri ise o spor sarı olarak belirlenmiştir. Skorlama sonuçlarının rekombinasyon frekansına (Morgans) dönüştürülmesi Oregon Üniversitesi Moleküler Biyoloji Enstitüsü'nden Prof. Franklin W. Stahl tarafından hazırlanmış online hesaplama aracı ile gerçekleştirilmiştir [84].

3.6.3 Floresan Mikroskobu ile Canlı Hücre Görüntüleme

3.6.3.1 Ibidi Plakalarının Hazırlanması

Floresan mikroskobu altında hücrelerin uygun sıvı ortamda immobilize halde incelenebilmesi için 8 plakalı cam Ibidi plakaları kullanılmıştır. Hücrelerin cam tabana yapışması için [85] 50 mM $MnCl_2$ içerisinde 5 mg/ml olacak şekilde hazırlanmış Concanavalin A (ConA)'dan her kuyucuğu 45 μ l eklenmiştir. 30 °C'de 15 dk kapağı hafifçe açık halde inkübe edilen plakalardaki fazla ConA aspire edilmiştir. Kuyucuklar 3 defa su ile yıkandıktan sonra plaka, karanlıkta hücreler hazır olana kadar bekletilmiştir.

3.6.3.2 Mitoz Bölünmenin Canlı Görüntülenmesi

Hücrelerin geçirdiği mitoz bölünme evrelerinin tamamının görüntülenebilmesi için tüm hücreler G1 evresinde tutuklanmış daha sonra senkronize olarak mitoz bölünme geçirmeleri teşvik edilmiştir. Bu amaçla *MATa* cinsiyetine sahip tomurcuklanan maya hücreleri ve bu hücrelerin G1 evresinde tutuklanmasını sağlayan bir feromon (α -Faktör) kullanılmıştır [86]. Bu test için kullanılan suşlar 10 ml metionin eksiltilmiş sıvı besiyerinde (-met) 16 saat boyunca oda sıcaklığında 250 rpm'de çalkalanarak büyütülmüştür. 16 saatin sonunda $OD_{600}= 0.2$ olacak şekilde aynı besiyerinde seyreltilen hücreler oda sıcaklığında 2 saat daha çalkalanarak büyümeye bırakılmıştır. Daha sonra hücreler tekrar $OD_{600}= 0.2$ olacak şekilde seyreltilmiş ve G1 evresinde tutuklanmalarının sağlanması için 10 μ l α -Faktör (5 mg/ml) eklenmiştir. 90 dakika sonra hücrelere tekrar 5 μ l α -Faktör (5 mg/ml) eklenerek oda sıcaklığında 90 dakika daha çalkalanarak büyümeye bırakılmıştır. Süre sonunda hücrelerin G1 evresinde oldukları ışık mikroskobu ile doğrulandıktan sonra vakumlu filtrasyon sistemi kullanılarak yıkanmıştır. Membrana yapışan hücreleri elde etmek için 10 ml sıvı besiyerine alınan membran elle çalkalanmıştır. Elde edilen hücrelerden 1.5 ml alınarak 3000 rpm'de 3 dk santrifüj gerçekleştirilmiştir. 1.2 ml süpernatant atılarak pellet kalan 300 μ l besiyeri ile

çözdürülmüştür ve daha önceden hazırlanan ibidi plakasının bir kuyucuğuna eklenerek 15 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Hücrelerin plakaya yapıştıktan sonra üstte kalan besiyeri aspire edilerek kuyucuklar 2 defa temiz besiyeri ile yıkanmıştır ve en son 500 µl besiyeri eklenerek plaka mikroskopta incelenmeye hazır hale getirilmiştir. Motorize Prior tablasına sahip Zeiss Axio Observer Z1 (Zeiss UK, Cambridge) floresan mikroskobu, Hamamatsu Flash 4 sCMOS kamerası ve Zen Pro yazılımı görüntüleme amacıyla kullanılmıştır. 2 saat boyunca 25 °C’de 15 dk aralıklarla fotoğraf çekilerek video kaydı yapılmıştır. Her kuyucuk için 4 ayrı pozisyondan görüntü alınmıştır. EGFP (% 4 transmitted light, 150 ms exposure), Tomato (% 10 transmitted light, 150 ms exposure) ve Brightfield kanalları kullanılmıştır (8 Z-stacks). Görüntüler Image J ile analiz edilmiştir.

3.6.3.3 Mayoz Bölünmenin Canlı Görüntülenmesi

Mayoz bölünmenin görüntülenmesi için *pCUP1-IME1/IME4* tutuklama/ serbest bırakma testi gerçekleştirilmiştir. Bu test kapsamında, besin kıtlığı ile teşvik edilen mayoz bölünmenin görüntülenmesi esnasında yüksek oranda senkronizasyonun sağlanabilmesi için gametogenezde kritik öneme sahip *IME1* ve *IME4* faktörleri bakırın detoksifikasyonundan sorumlu *CUP1* geninin promotoruna bağlanmıştır [87] . *pCUP1-IME1/IME4* özelliğine sahip diploid hücreler bölüm 3.3.6’da belirtilen yöntemle mayoz bölünme için büyütülmüştür ve 10 ml SPO sıvı besiyerine alındıktan sonra 30 °C’de ve 250 rpm’de 1.5 saat çalkalanarak hücrelerin erken mayozda tutuklanması sağlanmıştır. Süre sonunda hücrelerden 1.5 ml alınarak 3000 rpm’de 3 dk santrifüj gerçekleştirilmiştir. Pellet 300 µl besiyeri ile çözdürülerek daha önceden hazırlanmış Ibi di plakasının bir kuyucuğuna eklenmiştir ve 30 °C’de 20 dk inkübe edilmiştir. Hücrelerin geri kalanı 3000 rpm’de 3 dk santrifüj edilmiştir ve besiyeri kısmı temiz bir tüpe aktarılmıştır. Ayrılan bu SPO besiyerinden 250 µl alınarak içerisinde 50 µM CuSO₄ çözeltisi hazırlanmıştır. Hücreler hazır olduğunda fazla besiyeri Ibi di kuyucuklarından aspire edilmiştir ve kuyucuklar 2 defa SPO besiyeri ile yıkanmıştır. Her kuyucuğa 250 µl SPO besiyeri eklenmiştir ve mikroskop altında görüntüleme ayarları yapılır yapılmaz 50 µM CuSO₄ çözeltisinden (SPO içerisinde hazırlanmış) 250 µl alınarak hücrelerin üzerine son konsantrasyon 25 µM olacak şekilde eklenmiştir. Böylece diploid hücrelerin premayotik DNA replikasyonunu gerçekleştirmesi ve senkronize olarak mayoza girişi teşvik edilmiştir [87]. Zeiss Axio Observer Z1 (Zeiss UK, Cambridge) floresan mikroskobu, Motorize Prior tablası, Hamamatsu Flash 4 sCMOS kamerası ve Zen Pro yazılımı kullanılarak 12 saat boyunca 30 °C’de 15 dk aralıklarla

fotoğraf çekilerek görüntüleme yapılmıştır. EGFP (% 4 transmitted light, 150 ms exposure), Tomato (% 10 transmitted light, 150 ms exposure) ve Brightfield kanalları kullanılarak (8 Z-stacks) her kuyucuk için 10 ayrı pozisyondan görüntü alınmıştır. Görüntüler Image J yazılımı ile analiz edilmiştir.

3.7 İstatistik

Floresan krossover haberci testi için standart hata R-Studio programı ile Oregon Üniversitesi Moleküler Biyoloji Enstitüsü'nde görevli Prof. Franklin W. Stahl tarafından hazırlanmış online formüller kullanılarak hesaplanmıştır [88]. P değerleri Fisher's Exact Test uygulanarak hesaplanmıştır ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

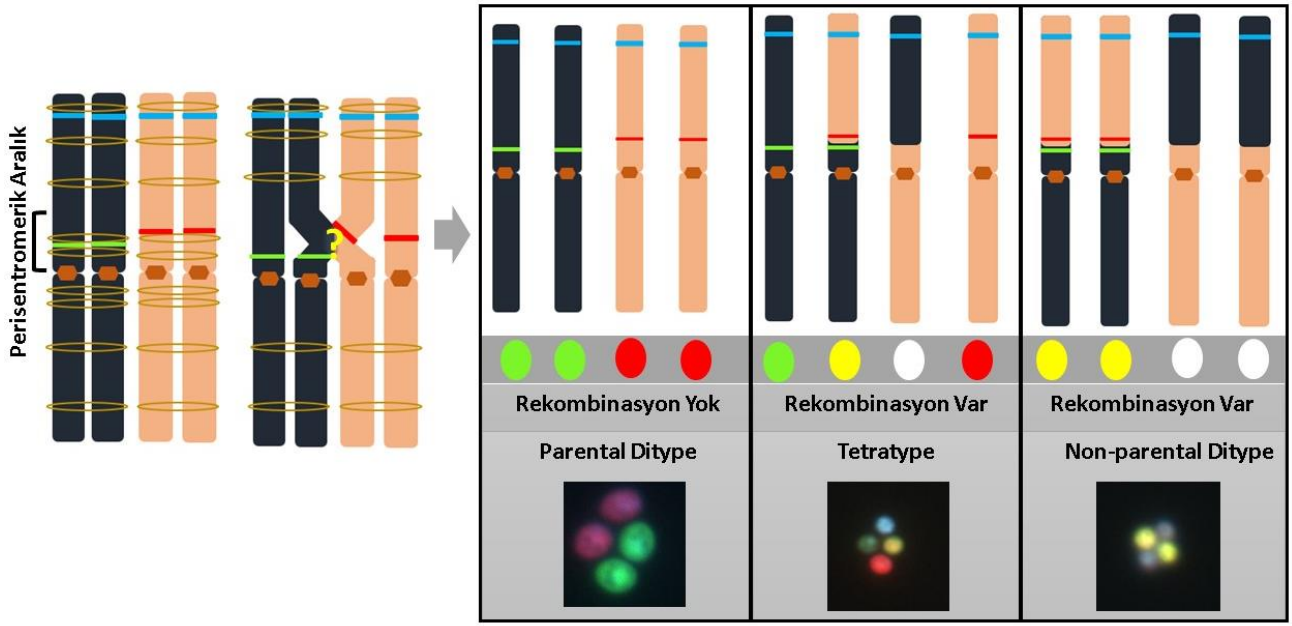
Diğer deney sonuçları için standart hata en az $n=3$ biyolojik tekrar için hesaplanmış olup, p değerleri Paired Student T Testi ile Microsoft Office Excel kullanılarak hesaplanmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

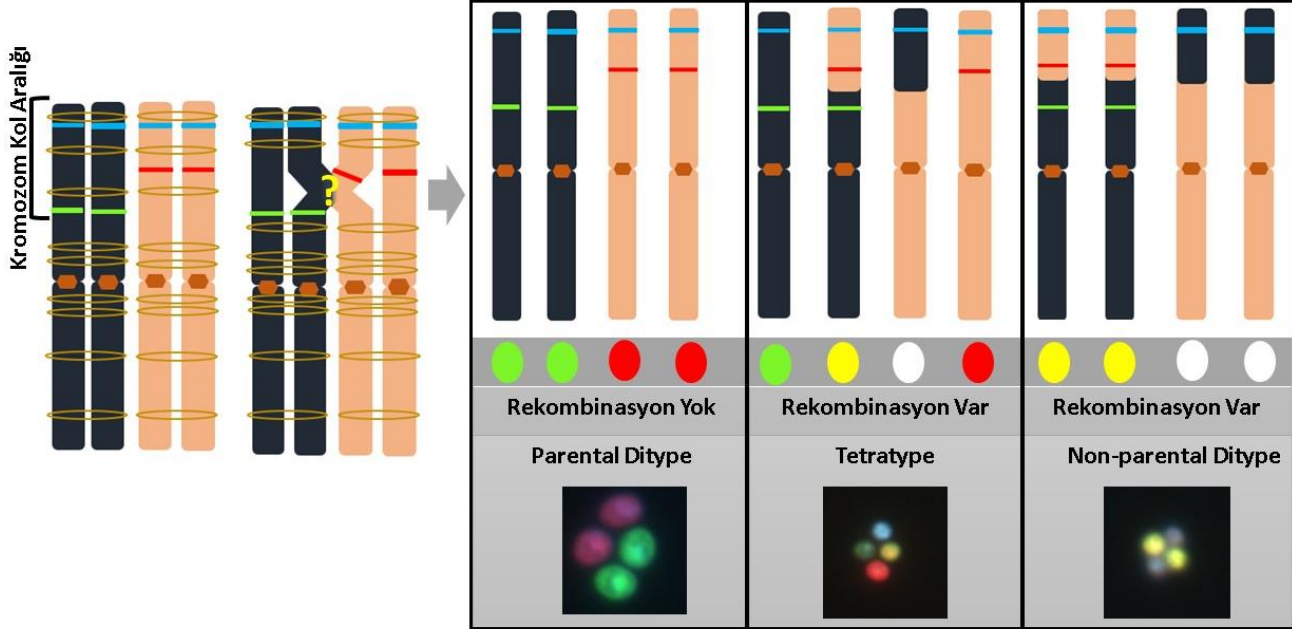
4.1 Şugoşin (Sgo1) ve Protein Fosfataz 2A (PP2A) Perisentromerik Krossoverları Engellemektedir

Bu çalışmada, şugoşinin ve yardımcı proteinlerin perisentromerik krossoverları engellemedeki rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır. Krossover frekanslarının perisentromer içinde ve kromozom kolu aralığında nasıl etkilendiğini anlamak için, floresan krossover haberci testi gerçekleştirilmiştir [66], [89]. Bu test ile perisentromerde veya kol bölgesinde aralarında yaklaşık 10 kb boyutunda bir mesafe olan kırmızı (RFP) veya yeşil floresan proteininin (GFP) oluşmasını sağlayan bir otonom spor promotörü aktarılmış ve aynı zamanda 4 tetrad oluştuğundan emin olmamızı sağlayan m-Cerulean (CFP) etiketleri olan homolog kromozomlar kullanılmıştır. 2 kırmızı ve 2 yeşil spor içeren tetrad PD (parental ditype, atasal iki tip); 1 kırmızı, 1 yeşil, 1 sarı ve 1 mavi (boş, sadece DAPI) spor içeren tetratlar TT (tetratype, tetratip); 2 sarı ve 2 mavi (boş, sadece DAPI) içeren tetratlar ise NPD (non-parental ditype, atasal olmayan iki tip) olarak kategorize edilmiştir (Şekil 4.1(a) ve (b)).

