

*Dictyostelium discoideum*'da  
SPONTAN MUTASYONLARIN HIZI, MOLEKÜLER  
SPEKTRUMU VE SONUÇLARI

RATE, MOLECULAR SPECTRUM AND  
CONSEQUENCES OF SPONTANEOUS  
MUTATIONS IN *Dictyostelium discoideum*

SİBEL KÜÇÜKYILDIRIM ÇELİK

PROF.DR. HATİCE MERGEN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ Olarak Hazırlanmıştır.

2015

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

19/06/2015

SİBEL KÜÇÜKYILDIRIM ÇELİK

## ÖZET

# ***Dictyostelium discoideum*'da SPONTAN MUTASYONLARIN HIZI, MOLEKÜLER SPEKTRUMU VE SONUÇLARI**

**Sibel KÜÇÜKYILDIRIM ÇELİK**

**Doktora, Biyoloji Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof.Dr. Hatice MERGEN**

**Haziran 2015, 79 sayfa**

Genetik varyasyonun temel kaynağı olan spontan mutasyonlar genetik biliminde merkezi bir yere sahiptir. Evrimsel genetikte, mutasyon hızı ve yeni mutasyonların etkilerinin dağılımı evrimsel ve populasyon genetiğinin sorularını cevaplandırmada önemli bir rol oynar.

Mutasyon biriktirme deneyleri ile tüm genom dizilemenin birlikte uygulanması spontan mutasyonların hızı ve dağılımı hakkında güvenilir bilgi sağlayabilir. Bu yöntem bakterileri, protistleri, bitkileri ve hayvanları kapsayan çeşitli organizmalarda uygulanmıştır.

Bu tez çalışmasında, mutasyon hızının ve spektrumunun belirlenmesi için bir model organizma olan *Dictyostelium discoideum* kullanılmıştır. Elde edilen sonuçların Drake kuralı ve genetik sürüklenme bariyeri hipotezlerine uygunluğunun sınanması ve mutasyon oluşumuna neden olan genetik mekanizmalar incelenerek tartışılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, rasgele seçilen on üç MA soy hattının genomları yeni nesil DNA dizileme yöntemi kullanılarak, dizilenmiştir. Nükleer DNA için mutasyon

hızı  $0.89 \times 10^{-11}$  mutasyon/bölge/nesil olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan mutasyon hızı ökaryotlar için en düşük değerdir. Elde edilen sonuçlara göre, hesaplanan mutasyon hızı genetik sürüklenme bariyeri hipotezine uygundur. Sonuç olarak, *D.discoideum*'da gözlenen düşük mutasyon hızının aşırı mutajen olan doğal çevrede ve olağandışı hayat döngüsünde genomu koruyacak bir adaptasyon olduğu tartışılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** mutasyon hızı, *Dictyostelium discoideum*, mutasyon biriktirme, yeni nesil DNA dizileme

## ABSTRACT

# RATE, MOLECULAR SPECTRUM AND CONSEQUENCES OF SPONTANEOUS MUTATIONS IN *Dictyostelium discoideum*

**Sibel KÜÇÜKYILDIRIM ÇELİK**

**Doctor of Philosophy, Department of Biology**

**Supervisor: Prof.Dr. Hatice MERGEN**

**June 2015, 79 pages**

As the ultimate source of genetic variation, spontaneous mutations have a central role in genetics. In evolutionary genetics, the mutation rate and the distribution of the effects of new mutations play an important role in answering evolutionary and population genetic questions.

The combination of mutation accumulation experiments and whole genome sequencing can provide reliable information about the rates and spectrum of spontaneous mutations. This method have already been applied with a wide variety of organisms, including bacteria, protists, plants, and animals.

In this study, the method performed with a model organism *Dictyostelium discoideum*. The study aims to examine whether the results are in accordance with the Drake's rule and genetic drift barrier hypothesis and to analyze and discuss the genetic mechanisms that cause mutations. For this purpose, the genomes of thirteen randomly chosen MA lines have been sequenced by using next generation sequencing method. The mutation rate for nuclear DNA yielded  $0.89 \times 10^{-11}$  per site

per generation. The estimated mutation rate is the lowest for any eukaryotes. According to the results, the estimated mutation rate is in accordance with the genetic drift hypothesis. In conclusion, it can be argued that low mutation rate is an adaptation to maintain genome in extremely mutagenic natural environment and unusual life cycle.

**Keywords:** mutation rate, *Dictyostelium discoideum*, mutation accumulation, next generation DNA sequencing

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Hatice MERGEN'e,

Bu çalışmanın gerçekleşmesini mümkün kılan, bilgi ve tecrübesiyle hep yanımda olan Sayın Prof.Dr. Michael LYNCH'e,

Tez İzleme Komitesinin Sayın üyeleri Prof. Dr. Afife İZBIRAK ve Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a

Her ihtiyacımda yanımda olan başta Dr. Way SUNG olmak üzere tüm LYNCH LAB EKİBİ'ne ve sevgili arkadaşlarım Beril ERDEM, Fatma ZİLİFDAR ile Egemen FOTO'ya,

Sadece tez çalışmam sırasında değil tüm zor anlarımda yanımda olan yardım ve desteğini bir an olsun esirgemeyen Sayın Uzm.Hasan ÜNAL'a,

Çalışmam sırasında tüm samimiyetleri ile bana huzurlu sıcak bir aile ortamı sunan Dr. Çiğdem Balım, Çağrı Yıldırım-Abacı, Dr. Serdar Abacı, Dr. Özden Kocaoğlu, Dr. Ömer Kocaoğlu ve APAÇI'ye,

Tecrübe ve destekleri için Doç.Dr.İ.Çağatay Karaaslan ve Dr.Emel Sağlar'a,

Aileme,

Sevgili eşim Dr. Raşit Çelik'e,  
Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

- Bu tez çalışması, US Department of Army; ONRBAA10-002no'lu proje ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi; 6091 Uluslararası İşbirliği Geliştirme Desteği tarafından desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
ÇİZELGELER .....	vii
ŞEKİLLER .....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ .....	4
2.1. Mutasyonlar ve Mutagenез.....	4
2.2. Mutasyonların Sınıflandırılması .....	6
2.3. DNA Onarımına Genel Bakış.....	8
2.4. Mutasyona Yatkınlık .....	10
2.5. Mutasyon Hızı.....	11
2.6. Mutasyonların Evrimsel Önemi .....	16
2.6.1. Drake Kuralı.....	18
2.6.2. Genetik Sürüklenme Engeli Hipotezi (Drift Barrier Hypothesis) .....	20
2.7. Mutasyon Hızının Hesaplanması.....	22
2.7.1. Mutasyonların Fenotipik Olarak Taranması.....	24
2.7.2. Mutasyonların Uyum Başarısına Etkisinin Ölçülmesi.....	24
2.7.3. Evrimleşme Hızının Nötral Bölgeler Kullanılarak Ölçülmesi.....	25
2.7.4. Kendileşen Populasyonlarda Zararlı Mutasyonların Hızının Hesaplanması.....	25
2.7.5. Mutajen Uygulanması.....	26
2.7.6. MA Soyhatlarında Biriken Mutasyonların Doğrudan DNA Dizisinde Taranması.....	26
2.8. Mutasyon Hızı, Spektrumu ve Etkilerinin Belirlenmesinde Kullanılabilecek Model Organizmalar .....	28
2.9. Dictyostelium discoideum .....	29
2.9.1. Dictyostelium discoideum`un Genomu .....	32
2.9.2. Dictyostelium discoideum Proteomunun İçeriği ve Organizasyonu .....	37
2.10. Yeni Nesil DNA Dizileme (Next Generation DNA Sequencing, NGS) .....	40