Yabanıl tür olan *SGO1* (perisentromerik aralık için suş numarası AMy13149, kol için AMy14087); *pCLB2-3HA-SGO1* (perisentromerik aralık için suş numarası AMy14637, kol için AMy14636) ve *sgo1-Y47A;Q50A;S52A* (perisentromerik aralık için suş numarası AMy15389, kol için AMy26925) suşları ile gerçekleştirilen floresan krossover haberci testinin sonuçlarına göre hesaplanan rekombinasyon frekansları (Morgans) Şekil 4.2’de verilmiştir. Sonuçlara göre, Sgo1 eksikliği olan hücreler (*pCLB2-3HA-SGO1*) ve PP2A’ya bağlanamayan suşlar (*sgo1-Y47A; Q50A; S52A*), yabanıl tip suşa göre perisentromerik aralıkta rekombinasyon frekansında sırasıyla yaklaşık 16.1 ve 11.6 kat artış göstermişlerdir ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 4.2 (a)). Bunun yanında, kol aralığında *pCLB2-3HA-SGO1* ve *sgo1-Y47A; Q50A; S52A* suşları istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermemiştir (Şekil 4.2 (b)). Bu sonuçlara göre, Sgo1 ve PP2A’nın perisentromerik krossoverları engellediği açıkça görülmektedir.



(a)



(b)

Şekil 4.1: Perisentromerik aralıkta (a) ve kromozom kol aralığında (b) gerçekleştirilen floresan krosover haberci testinin temsili anlatımı.

Sgo1 mutantlarının hatalı kromozom ayrılmasına sebep olabileceği göz önüne alındığında perisentromerde gerçekleşen krossover sayısındaki görünür artışın rekombinasyonla değil, yanlış segregasyonla ilgili olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle, ek olarak, bir topoizomera benzeri protein olan ve mayotik rekombinasyonun başlatılmasından sorumlu programlı çift zincir kırıklarının oluşturan Spo11 proteinini eksprese edemeyen *SGO1*, *spo11Δ* (perisentromerik aralık için suş numarası AMy27419, kol için AMy27409) ve *pCLB2-3HA-SGO1*, *spo11Δ* (perisentromerik aralık için suş numarası AMy27414, kol için AMy27426) suşları da analiz edilmiştir (Şekil 4.2) [49]. Bu analiz sonucunda *spo11Δ* tetradlarının hiçbirinde perisentromer ya da kromozom kol aralığında kırmızı ve yeşil floresan ışımaları aynı spor üzerinde gözlenmemiştir. Bu sonuçlar kullandığımız floresan krossover haberci testinin rekombinasyon frekansını doğru olarak yansıttığını kanıtlamıştır (Şekil 4.2).

Daha önceki bir çalışmada, sentromerin en yakınında olduğu bilinen Ctf19 kinetokor kompleksinin *S. cerevisiae*'da perisentromerik krossoverları engellediği bulunmuştur [66]. Araştırmacılar, Ctf19'un bunu kohezineri sentromerin yaklaşık 20-50 kb yakınına getirerek yaptığını ve sentromerin yaklaşık 6 kb yakınındaki çift zincir kırık oluşumunu kardeş kromatid tamir yolağını tercih etmesini sağlayarak (homolog krossoverlar ile tamir etmek yerine) baskıladığını göstermişlerdir [66]. Nambiar ve arkadaşları da *S. pombe* ile yaptıkları bir çalışmada, Spo11'in görevini gerçekleştirebilmesi için gerekli olan yardımcı faktör Rec10'un (*S. cerevisiae*'daki homoloğu Red1), Rec11 içeren kohezinerle eş zamanlı olarak lokalize olması gerektiğini ve bunun da perisentromerik aralıkta mümkün olmadığını (perisentromerik kohezinde Psc3 var) göstererek yalnızca perisentromerde bulunan kohezinerin sahip olduğu Psc3'ün, Spo11 tarafından gerçekleştirilen çift zincir kırıklarının oluşumunu ve dolayısıyla perisentromerik krossoverları engellediğini göstermişlerdir [90]. Kuhl ve Vader'e göre, *S. cerevisiae* ve *S. pombe*'deki perisentromerik krossover baskılama mekanizmalarındaki bu farklılıkların sebebi *S. cerevisiae*'nın tercih ettiği kardeş kromatid tamir yolağının *S. pombe*'ye ait çok tekrarlı perisentromer sekansında hasar oluşturabilmesi ihtimalidir ve *S. pombe* çift zincir kırık oluşumunu direk olarak durdurmayı tercih etmektedir [91]. Heterokromatin yapısında sentromeri olan *Arabidopsis thaliana* ile yapılan bir başka çalışmada ise sentromerik bölgedeki tekrarlayan sekansların transkripsiyonel olarak baskılanabilmesi için gerekli olan bir epigenetik modifikasyon olan DNA metilasyonunu gerçekleştiremeyen mutantlarda sentromerik bölgedeki krossover frekansında artış görülürken kromozom kolundaki krossoverların azaldığı görülmüştür [92]. Memeli hücrelere

ait sentromerlerin satelit (uydu) DNA'ları ile kaplı heterokromatin bölgelerinde yer aldığı bilinmektedir [93]. Cappelletti ve arkadaşları, satelit DNA'ların sentromerik krossoverların baskılanmasındaki rolünü araştırmak için sadece 11. kromozomunda tekrarlayan satelit DNA'ları bulunmayan at (*Equus caballus*) spermatozoidlerini kullanmışlardır [93]. Araştırmacılar at spermatozoidlerine ait kromozom 11'deki rekombinasyon bölgelerini haritaladıklarında, satelit DNA'ları olmadığı halde bu bölgede rekombinasyonun baskılandığını bulmuşlardır ve sentromerik krossoverların baskılanmasında satelit DNA'ların görevi olmadığı sonucuna ulaşmışlardır [93]. Erken mayozda gerçekleşen krossoverların homolog kromozomların bir arada durmasını sağladığı, krossover gerçekleştirilemeyen homologların ise sinaptonemal kompleksi proteinleri tarafından gerçekleştirilen sentromer eşleşmesi mekanizması ile anafaz I'de doğru ayrılmayı sağladıkları bilinmektedir [94], [95]. Previato de Almeida ve arkadaşlarının fare spermatozoidleri ve mayaları kullanarak yaptıkları bir çalışmada, şugoşinin sentromer eşleşmesini ayrılmalarını yavaşlatarak koruduğu ve krossover gerçekleştirilemeyen kromozomların doğru ayrılmasını sağladığı gösterilmiştir [95].

Bu çalışmada elde edilen tüm floresan krossover haberci testi sonuçlarına bakıldığında, Sgo1'in ve efektör proteini olan PP2A'nın perisentromerdeki krossover baskılamasında direk rollerinin olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda bu sonuçlar, Ctf19 kompleksinin kohezinleri perisentromere yönlendirerek krossoverları baskılamasını şugoşini yönlendirerek yaptığı hipotezimizi doğrulamaktadır.

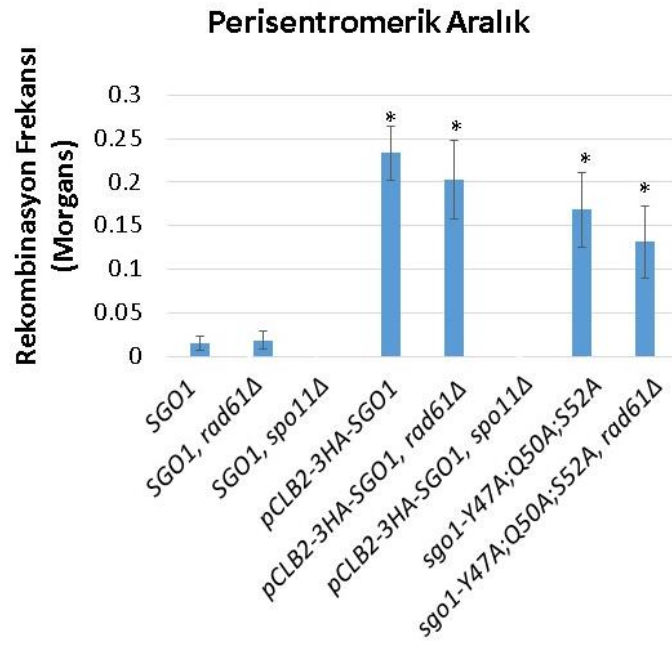
4.2 Sugoşin (Sgo1) Perisentromerik Krossoverları Bir Kohezin Ayırma Faktörü Olan Rad61/Wpl1'e Karşı Koyarak Gerçekleştirmez

Mayoz bölünme esnasında kohezinler kromozomlardan Rec8'in separazlar ile kesilmesi ile ayrılmaktadır. Ancak, son zamanlarda literatürde başka bir yolak olarak Rad61/Wpl1'in tomurcuklanan mayalarda kohezin destabilizasyonunda rolü olabileceği belirtilmektedir [96]–[98]. Bu sebeple, çalışmamızda perisentromerde Sgo1'in Rad61'ı engelleyebileceği ve bunun da Sgo1 eksikliği olan hücrelerdeki kohezin ayrılmasının sebebi olabileceği düşünülmüştür.

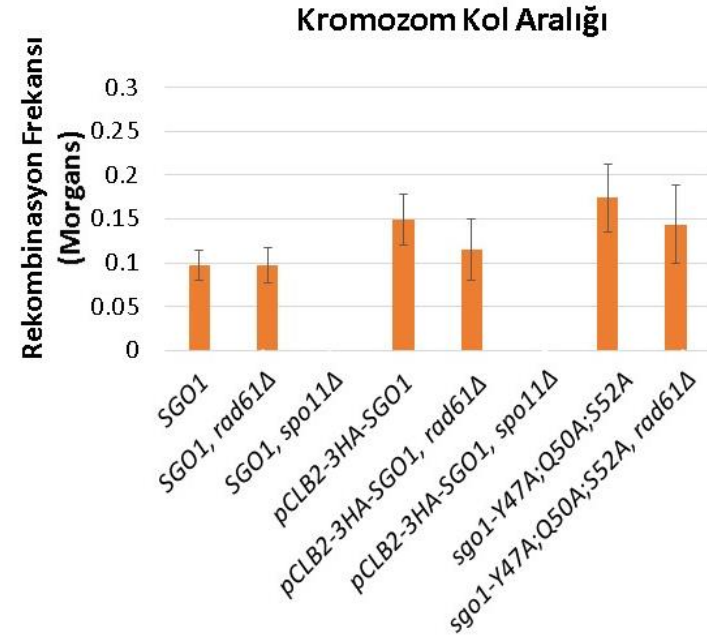
Şekil 4.2' de verilen yabancı tür olan *SGO1* (perisentromerik aralık için suş numarası AMy13149, kol için AMy14087); *SGO1, rad61Δ* (perisentromerik aralık için suş numarası AMy28085, kol için AMy28084); *pCLB2-3HA-SGO1* (perisentromerik aralık için suş numarası AMy14637, kol için AMy14636); *pCLB2-3HA-SGO1, rad61Δ* (perisentromerik

aralık için suş numarası AMy27993, kol için AMy28083); *sgo1-Y47A;Q50A;S52A* (perisentromerik aralık için suş numarası AMy15389, kol için AMy26925) ve *sgo1-Y47A;Q50A;S52A, rad61Δ* (perisentromerik aralık için suş numarası AMy28298, kol için AMy28163) suşlarına ait floresan krossover haberci test sonuçlarına göre, yalnızca Sgo1 eksikliği olan (*pCLB2-3HA-SGO1*) hücelere oranla Sgo1 ve Rad61 proteinlerinin ikisinin de olmadığı hücrelerde (*pCLB2-3HA-SGO1, rad61Δ*) istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmemiştir (Şekil 4.2). Sgo1'in PP2A (Rts1) ile etkileşimi olmayan *sgo1-Y47A;Q50A;S52A* suşları ve *sgo1-Y47A;Q50A;S52A, rad61Δ* suşları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu sonuçlar, Sgo1'in perisentromerik krossoverları bir kohezin ayırma faktörü olan Rad61/Wpl1'a karşı koyarak gerçekleştirmediğini göstermektedir.

Literatürde Rad61'in perisentromerik krossoverların engellemesi hakkında bir bulgu yoktur. Ancak Challa ve arkadaşları, Rad61'in tomurcuklanan maya hücrelerinde çift zincir kırıklarının zamanında tamir edilmesinden ve Holliday bağlantısı ara ürünlerinin işlevsel hale getirilmesinden sorumlu olduğunu göstermişlerdir [98]. Ayrıca, Rad61'i susturulmuş hücrelerde homolog kromozomların eşleşmesinin hasar gördüğü ve erken profazda kardeş kromatid kohezyonunun bozulduğu sonucuna ulaşılmıştır [98]. Normal bir mayoz bölünmede kardeş kromatidler arası rekombinasyon tercih edilmemektedir. Ancak, krossover oluşturarak veya oluşturmayarak (non-krossover) düzeltilmemiş çift zincir kırıkları da ölümcüldür. Bu sebeple, eklenme/ silinme gibi kromozomal düzenlenmeler kardeş kromatidlerin çift zincir kırık tamiri için kalıp olarak kullanılmasına yol açabilmektedir [99]. Hong ve arkadaşları Rad61/Wpl1'in (Rec8 ve Pds5 ile beraber), mayoz esnasında krossover oluşturulmayacak durumlarda (non-krossoverlar) çift zincir kırık tamirinde homolog kromozomların tercih edilmesi için gerekli olduğunu belirtmişlerdir ve hücrelerin Rad61 yokluğunda çift zincir kırık tamiri için kardeş kromatidler arası non-krossover yolunu tercih ettiklerini göstermişlerdir [100].



(a)



(b)

Şekil 4.2: Floresan krossover haberci test sonuçları ($p < 0.05$, * olarak gösterilmiştir).