2.11. Biyoinformatik Yöntemler .....	41
2.11.1. Verilerin İşlenmesi .....	42
3. MATERYAL VE METOT .....	45
3.1. <i>Dictyostelium discoideum</i> Kültürlerinin Hazırlanması .....	45
3.2. Mutasyon Biriktirme Soylarının Oluşturulması .....	46
3.3. DNA İzolasyonu.....	47
3.3.1. DNA Örneklerinin Nitel ve Nicel Analizi .....	48
3.4. Yeni Nesil DNA Dizileme .....	49
3.4.1. Yeni Nesil Dizileme İçin Genomik DNA Kütüphanesi Hazırlanması .....	49
3.4.1.1. Fragmentasyon.....	49
3.4.1.2. DNA Parçalarına Dizinler Eklenmesi .....	50
3.4.1.3. Amplifikasyon.....	51
3.4.1.4. DNA Parçalarının Seçilmesi ve Temizlenmesi.....	52
3.4.2.Genomik DNA Kütüphanelerinin Nicelik ve Niteliklerinin Kontrol Edilmesi.....	54
3.4.3. Dizileme.....	54
3.5. Biyoinformatik Analiz .....	54
3.5.1. Mutasyonların Tanımlanması ve Uzlaşma Yaklaşımı .....	54
3.5.2. İnsersiyon ve Delesyonların Belirlenmesi .....	57
3.5.3. Paylaşılan Monomorfizmlerin Belirlenmesi .....	58
3.5.3. Mutasyon Hızının Hesaplanması .....	58
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	60
4.1. Bulgular .....	60
4.1.1. Kuşak Süresinin Hesaplanması .....	60
4.1.2. DNA Örneklerinin Nitelik ve Niceliklerinin Değerlendirilmesi.....	60
4.1.3. Dizileme Aşamalarında Elde Edilen Sonuçlar.....	62
4.1.3.1. Genomik DNA Kütüphanelerinin Nicel Olarak Değerlendirilmesi.....	62
4.1.3.2. Dizilemeden Elde Edilen Sonuçlar.....	64
4.1.3.3. <i>Dictostelium discoideum</i> da Spontan Mutasyonların Hızı ve Moleküler Spektumu .....	66
4.2. Tartışma .....	72
KAYNAKLAR .....	80
EKLER.....	94
ÖZGEÇMİŞ .....	107

## ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. MA deneylerinden elde edilen mutasyon hızı hesaplamaları .....	15
Çizelge 2.2. <i>Dictyostelium discoideum</i> kromozomlarına ve mitokondri genomuna ait özellikler .....	36
Çizelge 2.3. <i>Dictyostelium discoideum</i> ile bazı ökaryotik canlılara ait genom özelliklerinin karşılaştırılması. ....	39
Çizelge 3.1. Kütüphane hazırlanırken kullanılan dizinler .....	53
Çizelge 3.2. Kütüphane hazırlanırken kullanılan primerler .....	53
Çizelge 4.1. Genomik DNA örneklerine ait ölçümler .....	61
Çizelge 4.2. DNA kütüphanelerinin konsantrasyonları.....	62
Çizelge 4.3. DNA kütüphanelerinin büyüklüğü ve konsantrasyonları.....	64
Çizelge 4.4. <i>Dictyostelium discoideum</i> 'da belirlenen mutasyonlara ait bilgiler....	69
Çizelge 4.5. <i>Dictyostelium discoideum</i> 'da belirlenen mutasyonların genomda yerleşimi ve neden oldukları değişiklikler .....	70
Çizelge 4.6. <i>Dictyostelium discoideum</i> 'da belirlenen küçük insersiyon/delesyon olayları .....	71

## ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Spontan mutasyonlar tautomerik dönüşümler (A) ya da kimyasal değişiklikler (B) sonucu gerçekleşebilir .....	6
Şekil 2.2. Genom replikasyonunun doğruluğu ile genom büyüklüğü arasındaki ilişkinin gösterilmesi .....	13
Şekil 2.3. Mutasyon hızının evrimi için kontrol noktaları .....	17
Şekil 2.4. Drake kuralı.....	18
Şekil 2.5. Genom büyüklüğü ile mutasyon hızı arasındaki ilişkinin gösterilmesi.	20
Şekil 2.6. Efektif populasyon büyüklüğü ( $N_e$ ) ve kodlayıcı DNA ile mutasyon hızı arasındaki ilişkinin gösterilmesi. ....	22
Şekil 2.7. MA deney sisteminde mutasyonların birikmesi .....	28
Şekil 2.8. Proteom temelli ökaryotik filogeni. ....	30
Şekil 2.9. <i>D.discoideum</i> 'un hayat döngüsü .....	32
Şekil 2.10. Tez çalışmasında kullanılan İllumina sisteminin çalışma prensibi.....	42
Şekil 3.1. Kullanılan MA deney sistemi. ....	46
Şekil 3.2. Yeni nesil dizileme için genomik DNA kütüphanesi hazırlanması.. ....	50
Şekil 3.3. Düşük ve yüksek kapsama değerlerinin şematik olarak gösterilmesi..	55
Şekil 3.4. Uzlaşma Yaklaşımı. ....	57
Şekil 4.1. İzole edilen DNA`ların agaroz jelde görüntülenmesi. ....	60
Şekil 4.2. DNA kütüphanelerinin görüntülenmesi.....	63
Şekil 4.3. Kapsama değeri ve genomun analiz edilebilen yüzdesi arasındaki ilişkinin gösterilmesi .....	65
Şekil 4.4. <i>Dictyostelium discoideum</i> 'da belirlenen mutasyon hızının diğer canlılarla karşılaştırılması.....	66

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\alpha$	:	DNA polimeraz alfa altbirimi
A	:	Adenin
AT	:	Adenin ve Timin
bç	:	Baz çifti
°C	:	Santigrad derece
C	:	Sitozin
CpG	:	Sitozin fosfat Guanin
$\delta$	:	DNA polimeraz delta altbirimi
$\epsilon$	:	DNA polimeraz epsilon altbirimi
g	:	Yerçekimi kuvveti
G	:	Guanin
GC	:	Guanin ve Sitozin
Ge	:	Efektif genom büyüklüğü
H <sub>2</sub> O	:	Su
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	:	Dipotasyum hidrojen fosfat
kb	:	Kilobaz
KCl	:	Potasyum klorür
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	:	Potasyum di-hidrojen fosfat
L	:	Lösin
Mb	:	Mega baz
mg	:	Miligram
MgSO <sub>4</sub>	:	Magnezyum sülfat
ml	:	Mililitre
$\mu$	:	Baz çifti başına düşen mutasyon sayısı
$\mu$ l	:	Mikrolitre
mM	:	Milimolar
mRNA	:	Mesajcı RNA
N	:	Nükleotit
Ne	:	Efektif populasyon büyüklüğü
ng	:	Nanogram

pg	:	Pikogram
pH	:	Bir sulu çözültide bulunan H <sup>+</sup> iyonlarının derişiminin negatif logaritması
NaCl	:	Sodyum klorür
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	:	di-Sodyum hidrojen fosfat
Q	:	Glutamin
rRNA	:	Ribozomal RNA
T	:	Timin
Ts	:	Transisyon
tRNA	:	Taşıyıcı RNA
Tv	:	Transversiyon
U	:	Urasil
<i>U</i>	:	Genom başına düşen mutasyon sayısı
W	:	Adenin ya da Timin
ζ	:	DNA polimeraz zeta altbirimi

### **Kısaltmalar**

5-mC	:	5-metilsitozin
Asn	:	Asparajin
AX	:	Akzenik (Saf kültürü yapılabilen mikroorganizma)
BER	:	Base excision repair (baz kesip çıkarma onarımı)
BLAST	:	Basic Local Alignment Search Tool
dk	:	Dakika
DIRS	:	Dictyostelium Intermediate Repeat Sequence
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
EDTA	:	Etilendiamin tetra-asetik asit
EST	:	Expressed Sequence Tag
Ile	:	İzolösin
LTR	:	Long Terminal Repeat (Uzun terminal tekrarlar)
Lys	:	Lizin
MA	:	Mutation Accumulation (Mutasyon biriktirme)
MMR	:	Mismatch repair (Yanlış eşleşme onarımı)