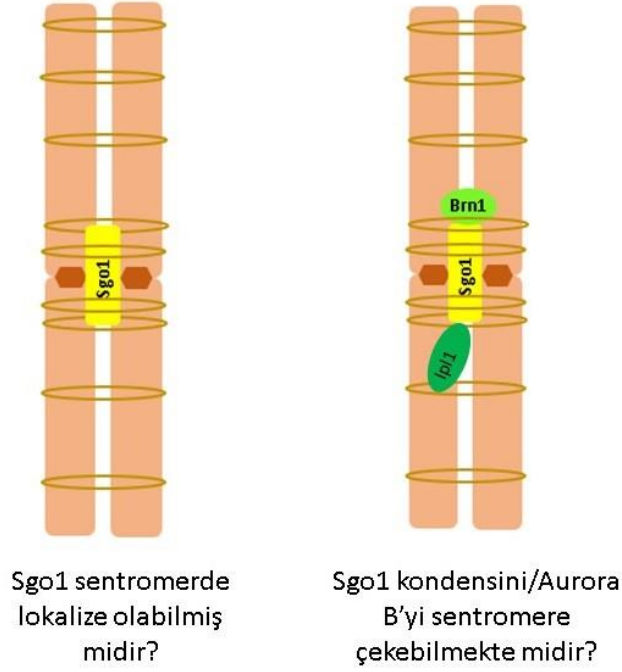
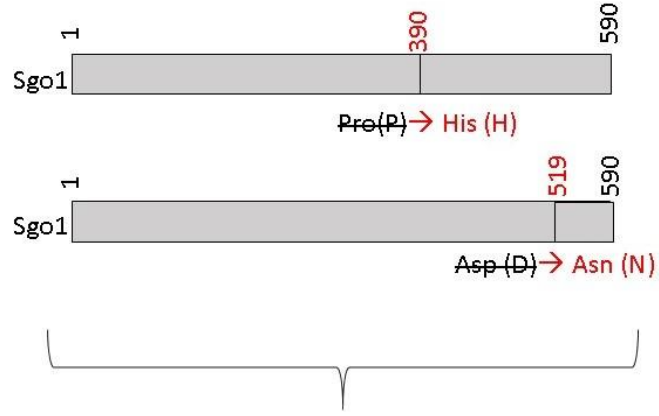
4.3 P390H ve D519N Mutasyonları Şugoşinin (Sgo1) Perisentromerik

Lokalizasyonuna Zarar Vermektedir

Bu araştırmada daha sonra Sgo1'in diğer efektör proteinlerinin de perisentromerik krossoverları engellemedeki görevleri araştırılmıştır. Daha önceki çalışmalarda *sgo1-700* isimli iki farklı nokta mutasyona sahip - Pro³⁹⁰ → His (P390H) ve Asp⁵¹⁹ → Asn (D519N) - alelin Sgo1'in kondensine (Brn1) ve Aurora B'ye (Ipl1) bağlanmasında hasara yol açtığı ve sentromere sağlam olarak bağlanamadığı gösterilmiştir [26], [101]. Bu çalışmada ise iki mutasyon ayrılarak hangi rezidünün Brn1 ya da Ipl1 ile ilişkiyi bozduğunun araştırılması amaçlanmıştır (Şekil 4.3).

Floresan krossover haberci testi sonuçlarında da görüldüğü gibi Sgo1, perisentromerik aralıkta gerçekteşen silici rekombinasyonların önlenmesi için gereklidir. Bu sebeple çalışılan mutasyonların ilk önce Sgo1'in sentromerik lokalizasyonuna olan etkisi test edilmiştir. Hedeflenen proteinin kromozomun belirli bölgeleri ile olan ilişkisinin belirlenmesi için ChIP- qPCR testi gerçekteşirilmiştir [102].

Yabani tür Sgo1-6HA (AMy906), etiketsiz Sgo1 (AMy1176), Sgo1-D519N-6HA (AMy26603) ve Sgo1-P390H-6HA (AMy26979) suşları kullanılarak gerçekteşirilen ChIP- qPCR sonuçları Şekil 4.4 (a)'da verilmiştir. Sentromer (*CEN4*), kol aralığı (ARMIV) ve perisentromer (PERIIV) aralığındaki 6HA- IP/ Input zenginlikleri karşılaştırıldığında, 6HA etiketi içeren Sgo1'i olan hücrelerin (yabani tür) etiketsiz olanlara göre sentromerde ve perisentromerde sırasıyla yaklaşık 3.54 (p<0.05) ve 3.30 kat fazla IP/ Input zenginliğine sahip olduğu görülmüştür, kol aralığında tüm örneklerin IP/ Input zenginliklerinin sıfıra yakın olduğu görülmüştür (Şekil 4.4 (a)). Bir mikrotübül depolimerize edici ilaç olan nocodazolun, Sgo1'in metafaz esnasında sentromerde lokalize kalmasına sebep olduğu bilinmektedir [103]. Dolayısıyla, Sgo1- 6HA içeren yabani türe ait IP/ Input değerlerlerinin kol aralığında etiketsiz hücrelerle aynı ve sıfıra yakın olması beklenen bir durumdur. Ayrıca, Sgo1- 6HA içeren yabani türe ait IP/ Input değerlerlerinin sentromer ve perisentromerde etiketsiz hücrelere oranla daha yüksek görülmesi, 6HA etiketi için kullanılan antikorun doğru çalıştığını ve ChIP- qPCR sonuçlarının güvenilir olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.3: P390H ve D519N mutasyonlarına sahip Sgo1 proteinlerinin sentromerik lokalizasyonlarındaki değişiklikler için gerçekleştirilen araştırmanın temsili anlatımı.

Sentromerdeki ChIP- qPCR sonuçları karşılaştırıldığında yabancı türe oranla D519N mutasyonunun 3.21 kat ($p<0.05$), P390H mutasyonunun da 4.52 kat ($p<0.05$) daha düşük IP/ Input zenginliğine sebep olduğu görülmüştür. Perisentromerik aralıkta ise D519N mutasyonu 1.56 kat, P390H mutasyonu da 2.92 kat daha düşük IP/ Input zenginliğine sebep olmuştur (Şekil 4.4 (a)). ChIP sonuçlarına göre iki nokta mutasyonu da Sgo1'in sentromerdeki lokalizasyonuna hasar vermiştir. Daha önceki sonuçlarımıza göre Sgo1, perisentromerik aralıkta gerçekleşen silici rekombinasyonların önlenmesi için gereklidir. Sgo1'in sentromere getirerek krossover baskılamasında yardımını aldığını düşündüğümüz efektör proteinlerinin (Brn1 ve/veya Ipl1) belirlenebilmesi için kullandığımız nokta mutasyonlarının Sgo1'in sentromerik lokalizasyonunu kaybetmesine neden olması sebebiyle Brn1 ve Ipl1 için ayrıca ChIP testi uygulanmasına gerek kalmamıştır.

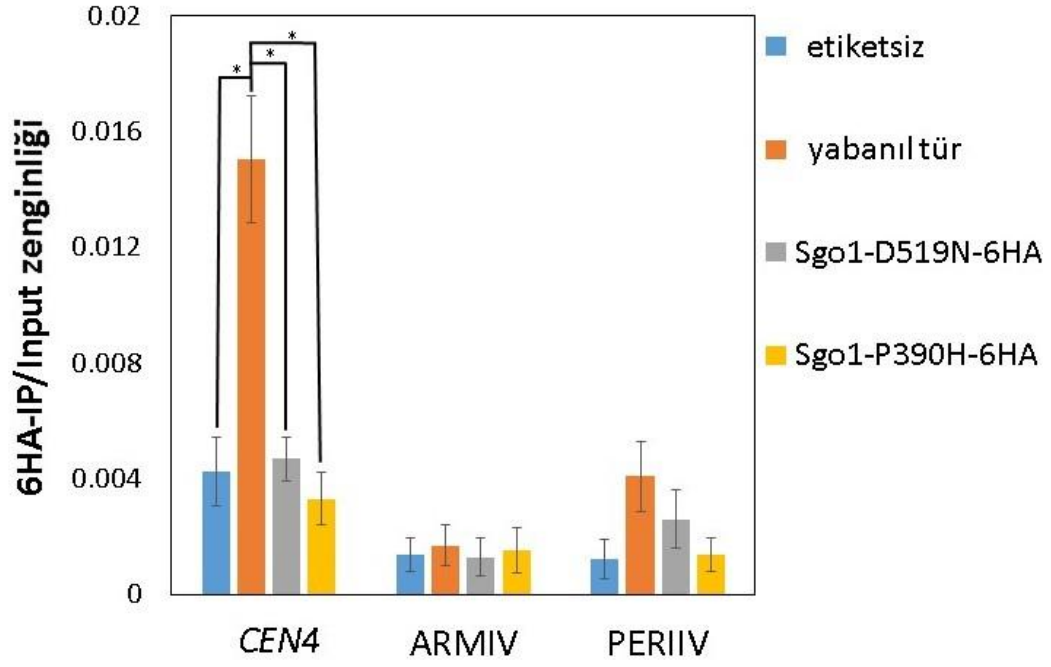
Daha önce yapılan bir araştırmada *sgo1-100* (Sgo1-T379I), *sgo1-700* (Sgo1-P390H-D519N) ve *sgo1-3A* (*sgo1-Y47A;Q50A;S52A*) mutasyonlarının Sgo1 lokalizasyonuna olan etkisi araştırılmıştır ve *sgo1-3A* mutasyonunun Sgo1'in sentromerdeki lokalizasyonuna zarar vermediği, *sgo1-100* ve *sgo1-700* mutasyonlarının ise Sgo1 lokalizasyonunda hasara sebep olduğu bulunmuştur [26]. Ayrıca, araştırmacılar *sgo1-100* ve *sgo1-3A*'nın kondensinin sentromere çekilmesinde bir sorun oluşturmadığını, ancak *sgo1-700*'ün kondensinin sentromere getirilmesine zarar verdiğini, Ipl1 lokalizasyonun ise her üç mutasyonda da kaybolduğunu bildirmişlerdir [26]. Tang ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise *Drosophila*'ya ait MEI-S332 proteini (şugoşin) üzerinde oluşturulmuş Asn⁶¹→Ile (N61I) mutasyonunun PP2A ve şugoşin arasındaki ilişkiye zarar verdiği ortaya konmuştur [73]. Araştırmacılar, şugoşinin N terminal ucunda bulunan sarılmış sarmal (coiled coil) bölgesinin sentromerik lokalizasyon için büyük önem taşıdığını ve bu bölgede yer alan N61I mutasyonunun şugoşinin sentromerik lokalizasyonunu da kaybetmesine sebep olduğunu bildirmişlerdir [73]. Ishiguro ve arkadaşları da *Saccharomyces cerevisiae* ve *Schizosaccharomyces pombe* ile yaptıkları bir çalışmada, histon 2A üzerindeki 119. lizin amino asitinin (K119) post transkripsiyonel bir modifikasyon türü olan malonilasyon (lizin pozitif yükünü negatif hale getiren asidik asilasyon) ile değişmesi sonucunda histon 2A üzerindeki 121. serin amino asitinin (S121) Bub1 tarafından fosforilasyonunun önlendiğini ve bunun sonucu olarak da şugoşinin lokalizasyonunu kaybettiğini göstermişlerdir [104].

ChIP testi esnasında tüm hücrelerin metafazda tutuklandıklarından emin olmak için etanol fiksasyonu ile DAPI boyaması gerçekleştirilmiştir. 200 hücre içerisinde metafazda tutuklanmış hücrelerin yüzdesi, bu evreye özgü dambıl şekli olanların sayılması ile belirlenmiştir (Şekil 4.4 (b)) [105]. Etiketsiz türün ortalama % 98.5'i, yabancı türün % 98.6'sı, D519N mutasyonu içeren türün % 98.2'i ve P390H mutasyonu içeren türün % 97.9'u metafazda tutuklanmıştır. Bu sonuçlara göre, ChIP testinde kullanılan tüm örneklerin metafazda başarılı bir biçimde tutuklandığı açıkça görülmektedir (Şekil 4.4 (b)).

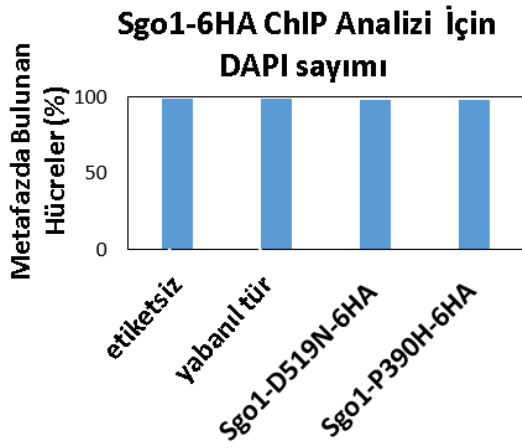
Kullanılan antikor reaktiflerinin DNA- protein etkileşimlerine ulaşabilmesinin sağlanması ve protein bağlanma bölgelerinin doğru olarak tespit edilmesi için, ChIP testi esnasında kromatinin fragmanlara ayrılması gerekmektedir [106]. Bu amaçla, sonikasyon ile kromatin 300- 500 bp'lik fragmanlara ayrılmıştır [107]. Sonikasyon sonrası pürifike edilmiş fragmanların 500 bp çizgisi aşağısında oldukları % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile doğrulanmıştır (sonikasyon verimi) ve ChIP testine devam edilmiştir (Şekil 4.4 (c)).

İmmünopresipitasyon ile bağlanma bölgesi araştırılan proteinlerin hücrelerde eksprese olabildiğini doğrulamak amacıyla, ChIP testinin fiksasyon basamağından önce ayrılan hücrelerden izole edilmiş proteinler ile 12CA5 antikorunu kullanılarak western blot gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.4 (c)). Bu sonuçlara göre etiketsiz Sgo1 eksprese eden hücrelerde bant görülmezken, Sgo1- 6HA, Sgo1-D519N- 6HA ve Sgo1-P390H- 6HA eksprese eden hücrelerde 100 kDA çizgisi civarında bantlar görülmüştür (Şekil 4.4 (c)) [103]. Yükleme esnasında oluşabilecek hataların kontrolü için ise tomurcuklanan mayalar için esansiyel bir protein olan Kar2 antikorunu kullanılmıştır (Şekil 4.4 (c)) [108]. Etiketsiz örnek (6HA etiketi içermeyen) de dahil olmak üzere tüm örnekler için, beklenildiği gibi [109], 80 kDA çizgisi civarında Kar2 bandı görülmüştür. Bu sonuçlara göre ChIP ile immünopresipite edilmek istenen Sgo1-6HA proteinlerin hücrelerdeki varlığı doğrulanmıştır (Şekil 4.4 (c)).

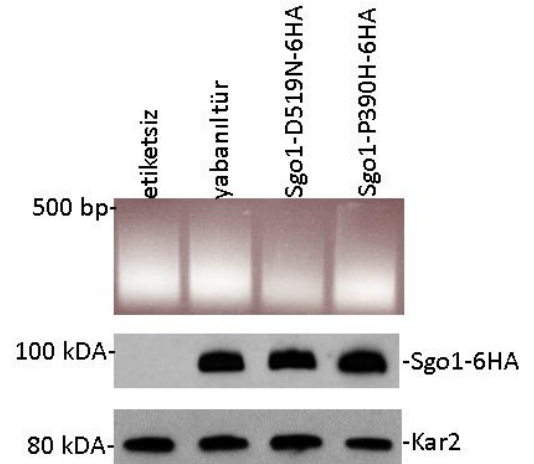
Metafazda Gerçekleştirilen Sgo1-6HA ChIP



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.4: ChIP testi qPCR sonuçları ($p < 0.05$, * olarak gösterilmiştir) (a), DAPI sayım sonuçları (b), sonikasyon verimi ve western blot görüntüleri (c).

ChIP testine ek olarak, hücreler G1 safhasında alfa faktör ile tutulduktan sonra hücre döngüsüne senkronize olarak gönderilmiştir ve mitoz bölünme döngüsünün tamamı floresan mikroskobu ile canlı olarak görüntülenmiştir (Şekil 4.5) ve bu görüntülerin sayısal analizleri Şekil 4.6'da verilmiştir. Bu test için yabanıl tür Sgo1 ve nokta mutasyonlarına sahip hücrelerin Sgo1'i GFP ile etiketlenirken, kinetokor (Mtw1) tdTomato (kırmızı floresan) ile etiketlenmiştir (AMy8066, AMy27799 ve AMy27843). Böylece efektör proteinlerinin sentromerik lokalizasyonu hali hazırda sentromerde bulunduğu bilinen kinetokora bakarak belirlenmiştir [110].