MutL	:	Mutator L proteini
MutS	:	Mutator S proteini
PBS	:	Fosfat tamponunda salin
Phe	:	Fenilalanin
RNA	:	Ribonükleik asit
RNase	:	Ribonükleaz
sn	:	Saniye
SNP	:	Tek nükleotit polimorfizmi
SSR	:	Simple Sequence Repeats (Basit dizi tekrarları)
TLS	:	Translesion synthesis (translezyon sentezi)
Tyr	:	Tirozin

*"Any living cell carries with it the experiences of a billion years of experimentation by its ancestors. You cannot expect to explain so wise an old bird in a few simple words."*  
Max Delbrück, 1966

## 1. GİRİŞ

Bir populasyonda genetik çeşitliliğin nasıl oluştuğunu ve sürdürüldüğünü anlamak uzun bir süre boyunca biyolojinin odak noktasıydı. Evrimsel sentezin ortaya konulduğu 1930'lu yılların sonlarından 1960'lı yılların ortalarına kadar biyologların çoğu, tüm alellerin canlının adaptasyonu üzerindeki etkisinin farklı olduğunu, bu nedenle gen frekansını asıl olarak doğal seçilimin etkilendiğini düşünüyordu.

1960'lı yıllarda bazı moleküler verilerin elde edilmesi, seçilime katkısı olmayan (nötr) alellerin rasgele genetik sürüklenmesi yoluyla evrimin oluştuğu fikrinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Lewontin ve Hubby 1966'da enzim lokuslarının büyük kısmının polimorfik olduğunu göstermişlerdir [1]. Bu önemli bulgu üzerine, doğal seçilim mekanizmasının bu derece fazla genetik çeşitliliği sürdüremeyeceği, dolayısıyla genetik çeşitliliğin büyük kısmının seçilim açısından nötr olduğu fikri ortaya atılmıştır.

1968'de Kimura filogenetik yaklaşım kullanarak, çeşitli proteinlere ait amino asit dizilerinin evrimleşme hızını hesaplamıştır. Buna göre, bir proteinin farklı soy hatlarında aynı hızla evrimleştiği sonucunu çıkarmıştır. Kimura, bu kararlı evrimleşme mekanizmasının doğal seçilimle sağlanamayacağını, ancak moleküler düzeyde belirlenebileceğini savunmuştur [2].

Günümüzde bilim dünyası moleküler çeşitliliğin ve evrimin nötr alellerin sıklıklarındaki (frekanslarındaki) değişimin sonucu olduğu konusunda hemfikirdir.

Ancak seçilim yanlıları halen moleküler evrimsel değişimlerin büyük bölümünün seçilimden kaynaklandığını düşünmektedirler.

Moleküler evrimin nötr alel kuramına göre, genetik çeşitliliğin çoğu seçilim açısından nötrdür ve uyum başarısı açısından önemi yoktur. Nötr alel kuramı canlıların morfolojik, fizyolojik ve davranışsal özelliklerinin rasgele genetik sürüklenme ile evrimleştiğini savunmamaktadır, bu tip özelliklerin önemli kısmı yalnızca doğal seçilimle evrimleşebilir, ancak temelde DNA düzeyindeki değişimlere dayanır. Fakat, nötr alel kuramı mutasyonların çoğunun canlı için zararlı olduğunu ve bu nedenle doğal seçilimle ayıklandığını, dolayısıyla mutasyonların bizim gözlemlediğimiz çeşitliliğe çok az katkı yaptığını kabul etmektedir. Çünkü DNA'da bizim gözlemleyebildiğimiz farklılıklar ya protein düzeyindeki farklılıklara dönüştürülmez ya da protein yapısına yansıyan mutasyonların canlı fizyolojisi üzerine etkisi çok azdır.

Mutasyonların büyük çoğunluğunun zararlı etkileri olmasına rağmen, mutasyon hızının neden sifıra evrilmediğini Alfred Sturtevant 1937'de yayınlanan makalesinde tartışmıştır [3]. Sturtevant'ın vardığı, ünlü fakat yetersiz, sonuca göre "genlerin doğası bu tip bir redüksiyona izin vermez (vermemektedir)". Sturtevant'ın bu öncü makalesinden beri geçen 78 yılda bizim genomu ve mutasyonları oluşturan biyokimyasal mekanizmalarını anlayışımızda önemli değişiklikler oldu. Bugün mutasyon hızının evrimi üzerine zengin bir literatür olmasına rağmen, herhangi bir taksonomik düzeyde, özellikle çok hücreli ökaryotlarda, mutasyon hızının farklı olmasına neden olan faktörlerin anlaşılması için geniş kapsamlı deneysel veri hala yoktur.

Yaklaşık 10 yıl öncesine kadar, yeni mutasyonların hangi sıklıkta ortaya çıktığını belirlemek zordu [4], [5]. Mutasyonlar oldukça nadir gerçekleşen olaylar olmalarının yanı sıra [6], çoğunlukla canlının uyum başarısı üzerine negatif etkiye sahiptirler [7] ve doğal seçilim tarafından hızlıca uzaklaştırılırlar. Bu nedenle, seçilim etkisini asgari düzeyde tutacak yöntemler kullanılmadıkça,



gerçek mutasyon hızını hesaplamak mümkün değildir.

Yakın zamana kadar, mutasyon hızının doğrudan hesaplanması çoğunlukla birkaç geni temel alan fenotipik deneylerle sınırlıydı [6]. Ancak günümüzde mutasyon biriktirme (Mutation Accumulation, MA) deney sistemi ile tüm genom dizilemesinin beraber kullanılması yeni ve umut vaat eden bir teknolojidir. Böylece genomun, ifade edilen (protein ya da RNA) ya da edilmeyen herhangi bir bölgesindeki herhangi bir mutasyon, tek bir bazı etkilese dahi belirlenebilir. Bu yöntemin kullanılmasıyla spontan mutasyon hızı hesaplanan prokaryotik ve ökaryotik canlılar vardır. Elde edilen sonuçlara göre, ökaryotik canlılarda en yüksek mutasyon hızı *Arabidopsis thaliana*'da ( $7 \times 10^{-9}$  mutasyon/genom/nesil); en düşük mutasyon hızı ise *Paramecium tetraurelia*'da ( $1.94 \times 10^{-11}$  mutasyon/genom/nesil) gözlenmiştir [8,9]. Mitokondriyal sonuçlar ise farklı organizmalar arasında daha sabit bir durum sergiler [8–11].

Bu tez çalışması kapsamında, mutasyon hızının ve spektrumunun belirlenmesi için bir mikrobiyal ökaryot olan *Dictyostelium discoideum* model olarak kullanılmıştır. Mutasyon biriktirme deney sistemi için 100 adet soy hattı oluşturulmuş ve soy hatları 3000'nci nesile ulaşıncaya değin kültürler devam ettirilmiştir. Rasgele seçilen 22 örnekten DNA izolasyonu yapılmış ve genom kütüphaneleri başarıyla hazırlanan 21 örneğin tüm genomu yeni nesil DNA dizileme yöntemiyle dizilenmiştir. Asgari 15X kapsama (coverage) değerine sahip 13 örnekten elde edilen veriler mutasyon hızı ve spektrumun belirlenmesinde kullanılmış, sonuçların Drake kuralı'na uygunluğu test edilmiş ve belirlenen mutasyonların oluşmasına neden olan genetik mekanizmalar incelenmiş ve tartışılmıştır.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. Mutasyonlar ve Mutagenез

Genetik çeşitliliğin temel kaynağını oluşturan mutasyonlar tüm evrimsel süreçlerde merkezi role sahiptir. Basitçe DNA dizisinde meydana gelen kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanabilirler. Mutasyonlar kendiliğinden oluşabileceği gibi, çeşitli kimyasal ya da fiziksel faktörler tarafından da uyarılabilir [12]. Kimi zaman gerçekleşen bir mutasyon canlının yaşadığı koşullara uyum başarısını arttıracak etkiye sahip olabilir, bu gibi mutasyonlar evrimin hammaddesini meydana getirir ve adaptasyonlara yol açar [12].