Şekil 4.6 (a)'da Sgo1-GFP sinyallerinin Image J programı ile hesaplanan şiddetleri (ışınma şiddeti/ arka plan) verilmiştir. Metafazda gözlenen Sgo1-GFP ışınmalarının ortalama şiddetleri karşılaştırıldığında, Sgo1-D519N-GFP şiddetinin Sgo1-GFP ışınmasına oranla 1.047 kat daha düşük olduğu ($p < 0.05$), Sgo1-P390H-GFP'nin ise 1.179 kat daha düşük olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Bu sonuçlara göre, D519N ve P390H mutasyonlarının ikisi de yabanıl tür Sgo1-GFP'nin metafazdaki ışınma şiddetinden daha düşük seviyededir. Literatürde birçok çalışmada floresan etiketli proteinlerin ışınma şiddetleri, proteinlerin sentromerik lokalizasyonları hakkında bilgi vermesi amacıyla kullanılmıştır. Örneğin Peplowska ve arkadaşları, Sgo1 üzerinde oluşturdukları Asn⁵¹→Ile (Sgo1-N51I) mutasyonunun Sgo1- Rts1 ilişkisi üzerindeki etkilerini araştırmak için floresan mikroskobu ile elde ettikleri görüntülerdeki GFP sinyallerinin şiddetlerini yabanıl türe ait veriler ile karşılaştırmışlardır [74]. Araştırmacılar, Sgo1-N51I-GFP sinyal şiddetinin Sgo1-GFP ışınması ile aynı düzeyde olduğunu, Sgo1-N51I mutasyonuna sahip hücrelerdeki Rts1-GFP şiddetinin ise yabanıl tür hücrelerdeki Rts1-GFP şiddetine kıyasla önemli derecede azaldığını göstermişlerdir [74]. Bir başka çalışmada ise yabanıl tür Sgo1-GFP'nin metafazda nükleusa yayılmadan önce en yüksek şiddette ışınma verdiğini (~ 600 a.u.), daha sonra kardeş kinetokor bioryantasyonunun gerçekleşmesi ile beraber yavaşça şiddetinin azaldığını (~ 100 -200 a.u.) göstermişlerdir [103].

Yabanıl tür hücrelerin görüntüleri incelendiğinde, Sgo1-GFP sinyalinin 15. dakika sonunda ortaya çıktığı 45. dakikada ise kinetokorların birbirinden ayrılmaya başlamasıyla birlikte ortadan kaybolduğu görülmüştür (Şekil 4.5 (a)). Nokta mutasyonuna sahip hücrelerde ise ışınma sürelerinde farklılıklar tespit edilmiştir (Şekil 4.5 (b,c)). Yaklaşık 60 dakika süren mitoz bölünme esnasında gözlenen Sgo1-GFP ışınmalarının toplam görülme süreleri karşılaştırıldığında yabanıl tür hücrelerin % 100'ünün 30 dk boyunca Sgo1-GFP ışınması

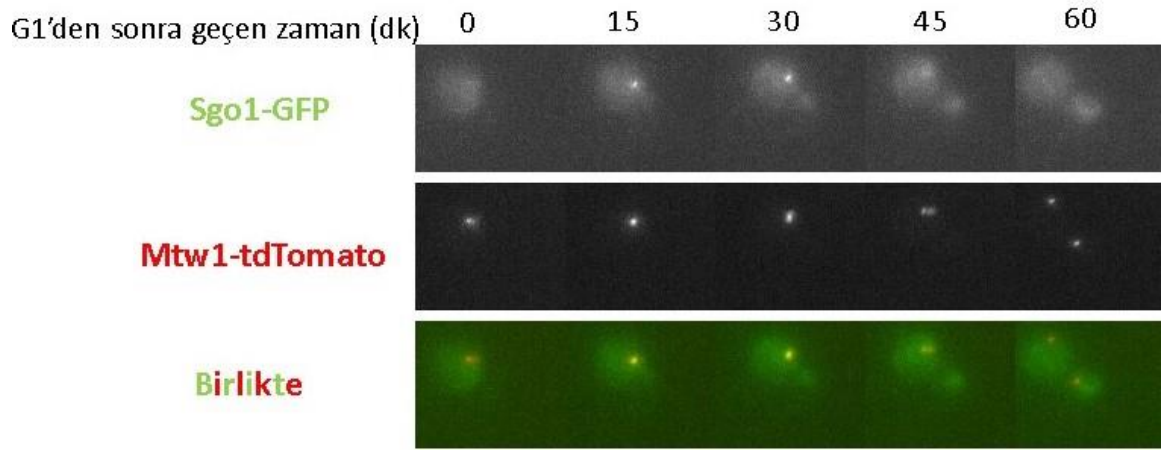
verdiği gözlenmiştir (Şekil 4.6 (b)). D519N mutasyonuna sahip suşlarda hücrelerin % 40'ının 30 dk boyunca ve % 60'ının 45 dk boyunca ışığa verdiği gözlenmiştir (Şekil 4.6 (b)). P390H mutasyonuna sahip suşların ise % 40'ında sinyalin hiçbir zaman görülmediği (0 dk), % 55'inde sadece 15 dk ve % 5'inde 45 dk görüldüğü sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.6 (b)).

Yabancı tür tomurcuklanan mayalarda anafazın belirleyici özelliği iki kinetokor arası mesafenin 2 µm'den büyük olmasıdır [111], [112]. Bu sebeple, hücrelerin kinetokor ayrılma mekanizmasında sebep olabileceği gecikme ya da hızlanmaların tespiti için kinetokorların birbirinden ayrılmaya başladığı an ile iki kinetokor arası mesafenin >2 µm olduğu an arasında geçen süreler karşılaştırılmıştır (Şekil 4.6 (c)). Yabancı hücrelerin tamamında kinetokor ayrılma süresi 15 dk iken, D519N mutasyonuna sahip hücrelerin % 80'inde 15 dk, % 15'inde 30 dk ve % 5'inde 45 dk'dır (Şekil 4.6 (c)). P390H mutasyonuna sahip hücrelerin ise % 60'ında kinetokor ayrılma süresi 15 dk, % 25'inde 30 dk ve % 15'inde 45 dk'dır (Şekil 4.6 (c)).

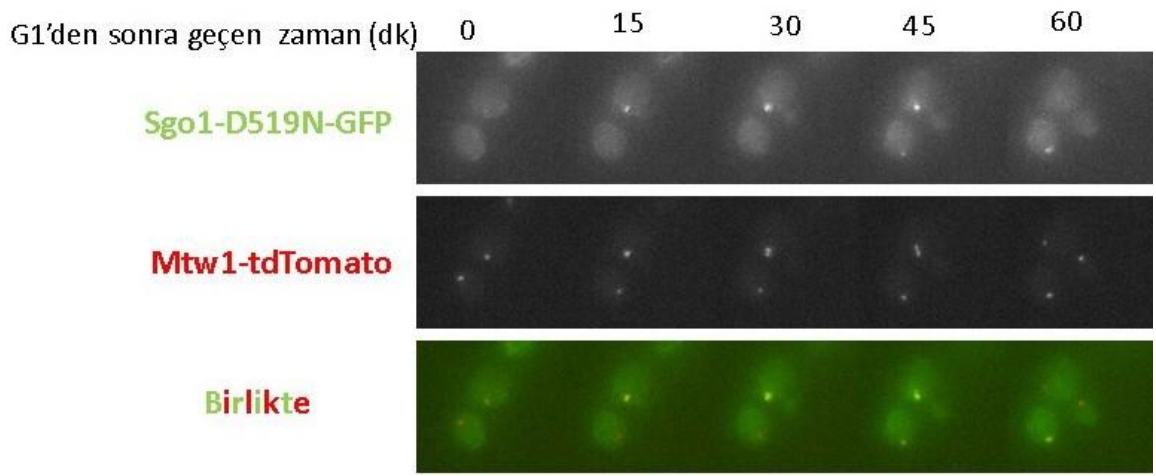
Tüm görüntüleme analizi sonuçlarına göre, Sgo1-D519N-GFP suşlarında ya floresan ışığa şiddetinde azalma olduğu (Şekil 4.6 (a)) ya da ışığa süresinin yabancı türlere göre daha uzun sürdüğü gözlenmiştir (Şekil 4.6 (b)). Ayrıca, Sgo1-D519N-GFP suşlarında kinetokor ayrılma süresinde artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6 (c)). Asp⁵¹⁹ bölgesinin son zamanlarda yapılan çalışmalarda gösterilen yeni fosforilasyon bölgelerine (S518 ve T523) yakın olması sebebiyle bu bölgede oluşan mutasyonun Sgo1'in gerginliği algılama kapasitesinde hasara sebep olabileceği [97] ve bu hasarın da hücrelerde normal olmayan hücre döngüsüne sebep olabileceği düşünülmektedir. Mitoz bölünmenin süresi, APC/C kompleksinin aktivatörü olan Cdc20'ye bağlanarak aktive olması ile belirlenmektedir ve eğer kinetokorlar mikrotübüllere doğru bir biçimde bağlanamamışlarsa APC/C inhibe edilerek mitozdan çıkış engellenir [113]. Kanser hücreleri gibi yüksek kromozom dengesizliklerine sahip hücrelerde de APC/C aktivitesinin azaltılarak mitozun süresinin uzatılması, tümör gelişimi için bir strateji olarak kullanılmaktadır [114]. Sgo1-D519N-GFP ışığa süresinin yabancı türlere göre daha uzun sürmesinin başka bir sebebi de D519N mutasyonuna sahip Sgo1'in sentromer yerine perisentromerik bölgede takılı kalmış olma ihtimalidir. Sgo1-P390H-GFP hücrelerinin tüm görüntüleme analizi sonuçları bir arada incelendiğinde ise, hücrelerin çoğunda Sgo1'in sentromere gelemediği ya da kısa sürede sentromerden koptuğu sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.6 (a) ve (b)). Bu sonuçlar, Pro³⁹⁰ rezidüsünün Sgo1'in C-terminal

ucundaki bölgede olması ve bu bölgenin Sgo1'in sentromere getirilmesi için şart olan H2A-S121 fosforilasyon bölgesinde bulunması sebebiyle tutarlıdır [87]. Ayrıca, P390H mutasyonuna sahip hücrelerde kinetokor ayrılma sürelerinde de tutarsızlıklar görülmüştür (Şekil 4.6 (c)). Bu çalışmada elde edilen görüntüleme sonuçları ile ChIP sonuçları beraber değerlendirildiğinde, P390H ve D519N mutasyonlarının Sgo1'in perisentromerik lokalizasyonuna zarar verdiği açıkça görülmektedir.

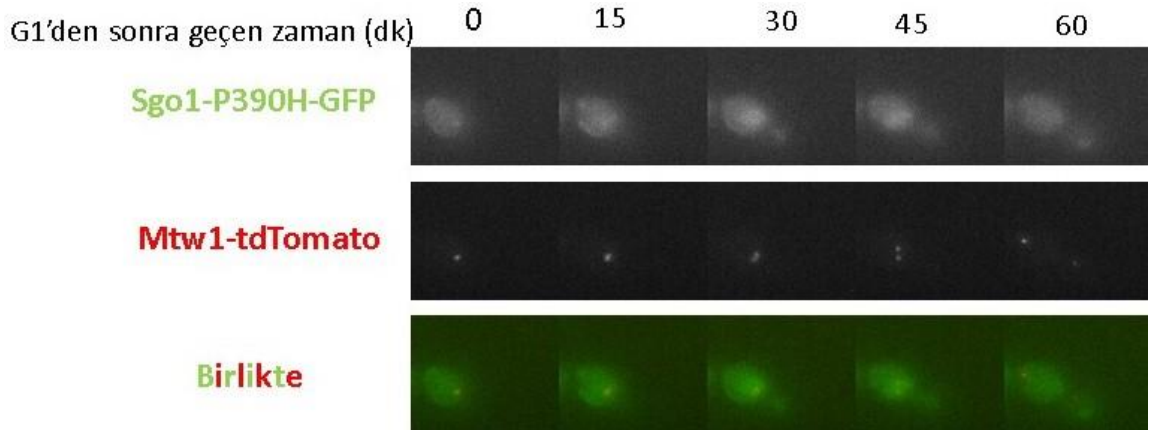
Mitoz bölünmede, kohezinin bir dirence sebep olduğu ve bu direncin gerilme sağlayarak kardeş kromatidlerin mikrotübüllere bağlanarak zıt kutuplara çekilmesini sağladığı bilinmektedir [97]. Tüm kromozomlar mikrotübüllere doğru olarak bağlandığında ise separaz aktif hale gelmektedir ve kohezinleri keserek kardeş kromatidlerin zıt kutuplara ayrılmasını sağlamaktadır [97]. Kardeş kromatidlerin bioryantasyonunun anafazdan önce sağlanması için Sgo1, kinetokor sisteminde hatalı mikrotübül bağlanmasını kontrol etme ve düzeltme gibi rollere sahiptir [49]. Bu sebeple, mikrotübül depolimerizasyonunu sağlayan benomil gibi ilaçlar Sgo1'i susturulmuş (*sgo1Δ*) hücrelerinin ölümüne yol açmaktadır çünkü bu hücreler gerilimi algılama yeteneklerini kaybetmişlerdir. Bu çalışmada, Sgo1'de bulunan D519N ve P390H mutasyonlarının benomil hassasiyetinin test edilmesi için *SGO1-6HA* (AMy906), *SGO1-GFP* (AMy9126), *sgo1-D519N-6HA* (AMy26603), *sgo1-D519N-GFP* (AMy27632), *sgo1-P390H-6HA* (AMy26979), *sgo1-P390H-GFP* (AMy27633) ve *sgo1Δ* (AMy827) suşları 8, 10 ve 12 µg/ml benomil içeren besiyerlerine eklenmiştir (Şekil 4.7). Sonuçlara göre, P390H mutasyonunun tıpkı *sgo1Δ*'de olduğu gibi yüksek miktarda benomil hassasiyetine sahip olduğu görülmüştür. Bunun yanında, D519N mutasyonunun benomile karşı önemli derecede bir hassasiyeti görülmemiştir. Aksine, D519N mutasyonunun çok az bir farkla da olsa yabancı türe oranla daha fazla dirence sebep olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar D519N mutasyonunun normalde Sgo1'in APC/C kompleksine bağlanarak yıkımının gerçekleştiği Sgo1 yıkım kutusuna yakın bir bölgede olması sebebiyle görülmüş olabilir [115]. Bu sonuç ayrıca canlı hücre görüntüleme sonuçlarında görülen normalden uzun süren Sgo1-D519N-GFP sinyal süresini de açıklamaktadır (Şekil 4.6 (b)).