Mutasyonlar, DNA hasarı, DNA hasarını önleme ve DNA onarımı mekanizmalarının arasındaki etkileşimler sonucu oluşur. Mutasyon oluşumu süreci (mutagenез) iki temel basamakta gerçekleşir. İlk basamakta, fiziksel, kimyasal ya da biyolojik bir etken nedeniyle DNA hasarı oluşur. İkinci basamakta ise moleküler sistemler bu hasarı tanımakta ve/veya hasarı en doğru şekilde onarmakta başarısızlığa uğrarlar ve sonuç olarak DNA hasarı bir mutasyona dönüşür. Mutajenik lezyonlar DNA'nın atipik durumlarıdır ve tüm mutasyonlar için gerekli olan öncülleridir.

Örneğin inozin, DNA'nın doğal yapısında bulunmaması gereken bir nükleozittir ve bundan dolayı inozinin DNA'daki varlığı, DNA'nın bir şekilde değişikliğe uğradığına işaret eder. Bu lezyon genellikle adenozinin deaminasyonu ile oluşur ve nadiren mutajeniktir. Enzimler DNA'daki inozinleri belirleyerek, bu lezyonun uzaklaştırılması ve düzeltilmesi için onarım yollarını başlatırlar. İnozinin varlığı bir mutasyondan daha çok bir lezyondur çünkü inozin DNA'dan kolaylıkla uzaklaştırılabilir ve DNA'nın öncül lezyon durumu eski haline getirilebilir. Ancak eğer onarım sistemi bu öncül lezyon durumunu düzeltmede başarısızlığa uğrarsa, öncül lezyon durumundan farklı ve baz eşleşmesi yapabilen durum meydana gelir, bundan sonra hiçbir şey bu alanın hasarlı olduğuna işaret etmez

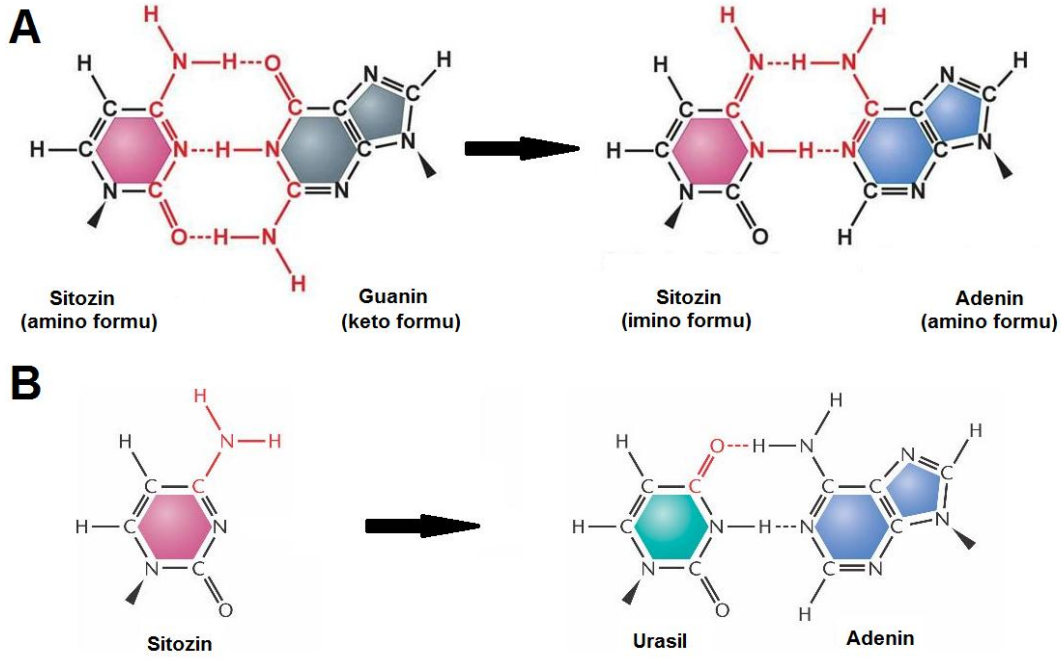
ve onarım imkansız hale gelmiş olur. Onarım teorik olarak imkansız hale geldikten sonra mutasyon oluşur [13].