(a)

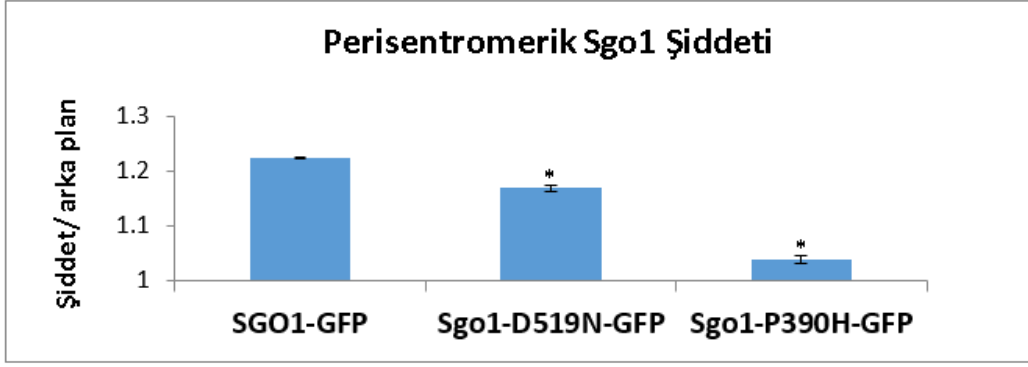


(b)

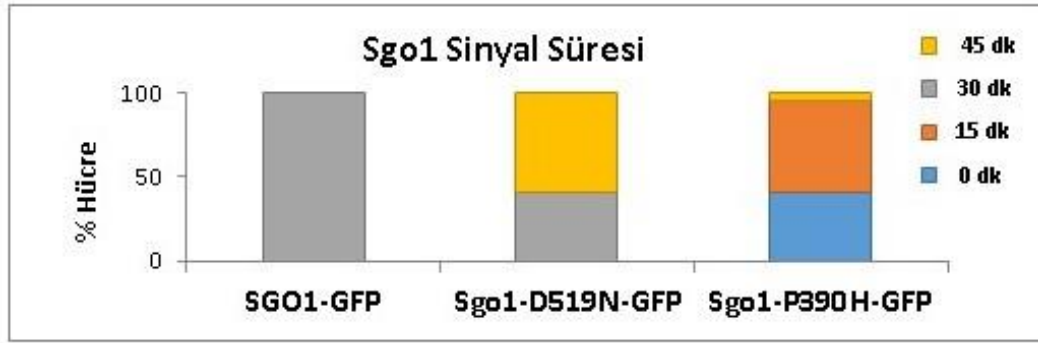


(c)

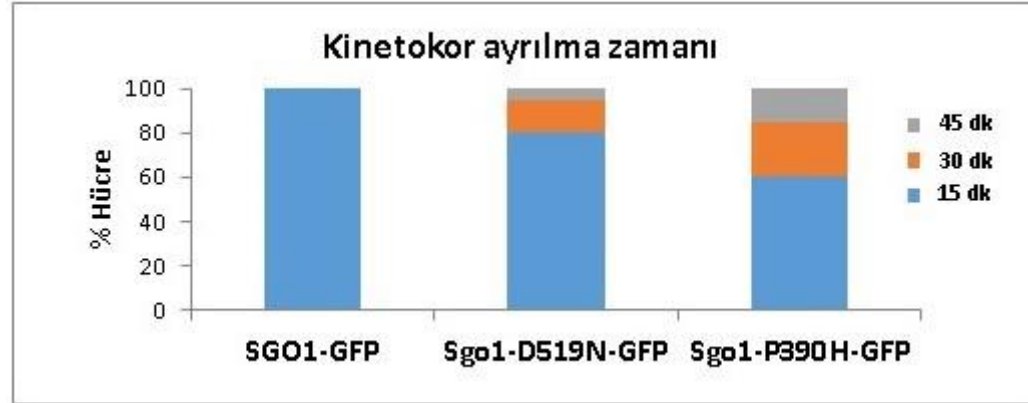
Şekil 4.5: G1 safhasında tutuklandıktan sonra hücre döngüsüne senkronize olarak gönderilen hücrelerin floresan mikroskobu ile elde edilen görüntüleri.



(a)

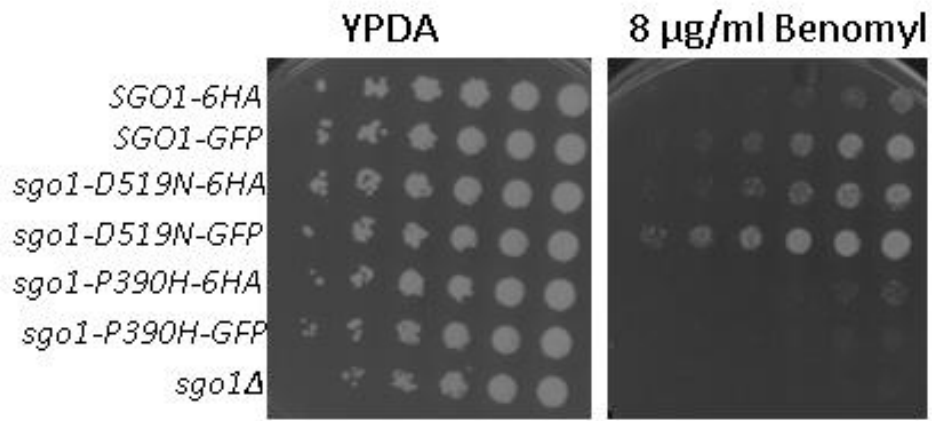


(b)

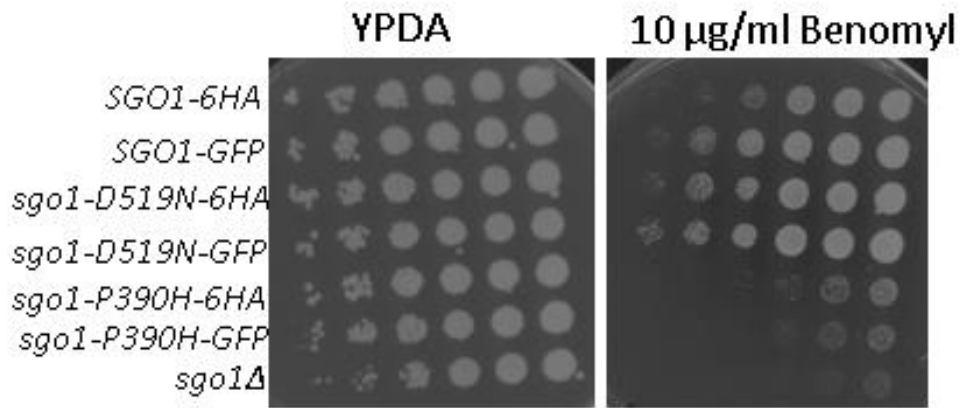


(c)

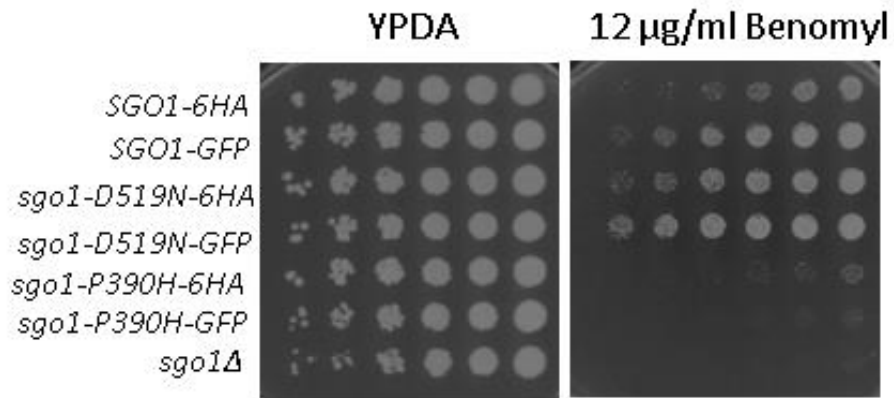
Şekil 4.6: Hücrelerin floresan mikroskobu ile elde edilen görüntülerindeki ortalama perisentromerik ışınma şiddeti ($p < 0.05$, * olarak gösterilmiştir) (a), sinyal süresi (b) ve kinetokor ayrılma zamanı karşılaştırmaları (c).



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.7: Benomil hassasiyeti test sonuçları.

4.4 Şugoşin (Sgo1) ve Protein Fosfataz 2A (PP2A) Erken Mayoz-I'de Eksprese

Olmaktadır

Mayoz I sırasında homolog kromozomların doğru olarak ayrılması, G2/ profaz (erken mayoz I) sırasında kurulan, programlanmış DNA kırıklarının oluşumunun ve krossover onarımının nihai sonucu olan homologlar arası bağlantılara (kiyazma) bağlıdır [66]. Eğer Sgo1 ve efektör proteinleri erken mayoz I'de gerçekleşen perisentromerik krossoverların önlenmesi için gerekli ise, bu proteinlerin perisentromerle bu süre boyunca etkileşimde olması gerekmektedir. Bu hipotezi test etmek için diploid *S. cerevisiae* hücreleri sporulasyon besiyerine konmuştur ve 2 saat sonra 25 µM CuSO₄ ile *IME1* ve *IME4* ekspresyonları tetiklenerek mayotik S fazından başlamak üzere mayoz I ve mayoz II canlı olarak floresan mikroskopu ile 12 saat boyunca görüntülenmiştir (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9) [87], [97], [116].

MTW1-tdTomato içeren ve *pCUP1-IME1/IME4* genetik altyapısına sahip hücrelerdeki Sgo1-GFP (AMy28420) ve Rts1-GFP (AMy28423) sinyalleri 12 saat boyunca izlenmiştir ve elde edilen görüntüler Şekil 4.9 (a) ve (b)'de verilmiştir. Şekil 4.9 (c) ve (d)'de ise kinetokor dağılımından sonra geçen ortalama zaman ve kinetokor ayrılmasına kadar gözlenen ortalama GFP sinyal süresi verilmiştir.

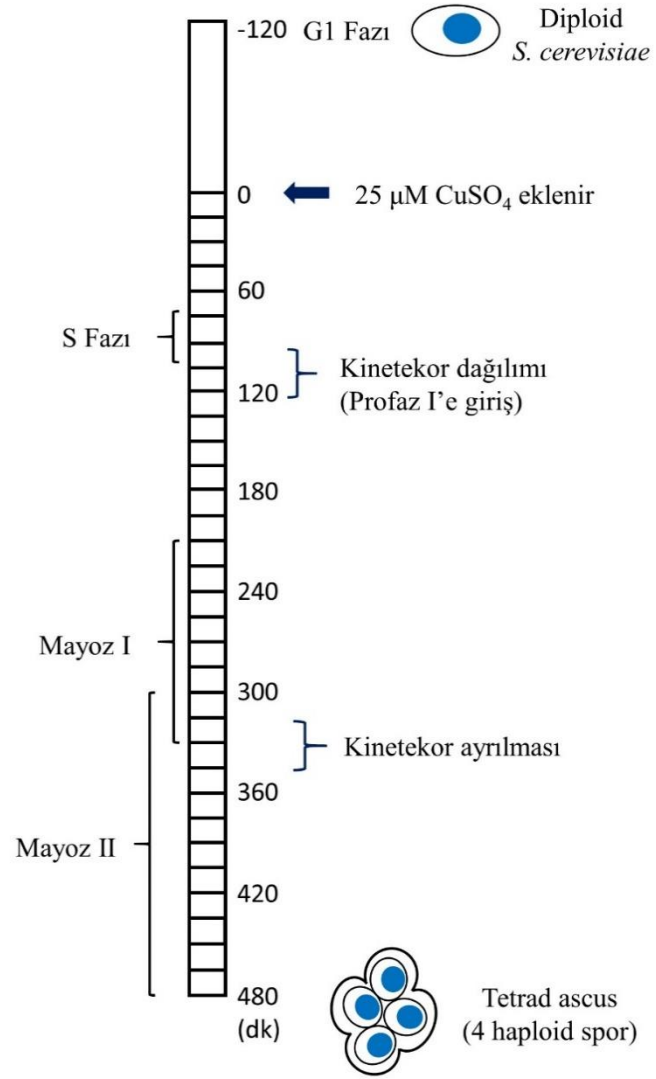
Kinetokor dağılımından sonra geçen ortalama zamanlar incelendiğinde, Sgo1 ve Rts1'in sırasıyla ortalama 43 ve 73 dakika sonra ortaya çıktığı görülmektedir (Şekil 4.9 (c)). Literatüre bakıldığında, gerçek zamanlamaları tam olarak bilinmiyor olsa da kinetokor komplekslerinin premayotik S fazı/ profaz I ve mayoza giriş arasında dağıldığı bilinmektedir [117]–[119]. Meyer ve arkadaşları, sentromer ve kinetokor dağılımının hücreler mayoza simultane olarak girerken başladığını bildirmişlerdir [119].

Kardeş kinetokorların aynı kutuba (monooryantasyon) yönelmesi, homolog kromozomlara bağlı kinetokorların ise zıt kutuplara ayrılması (bioryantasyonu) ile mayoz I'in sonlandığı ve mayoz II'ye geçişin sağlandığı bilinmektedir [60], [87]. *pCUP1-IME1/IME4* tutuklama/serbest bırakma testi ile elde ettiğimiz görüntüleme sonuçlarına göre Sgo1 ve Rts1, mayoz I'in sonunu temsil eden kinetokor ayrılmasından sırasıyla ortalama 238 ve 136 dakika önce ilk kez ışığa vermeye başlamıştır (Şekil 4.9 (d)).

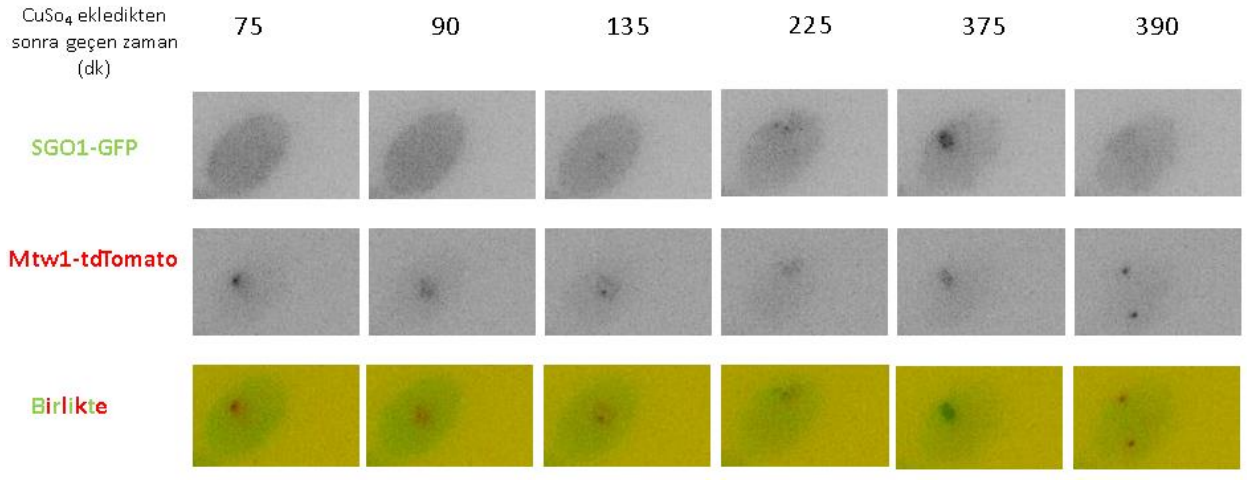
Hücre döngüsü araştırmaları için kullanılan floresan mikroskopunun az da olsa sebep olabileceği fototoksisitenin, uzun süreli görüntülemeler esnasında hücre büyümesini

etkileyebileceği bilinmektedir [120]. Bu sebeple, hücre bölünmesi evrelerinin dakika bazında kesin olarak belirlenmesi çok zordur. Ancak, literatürde daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında erken mayoz bölünmenin gerçekleştiği zaman dilimi hakkında yaklaşık olarak fikir sahibi olmak mümkündür. Örneğin Padmore ve arkadaşları, *S. cerevisiae*'da DNA replikasyonunun bitişinin ve S fazının başlangıcının anafaz I'den yaklaşık 4.3 saat (258 dk) önce gerçekleştiğini belirtmişlerdir [121]. Araştırmacılara göre pakiten fazı, anafaz I'den yaklaşık 2 saat önce gerçekleşmektedir (120 dk) [121]. Börner ve Cha ise, tomurcuklanan maya için S fazının mayoz I'in sonundan yaklaşık 5 saat öncesinde (300 dk) gerçekleştiğini bildirmişlerdir [116]. Tomurcuklanan mayanın aksine sinaptonemal kompleks oluşturmayan *S. pombe* ile yapılan bir çalışmada, at kuyruğu fazı olarak adlandırılan mayotik profazın 142 dk sürdüğü, metafazın ise 37 dk sürdüğü belirtilmiştir [122]. *S. pombe* ile gerçekleştirilen bir diğer çalışmada da profazın mayoz I'in son aşamasından yaklaşık 175 dk öncesinde gerçekleştiği görülmüştür [123].

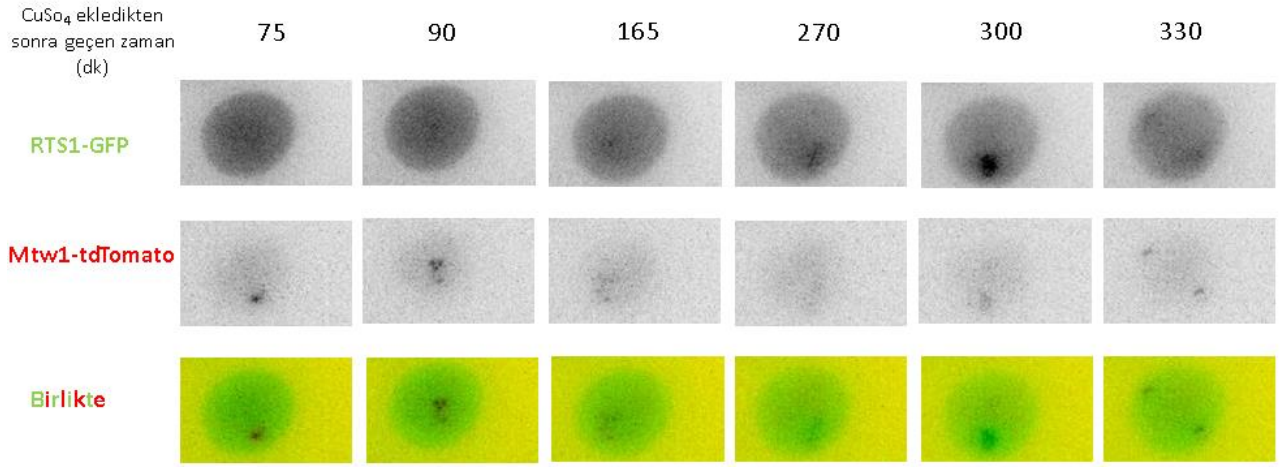
Hücre döngüsünün S fazında kohezin halkalarının kardeş kromatidleri sıkıca sardığı ve kohezyonunun sağlandığı bilinmektedir [25]. Tomurcuklanan maya ile yapılan bir çalışmada da kohezinlerin Sgo1'in perisentromere getirilmesini sağladığı ortaya konmuştur [26]. Sgo1 ve PP2A-Rts1 ilişkisinin mayoz bölünme esnasındaki sentromerik kohezyonun sağlanmasında önemli bir görevinin olduğu ve PP2A-Rts1'in pakiten fazında sentromere yerleşebilmesi için de Sgo1'e ihtiyaç duyduğu bilinmektedir [59]. Bu çalışmada da, Sgo1 ve PP2A-Rts1 proteinlerinin erken mayoz I'deki (S fazının sonu) varlıkları ortaya konmuştur.



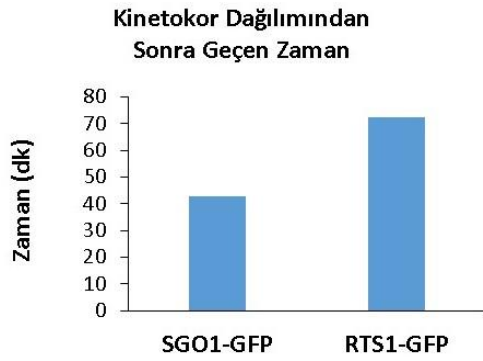
Şekil 4.8: *pCUP1-IME1/IME4* tutuklama/serbest bırakma testinin temsili zaman çizelgesi.



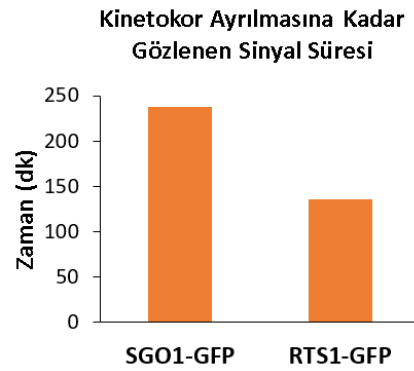
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 4.9: *pCUP1-IME1/IME4* tutuklama/serbest bırakma testi ile elde edilen floresan mikroskobu görüntüleri (a,b), kinetokor dağılımından sonra geçen zaman (c) ve kinetokor ayrılmasına kadar gözlenen GFP sinyal süresi (d).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada bir perisentromerik adaptör proteini olan Sgo1'in kardeş kromatid kohezyonunda bozulma, mayoz II'de ayrılmama ve dolayısıyla artan anöplöidi gibi sonuçlar doğuran silici perisentromerik krossoverları önleme mekanizması araştırılmıştır. Bu amaçla 3 farklı efektör proteininden bir veya daha fazlasının bu mekanizmada görevli olabileceği hipotezi kurulmuştur.

Araştırmamızda Sgo1'in PP2A, kondensin ve/veya Aurora-B'yi perisentromere getirmesini engellerken kendisinin perisentromerdeki lokalizasyonuna zarar vermeyecek bir mutasyon kullanmamız gerekmiştir. Çünkü, Sgo1 proteini görevlerini gerçekleştirebilmek için perisentromere lokalize olmalıdır [103], efektör proteinleri de Sgo1'e yardımcı olabilmek için perisentromere getirilmelidir. Ancak, amino asit sekansındaki bazı mutasyonlar bu süreci etkileyebilmektedir, çünkü mutasyonlar protein etkileşim yüzeylerini modifiye ederek protein-protein etkileşimlerinde kazanım veya kayıplara sebep olabilmektedir, bu da kromozom ayrılma mekanizmasında görevli proteinlerin etkileşimlerinin zarar görmesine ve hatalı kromozom ayrılmasına sebep olabilmektedir [124]. Daha önceki çalışmalara bakıldığında *sgo1-Y47A;Q50A;S52A* mutasyonunun PP2A'nın sentromere çekilmesini engellediği ancak Sgo1'in sentromerik lokalizasyonuna zarar vermediği bilinmektedir [26], [59]. Bu nedenle çalışmamızda bu mutasyona sahip suşlar (*sgo1-Y47A;Q50A;S52A*) kullanılarak PP2A'nın perisentromerde gerçekleşen krossoverların engellenmesindeki rolü ortaya konmuştur. Ancak, kondensin ve Aurora-B'nin perisentromere getirilmesini engellerken Sgo1'in perisentromerdeki lokalizasyonuna zarar vermeyen mutasyon henüz bilinmemektedir. Bu amaçla bu çalışmamızda iki farklı nokta mutasyonuna sahip suşlar - Pro³⁹⁰ → His (P390H) ve Asp⁵¹⁹ → Asn (D519N) - oluşturulmuştur ve mutasyonlardan bir tanesinin kondensin ve/veya Aurora-B'nin sentromere çekilmesini engellediği ancak Sgo1'in sentromerik lokalizasyonuna zarar vermediği hipotezi kurulmuştur. Ancak çalışmada elde ettiğimiz ChIP sonuçlarına göre iki nokta mutasyonu da Sgo1'in sentromerdeki lokalizasyonuna hasar vermiştir. Bu sebeple bu proteinlerin perisentromerik krossoverların engellenmesindeki rolleri aydınlatılamamıştır.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, Sgo1'in perisentromerik krossoverları efektör proteini olan PP2A'yı perisentromere yönlendirerek engellediği bulunmuştur. Erken mayoz I'de olduğu bilinen perisentromerik krossoverların engellenmesi görevini gerçekleştirdiği belirlenen

Sgo1 ve PP2A-Rts1 proteinlerinin, erken mayoz I'deki varlıkları da belirlenmiştir. Ayrıca, Sgo1'in Rad61 proteininin etkisinden uzakta iken krossover frekansına olan etkisi de araştırılmıştır. Rad61'in mayotik profaz I'de kohezinin destabilizasyonu etkisi olmasına rağmen, Rad61 silinmesinin yabancı tür Sgo1 veya Sgo1 eksikliği olan hücrelerdeki rekombinasyon frekansında değişikliğe sebep olmadığı görülmüştür. Bu da Sgo1'in perisentromerik krossoverları engelleme görevinin Rad61'den bağımsız olduğunu göstermiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] A. L. Marston, “Shugoshins: Tension-sensitive pericentromeric adaptors safeguarding chromosome segregation,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 35, no. 4, pp. 634–648, Feb. 2015.
- [2] B. Orr, K. M. Godek, and D. Compton, “Aneuploidy,” *Curr. Biol.*, vol. 25, no. 13, pp. R538–R542, Jun. 2015.
- [3] T. Hassold and P. Hunt, “To err (meiotically) is human: The genesis of human aneuploidy,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 2, no. 4, pp. 280–291, Apr. 2001.
- [4] E. S. Wenzel and A. T. K. Singh, “Cell-cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer,” *In Vivo (Brooklyn)*, vol. 32, no. 1, pp. 1–5, Jan. 2018.
- [5] D. O. Morgan, *The Cell Cycle*. London: New Science Press, 2007.
- [6] H. G. Dohlman and J. Thorner, “Regulation of G protein–initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 70, no. 1, pp. 703–754, Jun. 2001.
- [7] L. Bardwell, “A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway,” *Peptides*, vol. 26, no. 2, pp. 339–350, Feb. 2005.
- [8] P. A. Pope and P. M. Pryciak, “Functional overlap among distinct G1/S inhibitory pathways allows robust G1 arrest by yeast mating pheromones,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 24, no. 23, pp. 3675–3688, Dec. 2013.
- [9] J. Jimenez, S. Bru, M. Ribeiro, and J. Clotet, “Live fast, die soon: cell cycle progression and lifespan in yeast cells,” *Microb. Cell*, vol. 2, no. 3, pp. 62–67, Mar. 2015.
- [10] Y. W. Tzeng, J. N. Huang, S. C. Schuyler, C. H. Wu, and Y. L. Juang, “Functions of the mitotic B-type cyclins CLB1, CLB2, and CLB3 at mitotic exit antagonized by the CDC14 phosphatase,” *Fungal Genet. Biol.*, vol. 48, no. 10, pp. 966–978, Oct. 2011.
- [11] J. T. Arnone, A. D. Walters, and O. Cohen-Fix, “The dynamic nature of the nuclear envelope,” *Nucleus*, vol. 4, no. 4, pp. 261–266, 2013.
- [12] G. Karp, *Cell Biology*, 6th ed. Singapore: Wiley, 2010.
- [13] E. Duro and A. L. Marston, “From equator to pole: Splitting chromosomes in mitosis and meiosis,” *Genes Dev.*, vol. 29, no. 2, pp. 109–122, 2015.
- [14] J. Fernius, O. O. Nerusheva, S. Galander, F. de L. Alves, J. Rappsilber, and A. L. Marston, “Cohesin-dependent association of Scc2/4 with the centromere initiates pericentromeric cohesion establishment,” *Curr. Biol.*, vol. 23, no. 7, pp. 599–606,

- 2013.
- [15] F. Uhlmann and K. Nasmyth, “Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication,” *Curr. Biol.*, vol. 8, no. 20, pp. 1095–1102, 1998.
 - [16] V. Yong-Gonzalez, B. D. Wang, P. Butylin, I. Ouspenski, and A. Strunnikov, “Condensin function at centromere chromatin facilitates proper kinetochore tension and ensures correct mitotic segregation of sister chromatids,” *Genes to Cells*, vol. 12, no. 9, pp. 1075–1090, Sep. 2007.
 - [17] T. M. Ng, W. G. Waples, B. D. Lavoie, and S. Biggins, “Pericentromeric sister chromatid cohesion promotes kinetochore biorientation,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 20, pp. 3818–3827, 2009.
 - [18] S. A. Ribeiro *et al.*, “Condensin regulates the stiffness of vertebrate centromeres,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 20, no. 9, pp. 2371–2380, May 2009.
 - [19] A. D. Stephens, J. Haase, L. Vicci, R. M. Taylor, and K. Bloom, “Cohesin, condensin, and the intramolecular centromere loop together generate the mitotic chromatin spring,” *J. Cell Biol.*, vol. 193, no. 7, pp. 1167–1180, Jun. 2011.
 - [20] A. D. Stephens *et al.*, “Pericentric chromatin loops function as a nonlinear spring in mitotic force balance,” *J. Cell Biol.*, vol. 200, no. 6, pp. 757–772, Mar. 2013.
 - [21] J. H. I. Haarhuis, A. M. O. Elbatsh, and B. D. Rowland, “Cohesin and its regulation: On the logic of X-shaped chromosomes,” *Developmental Cell*. 2014.
 - [22] K. Challa, G. Fajish V, M. Shinohara, F. Klein, S. M. Gasser, and A. Shinohara, “Meiosis-specific prophase-like pathway controls cleavage-independent release of cohesin by Wapl phosphorylation,” *PLOS Genet.*, vol. 15, no. 1, p. e1007851, Jan. 2019.
 - [23] T. Nishiyama, M. M. Sykora, P. J. Huis, K. Mechtler, and J. M. Peters, “Aurora B and Cdk1 mediate Wapl activation and release of acetylated cohesin from chromosomes by phosphorylating Sororin,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 33, pp. 13404–13409, Aug. 2013.
 - [24] K. Jaqaman *et al.*, “Kinetochore alignment within the metaphase plate is regulated by centromere stiffness and microtubule depolymerases,” *J. Cell Biol.*, vol. 188, no. 5, pp. 665–679, Mar. 2010.
 - [25] A. L. Marston, “Chromosome segregation in budding yeast: Sister chromatid cohesion and related mechanisms,” *Genetics*, vol. 196, no. 1, pp. 31–63, 2014.
 - [26] K. F. Verzijlbergen *et al.*, “Shugoshin biases chromosomes for biorientation through condensin recruitment to the pericentromere,” *Elife*, vol. 3, p. e01374, Feb. 2014.

- [27] P. G. Melloy, “The anaphase-promoting complex: A key mitotic regulator associated with somatic mutations occurring in cancer,” *Genes Chromosomes and Cancer*, vol. 59, no. 3. Blackwell Publishing Inc., pp. 189–202, 13-Mar-2020.
- [28] C. Acquaviva and J. Pines, “The anaphase-promoting complex/cyclosome: APC/C,” *J. Cell Sci.*, vol. 119, no. 12, pp. 2401–2404, Jun. 2006.
- [29] M. Shirayama, A. Tóth, M. Gálová, and K. Nasmyth, “APC(Cdc20) promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5,” *Nature*, vol. 402, no. 6758, pp. 203–207, Nov. 1999.
- [30] F. M. Yeong, H. H. Lim, C. G. Padmashree, and U. Surana, “Exit from mitosis in budding yeast: Biphasic inactivation of the Cdc28-Clb2 mitotic kinase and the role of Cdc20,” *Mol. Cell*, vol. 5, no. 3, pp. 501–511, Mar. 2000.
- [31] R. Visintin, K. Craig, E. S. Hwang, S. Prinz, M. Tyers, and A. Amon, “The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation,” *Mol. Cell*, vol. 2, no. 6, pp. 709–718, Dec. 1998.
- [32] W. Zachariae, M. Schwab, K. Nasmyth, and W. Seufert, “Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex,” *Science (80-.)*, vol. 282, no. 5394, pp. 1721–1724, Nov. 1998.
- [33] B. Baro, J.-A. Rodriguez-Rodriguez, I. Calabria, M. L. Hernáez, C. Gil, and E. Queralt, “Dual regulation of the mitotic exit network (MEN) by PP2A-Cdc55 phosphatase,” *PLoS Genet.*, vol. 9, no. 12, p. e1003966, Dec. 2013.
- [34] J. M. Rock and A. Amon, “The FEAR network,” *Curr. Biol.*, vol. 19, no. 23, 2009.
- [35] A. K. Caydasi, B. Ibrahim, and G. Pereira, “Monitoring spindle orientation: Spindle position checkpoint in charge,” *Cell Div.*, vol. 5, pp. 1–15, 2010.
- [36] P. Clute and J. Pines, “Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 1, no. 2, pp. 82–87, Jun. 1999.
- [37] C. Wurzenberger and D. W. Gerlich, “Phosphatases: Providing safe passage through mitotic exit,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 12, no. 8. pp. 469–482, 2011.
- [38] A. Hochwagen, “Meiosis,” *Curr. Biol.*, vol. 18, no. 15, pp. 641–645, 2008.
- [39] R. Plowman *et al.*, “The molecular basis of monopolin recruitment to the kinetochore,” *Chromosoma*, vol. 128, no. 3, pp. 331–354, 2019.
- [40] F. J. Van Werven and A. Amon, “Regulation of entry into gametogenesis,” *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 366, no. 1584, pp. 3521–3531, Dec. 2011.
- [41] L. Dirick, L. Goetsch, G. Ammerer, and B. Byers, “Regulation of meiotic S phase by

- Ime2 and a Clb5,6-associated kinase in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Science*, vol. 281, no. 5384, pp. 1854–1857, 1998.
- [42] M. J. Clancy, M. E. Shambaugh, C. S. Timpte, and J. A. Bokar, “Induction of sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* leads to the formation of N6-methyladenosine in mRNA: A potential mechanism for the activity of the IME4 gene,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 30, no. 20, pp. 4509–4518, 2002.
- [43] D. Dominissini *et al.*, “Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq,” *Nature*, vol. 485, no. 7397, pp. 201–206, 2012.
- [44] V. Borde, A. S. H. Goldman, and M. Lichten, “Direct coupling between meiotic DNA replication and recombination initiation,” *Science*, vol. 290, no. 5492, pp. 806–809, 2000.
- [45] K. N. Smith, A. Penkner, K. Ohta, F. Klein, and A. Nicolas, “B-type cyclins CLB5 and CLB6 control the initiation of recombination and synaptonemal complex formation in yeast meiosis,” *Curr. Biol.*, vol. 11, no. 2, pp. 88–97, Jan. 2001.
- [46] A. L. Marston and A. Amon, “Meiosis: Cell-cycle controls shuffle and deal,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 5, no. 12, pp. 983–997, 2004.
- [47] A. Bergerat, B. De Massy, D. Gadelle, P. C. Varoutas, A. Nicolas, and P. Forterre, “An atypical topoisomerase II from archaea with implications for meiotic recombination,” *Nature*, vol. 386, no. 6623, pp. 414–417, Mar. 1997.
- [48] M. D. Cervantes, J. A. Farah, and G. R. Smith, “Meiotic DNA breaks associated with recombination in *S. pombe*,” *Mol. Cell*, vol. 5, no. 5, pp. 883–8, May 2000.
- [49] S. Hong, J. H. Joo, H. Yun, and K. Kim, “The nature of meiotic chromosome dynamics and recombination in budding yeast,” *J. Microbiol.*, vol. 57, no. 4, pp. 221–231, 2019.
- [50] N. E. Lamb *et al.*, “Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II,” *Nat. Genet.*, vol. 14, no. 4, pp. 400–405, Dec. 1996.
- [51] A. Lynn, T. Ashley, and T. Hassold, “Variation in human meiotic recombination,” *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, vol. 5, no. 1, pp. 317–349, Sep. 2004.
- [52] M. Nambiar and G. R. Smith, “Repression of harmful meiotic recombination in centromeric regions,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 54, pp. 188–197, 2016.
- [53] K. M. May *et al.*, “The parental origin of the extra X chromosome in 47,XXX females,” *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 46, no. 4, pp. 754–61, Apr. 1990.
- [54] N. S. Thomas, “Maternal sex chromosome non-disjunction: evidence for X

- chromosome-specific risk factors,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 10, no. 3, pp. 243–250, 2001.
- [55] D. D. Sears, J. H. Hegemann, J. H. Shero, and P. Hieter, “Cis-acting determinants affecting centromere function, sister-chromatid cohesion and reciprocal recombination during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Genetics*, vol. 139, no. 3, pp. 1159–73, 1995.
- [56] G. A. Brar, B. M. Kiburz, Y. Zhang, J. E. Kim, F. White, and A. Amon, “Rec8 phosphorylation and recombination promote the step-wise loss of cohesins in meiosis,” *Nature*, vol. 441, no. 7092, pp. 532–536, 2006.
- [57] V. L. Katis *et al.*, “Rec8 phosphorylation by casein kinase 1 and Cdc7-Dbf4 kinase regulates cohesin cleavage by separase during meiosis.,” *Dev. Cell*, vol. 18, no. 3, pp. 397–409, 2010.
- [58] T. S. Kitajima *et al.*, “Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin,” *Nature*, vol. 441, no. 1, pp. 46–52, 2006.
- [59] Z. Xu, B. Cetin, M. Anger, U. S. Cho, W. Helmhart, and W. Xu, “Structure and function of the PP2A-shugoshin interaction,” *Mol. Cell*, vol. 35, no. 4, pp. 426–441, 2009.
- [60] S. Galander *et al.*, “Reductional meiosis I chromosome segregation is established by coordination of key meiotic kinases,” *Dev. Cell*, vol. 49, no. 4, pp. 526–541, 2019.
- [61] B. Lee and A. Amon, “Role of polo-like kinase CDC5 in programming meiosis I chromosome segregation,” *Science*, vol. 300, no. 5618, pp. 482–486, 2003.
- [62] R. K. Clyne *et al.*, “Polo-like kinase Cdc5 promotes chiasmata formation and cosegregation of sister centromeres at meiosis I,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 5, no. 5, pp. 480–485, 2003.
- [63] M. A. Attner, M. P. Miller, L. S. Ee, S. K. Elkin, and A. Amon, “Polo kinase Cdc5 is a central regulator of meiosis I,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 35, pp. 14278–14283, 2013.
- [64] K. Jonak *et al.*, “APC/C-Cdc20 mediates deprotection of centromeric cohesin at meiosis II in yeast,” *Cell Cycle*, vol. 16, no. 12. Taylor and Francis Inc., pp. 1145–1152, 18-Jun-2017.
- [65] O. Argüello-Miranda *et al.*, “Casein kinase 1 coordinates cohesin cleavage, gametogenesis, and exit from M phase in meiosis II,” *Dev. Cell*, vol. 40, no. 1, pp. 37–52, 2017.
- [66] N. Vincenten *et al.*, “The kinetochore prevents centromere-proximal crossover

- recombination during meiosis,” *Elife*, vol. 4, no. e10850, pp. 525–542, Dec. 2015.
- [67] Y. Harushima *et al.*, “A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F2 population,” *Genetics*, vol. 148, no. 1, pp. 479–94, Jan. 1998.
- [68] H. Yan *et al.*, “Transcription and histone modifications in the recombination-free region spanning a rice centromere,” *Plant Cell*, vol. 17, no. 12, pp. 3227–3238, 2005.
- [69] E. J. Lambie and G. S. Roeder, “Repression of meiotic crossing over by a centromere (CEN3) in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Genetics*, vol. 114, no. 3, pp. 769–89, Nov. 1986.
- [70] E. J. Lambie and G. Shirleen Roeder, “A yeast acts in (Cis) to inhibit meiotic gene conversion of adjacent sequences,” *Cell*, vol. 52, no. 6, pp. 863–873, Mar. 1988.
- [71] E. Mancera, R. Bourgon, A. Brozzi, W. Huber, and L. M. Steinmetz, “High-resolution mapping of meiotic crossovers and non-crossovers in yeast,” *Nature*, vol. 454, no. 7203, pp. 479–485, Jul. 2008.
- [72] D. C. Flynn, “Adaptor proteins,” *Oncogene*, vol. 20, no. 44, pp. 6270–6272, 2001.
- [73] Z. Tang, H. Shu, W. Qi, N. A. Mahmood, M. C. Mumby, and H. Yu, “PP2A is required for centromeric localization of Sgo1 and proper chromosome segregation,” *Dev. Cell*, vol. 10, no. 5, pp. 575–585, 2006.
- [74] K. Peplowska, A. U. Wallek, and Z. Storchova, “Sgo1 regulates both condensin and Ipl1/Aurora B to promote chromosome biorientation,” *PLoS Genet*, vol. 10, no. 6, 2014.
- [75] A. Rattani *et al.*, “Sgo2 provides a regulatory platform that coordinates essential cell cycle processes during meiosis I in oocytes,” *Elife*, vol. 2, p. e01133, 2013.
- [76] B. M. Kiburz *et al.*, “The core centromere and Sgo1 establish a 50-kb cohesin-protected domain around centromeres during meiosis I,” *Genes Dev.*, vol. 19, no. 24, pp. 3017–3030, 2005.
- [77] Agilent Technologies, “Quik change II xl site-directed mutagenesis kit instruction manual,” 2015. [Online]. Available: <http://www.genomics.agilent.com/files/Manual/200521.pdf>.
- [78] J. E. McLaughlin, M. A. Bin-Umer, A. Tortora, N. Mendez, S. McCormick, and N. E. Tumer, “A genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a critical role for the mitochondria in the toxicity of a trichothecene mycotoxin,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 51, pp. 21883–21888, Dec. 2009.
- [79] M. Knop *et al.*, “Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines,” *Yeast*, vol. 15, no. 10B, pp. 963–972, Jul. 1999.

- [80] M. A. Sheff and K. S. Thorn, “Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Yeast*, vol. 21, no. 8, pp. 661–670, Jun. 2004.
- [81] Qiagen, “PCR purification kit,” *QIAquick*, 2019. [Online]. Available: <https://www.qiagen.com/lu/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/dna-clean-up/qiaquick-pcr-purification-kit/#orderinginformation>. [Accessed: 26-Nov-2019].
- [82] D. G. Gibson, L. Young, R. Y. Chuang, J. C. Venter, C. A. Hutchison, and H. O. Smith, “Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases,” *Nat. Methods*, vol. 6, no. 5, pp. 343–345, 2009.
- [83] S. Fred, “Getting started with yeast,” *Methods Enzymol.*, vol. Volume 350, pp. 3–41, 2002.
- [84] F. W. Stahl, “A better way: Map distance, interference, and statistical significance based on tetrad data,” *Web Tools for Analyzing Tetrad Data*. [Online]. Available: <https://elizabethhousworth.com/StahlLabOnlineTools/ncompare2.php>. [Accessed: 27-Dec-2019].
- [85] H. Asakawa, Y. Hiraoka, and T. Haraguchi, “Live CLEM imaging: an application for yeast cells,” 2012.
- [86] I. Unk and A. Daraba, “Synchronization of *Saccharomyces cerevisiae* cells in G1 phase of the cell cycle,” *Bio-protocol*, vol. 4, no. 20, 2014.
- [87] L. E. Berchowitz *et al.*, “A developmentally regulated translational control pathway establishes the meiotic chromosome segregation pattern,” *Genes Dev.*, vol. 27, no. 19, pp. 2147–2163, 2013.
- [88] F. W. Stahl, “Formulas for map distance, interference and analysis from tetrad data,” *Web Tools for Analyzing Tetrad Data*. [Online]. Available: <https://elizabethhousworth.com/StahlLabOnlineTools/EquationsMapDistance.html>. [Accessed: 31-Dec-2019].
- [89] D. Thacker, I. Lam, M. Knop, and S. Keeney, “Exploiting spore-autonomous fluorescent protein expression to quantify meiotic chromosome behaviors in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Genetics*, vol. 189, no. 2, pp. 423–439, 2011.
- [90] M. Nambiar and G. R. Smith, “Pericentromere-specific cohesin complex prevents meiotic pericentric DNA double-strand breaks and lethal crossovers,” *Mol. Cell*, vol. 71, no. 4, pp. 540-553.e4, Aug. 2018.
- [91] L. M. Kuhl and G. Vader, “Kinetochores, cohesin, and DNA breaks: Controlling meiotic recombination within pericentromeres,” *Yeast*, vol. 36, no. 3, pp. 121–127,

- 2019.
- [92] N. E. Yelina *et al.*, “Epigenetic remodeling of meiotic crossover frequency in *Arabidopsis thaliana* DNA methyltransferase mutants,” *PLoS Genet.*, vol. 8, no. 8, p. e1002844, Aug. 2012.
- [93] E. Cappelletti *et al.*, “CENP-A binding domains and recombination patterns in horse spermatocytes,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, p. 15800, Dec. 2019.
- [94] E. L. Kurdzo and D. S. Dawson, “Centromere pairing - tethering partner chromosomes in meiosis I,” *FEBS J.*, vol. 282, no. 13, pp. 2445–2457, 2015.
- [95] L. Previato de Almeida *et al.*, “Shugoshin protects centromere pairing and promotes segregation of nonexchange partner chromosomes in meiosis,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 116, no. 19, pp. 9417–9422, May 2019.
- [96] H. G. Yu and D. Koshland, “Chromosome morphogenesis: Condensin-dependent cohesin removal during meiosis,” *Cell*, vol. 123, no. 3, pp. 397–407, Nov. 2005.
- [97] R. Barton, “Mechanisms of cohesin protection and removal during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*,” University of Edinburgh, 2018.
- [98] K. Challa, M. S. Lee, M. Shinohara, K. P. Kim, and A. Shinohara, “Rad61/Wapl (Wapl), a cohesin regulator, controls chromosome compaction during meiosis,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. 7, pp. 3190–3203, 2016.
- [99] J. P. Lao and N. Hunter, “Trying to avoid your sister,” *PLoS Biol.*, vol. 8, no. 10, pp. 1–5, 2010.
- [100] S. Hong, J. H. Joo, H. Yun, N. Kleckner, and K. P. Kim, “Recruitment of Rec8, Pds5 and Rad61/Wapl to meiotic homolog pairing, recombination, axis formation and S-phase,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, no. 22, pp. 11691–11708, 2019.
- [101] V. B. Indjeian, B. M. Stern, and A. W. Murray, “The centromeric protein Sgo1 is required to sense lack of tension on mitotic chromosomes,” *Science*, vol. 307, no. 5706, pp. 130–3, Jan. 2005.
- [102] T. H. Kim and J. Dekker, “ChIP–quantitative polymerase chain reaction (ChIP-qPCR),” *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2018, no. 5, pp. 354–355, 2018.
- [103] O. O. Nerusheva, S. Galander, J. Fernius, D. Kelly, and A. L. Marston, “Tension-dependent removal of pericentromeric shugoshin is an indicator of sister chromosome biorientation,” *Genes Dev.*, vol. 28, no. 12, pp. 1291–1309, 2014.
- [104] T. Ishiguro, K. Tanabe, Y. Kobayashi, S. Mizumoto, M. Kanai, and S. A. Kawashima, “Malonylation of histone H2A at lysine 119 inhibits Bub1-dependent H2A phosphorylation and chromosomal localization of shugoshin proteins,” *Sci. Rep.*, vol.

- 8, no. 1, pp. 1–10, 2018.
- [105] A. P. Rosebrock, “Synchronization and arrest of the budding yeast cell cycle using chemical and genetic methods,” *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2017, no. 1, pp. 47–52, 2017.
- [106] N. A. Pchelintsev, P. D. Adams, and D. M. Nelson, “Critical parameters for efficient sonication and improved chromatin immunoprecipitation of high molecular weight proteins,” *PLoS One*, vol. 11, no. 1, pp. 1–11, 2016.
- [107] Diagenode, “Bioruptor sonication system,” *User Manual*, 2010. [Online]. Available: https://www.diagenode.com/files/products/shearing_technology/bioruptor.
- [108] K. Normington, K. Kohno, Y. Kozutsumi, M. J. Gething, and J. Sambrook, “S. cerevisiae encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP,” *Cell*, vol. 57, no. 7, pp. 1223–1236, 1989.
- [109] M. D. Rose, L. M. Misra, and J. P. Vogel, “KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene,” *Cell*, vol. 57, no. 7, pp. 1211–1221, 1989.
- [110] G. K. Chan, S.-T. Liu, and T. J. Yen, “Kinetochore structure and function,” *Trends Cell Biol.*, vol. 15, no. 11, pp. 589–598, Nov. 2005.
- [111] A. F. Straight, W. F. Marshall, J. W. Sedat, and A. W. Murray, “Mitosis in living budding yeast: Anaphase a but no metaphase plate,” *Science*, vol. 277, no. 5325, pp. 574–578, Jul. 1997.
- [112] A. Leary, E. Nazarova, S. Sim, K. Shulist, P. François, and J. Vogel, “Kinesin-5 forms a stable bipolar spindle in a fast, irreversible snap,” *SSRN Electron. J.*, pp. 1–31, 2019.
- [113] T. Kim *et al.*, “Kinetochores accelerate or delay APC/C activation by directing Cdc20 to opposing fates,” *Genes Dev.*, vol. 31, no. 11, pp. 1089–1094, 2017.
- [114] M. S. Levine and A. J. Holland, “The impact of mitotic errors on cell proliferation and tumorigenesis,” *Genes Dev.*, vol. 32, no. 9–10, pp. 620–638, May 2018.
- [115] Z. Karamysheva, L. A. Diaz-Martinez, S. E. Crow, B. Li, and H. Yu, “Multiple anaphase-promoting complex/cyclosome degrons mediate the degradation of human Sgo1,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 3, pp. 1772–80, Jan. 2009.
- [116] G. V. Börner and R. S. Cha, “Induction and analysis of synchronous meiotic yeast cultures,” *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2015, no. 10, p. pdb.prot085035, Oct. 2015.
- [117] H. Asakawa, A. Hayashi, T. Haraguchi, and Y. Hiraoka, “Dissociation of the Nuf2-Ndc80 complex releases centromeres from the spindle-pole body during meiotic prophase in fission yeast,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 16, no. 5, pp. 2325–38, May 2005.

- [118] M. P. Miller, E. Ünal, G. A. Brar, and A. Amon, “Meiosis I chromosome segregation is established through regulation of microtubule–kinetochore interactions,” *Elife*, vol. 1, no. 1, p. e00117, Dec. 2012.
- [119] R. E. Meyer, H. H. Chuong, M. Hild, C. L. Hansen, M. Kinter, and D. S. Dawson, “Ipl1/Aurora-B is necessary for kinetochore restructuring in meiosis I in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 26, no. 17, pp. 2986–3000, 2015.
- [120] D. R. Rines, D. Thomann, J. F. Dorn, P. Goodwin, and P. K. Sorger, “Live cell imaging of yeast,” *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 6, no. 9, pp. 1026–1041, 2011.
- [121] R. Padmore, L. Cao, and N. Kleckner, “Temporal comparison of recombination and synaptonemal complex formation during meiosis in *S. cerevisiae*,” *Cell*, vol. 66, no. 6, pp. 1239–1256, 1991.
- [122] D. Q. Ding, A. Yamamoto, T. Haraguchi, and Y. Hiraoka, “Dynamics of homologous chromosome pairing during meiotic prophase in fission yeast,” *Dev. Cell*, vol. 6, no. 3, pp. 329–341, 2004.
- [123] V. Moiseeva, H. Amelina, L. C. Collopy, C. A. Armstrong, S. R. Pearson, and K. Tomita, “The telomere bouquet facilitates meiotic prophase progression and exit in fission yeast,” *Cell Discov.*, vol. 3, p. 17041, 2017.
- [124] F. Hormozdiari *et al.*, “The effect of insertions and deletions on wirings in protein-protein interaction networks: A large-scale study,” *J. Comput. Biol.*, vol. 16, no. 2, pp. 159–167, Feb. 2009.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Begümhan YILMAZ KARDAŞ

Doğum tarihi ve yeri : 26.03.1990/ Ankara

e-posta : begumhanyilmaz@balikesir.edu.tr

Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi/ Biyoloji	2015
Lisans	Orta Doğu Teknik Üniversitesi/ Biyoloji	2013
Lise	Konya Selçuklu Anadolu Lisesi	2008

Yayın Listesi

- [1] B. Yilmaz, S. Dogan, U. Alan, and M. Dogan, “The effects of boric acid on antioxidant enzymes,” in *The FEBS Journal*, 2014, vol. 281, no. Supplement 1, pp. 605–606.
- [2] B. Yilmaz and S. Dogan, “The cytotoxicity of different PMMA/ Hydroxyapatite nanocomposites,” in *The FEBS Journal*, 2015, vol. 282, no. Supplement 1, pp. 223–223.
- [3] N. Gungor, S. Dogan, U. Alan, and B. Yilmaz, “Inhibition of monoamineoxidase A (Mao-A) by some herbal medicines,” in *The FEBS Journal*, 2015, vol. 282, no. Supplement 1, pp. 123–123.
- [4] M.E. Diken, E. Tamahkar Irmak, S. Dogan, Y. Turhan, and B. Yilmaz, “PVA-PAA-HA hidrojel filmlerin kimyasal ve biyolojik özelliklerinin belirlenmesi,” in *10. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi*, 2016, pp. 61–61.
- [5] B. Yilmaz, S. Dogan, and S. Celikler Kasimogullari, “Evaluation of the genotoxic potential of some nanocomposites by comet assay,” in *The FEBS Journal*, 2016, pp. 316–316.
- [6] I. Akinci, S. Dogan, Y. Turhan, M. E. Diken, B. Yilmaz, and M. Alkan, “Preparation, characterization and some biological properties of PVP/Ganoderma lucidum

- composites,” in *The FEBS Journal*, 2016, vol. 283, no. Supplement 1, pp. 316–316.
- [7] R. Caliskan, B. Yilmaz, M. E. Diken, S. Dogan, B. Cicek, and Z. Onbasioglu, “Biological properties of some novel thiadiazole compounds,” in *The FEBS Journal*, 2016, vol. 283, no. Supplement 1, pp. 192–192.
- [8] S. Dogan, M. E. Diken, U. Alan, B. Yilmaz, M. Alkan, and M. Dogan, “Some kinetic and inhibition properties of deepwater pink shrimp from aegean sea : ph , temperature , kinetic and inhibition,” *Adv. Food Sci.*, vol. 38, no. 4, pp. 155–164, 2016.
- [9] B. Yilmaz and S. Dogan, “Hemocompatibility of poly (methylmethacrylate)/ nanohydroxyapatite nanocomposites,” in *4th International Turk-Pak Conference on Chemical Sciences*, 2017, pp. 38–38.
- [10] I. Akinci, M. Dogan, Y. Turhan, B. Yilmaz, M. E. Diken, and S. Dogan, “PVP/Ganoderma lucidum kompozitinin sitotoksitesi,” in *3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi*, 2017, pp. 516–516.
- [11] A. C. Orbay, M. Dogan, Y. Turhan, B. Yilmaz, M. E. Diken, and S. Dogan, “PEG/Ganoderma lucidum kompozitlerinin sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi,” in *3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi*, 2017, pp. 514–514.
- [12] H. Cesur, B. Yilmaz, R. İrkin, and S. Dogan, “Kurutulmuş turunçgil kabuklarının kefir üretiminde kullanımının raf ömrü süresince bazı mikrobiyal, kimyasal ve fiziksel özelliklerine etkisi,” in *ADÜ 1. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi*, 2017, pp. 408–408.
- [13] S. Dogan, A. C. Orbay, B. Yilmaz, M. E. Diken, Y. Turhan, and M. Dogan, “Comparison of the cytotoxicities of the Poly (ethylene glycol)/ Ganoderma Lucidum composites with polymers having different molecular weights,” in *4th International Multidisciplinary Congress of Eurasia*, 2017, pp. 114–114.
- [14] S. Dogan, N. Akici, B. Yilmaz, M. E. Diken, and T. Dirmenci, “Biological activity of local endemic Salvia kurdica boiss ve hohen . ex bentham,” in *4th International Multidisciplinary Congress of Eurasia*, 2017, pp. 87–87.
- [15] S. Dogan, N. Akici, B. Kocaturk, B. Yilmaz, T. Dirmenci, and M. E. Diken, “Antibacterial and cytotoxic activity of local endemic Salvia euphratica,” in *4th International Multidisciplinary Congress of Eurasia*, 2017, pp. 86–86.
- [16] S. Dogan, B. Yilmaz, and S. Celikler Kasimogullari, “Genotoxicity of PMMA / nHAP nanocomposites,” in *3rd International Conference on Engineering and Natural Sciences*, 2017, pp. 636–636.
- [17] S. Dogan, S. Kirmizi, Y. Turhan, M. E. Diken, and B. Yilmaz, “Determination of

- some biological properties of PAA nanocomposites,” *3rd Int. Conf. Eng. Nat. Sci.*, pp. 605–605, 2017.
- [18] E. Tamahkar Irmak, B. Yilmaz, M. E. Diken, and S. Doğan, “Cytotoxicity of poly (vinyl alcohol) -poly (acrylic acid) - hydroxyapatite nanocomposite hydrogel films,” in *22nd International Biomedical Science and Technology Symposium*, 2017, pp. 206–206.
- [19] B. Yilmaz, S. Dogan, and S. Celikler Kasimogullari, “Hemocompatibility, cytotoxicity, and genotoxicity of poly(methylmethacrylate)/nanohydroxyapatite nanocomposites synthesized by melt blending method,” *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 67, no. 6, pp. 351–360, 2018.
- [20] M. E. Diken, B. Yilmaz, S. Dogan, B. Kizilduman Kocer, and M. Dogan, “Cytotoxicity of PVA/PAA/Nanopomegranate seed nanocomposites,” in *7th International Molecular Biology and Biotechnology Congress*, 2018, pp. 37–37.
- [21] B. Yilmaz, Y. Turhan, S. Dogan, E. Tamahkar, and M. Dogan, “Cytotoxicity of intercalated kaolinite nanoclays,” in *7th International Molecular Biology and Biotechnology Congress*, 2018, pp. 38–38.
- [22] E. E. Doğan, P. Tokcan, M. E. Diken, B. Yilmaz, B. Kocer Kizilduman, and P. Sabaz, “Synthesis, characterization and some biological properties of PVA/PVP/PN hydrogel nanocomposites: Antibacterial and biocompatibility,” *Adv. Mater. Sci.*, vol. 19, no. 3, pp. 32–45, 2019.
- [23] B. Yilmaz, E. Tamahkar Irmak, Y. Turhan, S. Doğan, M. Doğan, and O. Turhan, “Synthesis, characterization and biological properties of intercalated kaolinite nanoclays: intercalation and biocompatibility,” *Adv. Mater. Sci.*, vol. 19, no. 1, pp. 83–99, 2019.
- [24] M. E. Diken et al., “Synthesis, characterization, and their some chemical and biological properties of PVA/PAA/nPS hydrogel nanocomposites: Hydrogel and wound dressing,” *J. Bioact. Compat. Polym.*, vol. 35, no. 3, pp. 203–215, May 2020.