Mutasyonlar, kendiliğinden oluşabilir ya da biyolojik, kimyasal veya fiziksel bir dış etken tarafından indüklenebilir. Kendiliğinden oluşan mutasyonlar (spontan) hücresel süreçlerin işleyişindeki aksaklıklar nedeniyle meydana gelirler. Spontan mutasyonların oluşumundan çoğunlukla hangi lezyonların sorumlu olduğu hala açık değildir, ancak birkaç gözlem güçlü görünmektedir [14]:

- DNA yapısında yer alan azotlu bazlar, tautomerik dönüşüm yapma kabiliyetine sahiptir. Her baz, biri sık diğeri ise nadir görülen iki farklı formda bulunabilir. Bir baz geçici olarak seyrek rastlanan forma dönüştüğünde yanlış baz ile eşleşebilir. Örneğin sitozin nükleotidi (yaygın formu amino formudur), normal şartlarda guanin nükleotidi ile eşleşir. Ancak sitozin seyrek görülen imino formuna geçtiğinde adenin ile eşleşebilir ve bir nokta mutasyonunun gerçekleşmesine öncülük edebilir (Şekil 2.1A).
- DNA yapısında bulunan bazlar kimyasal değişikliğe uğrayabilir. Örneğin sitozin amino grubunu kaybederek urasile dönüşebilir ve adenin ile eşleşebilir. Bu tip hatalar genellikle yüksek etkinlikte tamir edilir (Şekil 2.1B).
- DNA polimeraz replikasyon sırasında hata yapabilir. Örneğin guanin ile adenini eşleştirebilir. Bu tip hataların çoğu DNA polimerazların hata okuma aktiviteleri ile düzeltilir. Ancak bazı hatalar gözden kaçabilir ve kalıtsal hale gelebilir.

Çeşitli biyolojik, kimyasal ya da fiziksel etkenler de mutasyon oluşumunu uyarabilir. Kimyasallar DNA yapısında bulunan bazları değiştirebilir ya da bazlara yeni gruplar ekleyebilir, bu durumda kimyasal yapıları değişen bazlar yanlış

eşleşmeler yaparlar. Örneğin, sigara dumanında bulunan benzopiren, guanine büyük bir kimyasal grup ekler ve bu durumda guanin herhangi bir bazla eşleşme yapabilecek duruma gelir. İyonize edici radyasyon ve ultraviyole radyasyonu ise fiziksel mutajenlere örnektir. Fiziksel mutajenler genellikle, serbest radikaller oluşturarak, DNA'nın şeker-fosfat omurgasını kırarak ya da pirimidin dimerlerini uyararak mutasyon oluşumuna neden olurlar [14].



**Şekil 2.1.** Spontan mutasyonlar tautomerik dönüşümler (A) ya da kimyasal değişiklikler (B) sonucu gerçekleşebilir.

## 2.2. Mutasyonların Sınıflandırılması

Mutasyonlar tek baz çifti ile sınırlı kalabileceği gibi, çok sayıda baz çiftini de etkileyebilir [12]. Mutasyonların rastlantısal olarak genomdaki herhangi bir bölgede oluşabilmesi, fenotipik etkilerinin farklı olmasını sağlar. Mutasyonların fenotipik etkileri proteinlerin yapı ve işlevinde gözlenir.

Tek baz çiftini etkileyen mutasyonlar, baz değişimi, insersiyon ya da delesyon şeklinde gelişebilir, her olay genomda etkilediği bölgeye göre farklı sonuçlara neden olur [14]:

- Sessiz (silent) mutasyonlar, protein dizisinde değişikliğe neden olmaksızın genetik çeşitliliğe katkıda bulunurlar. Bu nedenle popülasyonda yüksek sıklıkta görülürler.
- Yanlış anlamlı (missense) mutasyonlar, protein dizisinde yer alan bir amino asidin başka bir amino aside dönüşmesine neden olan mutasyonlardır. İlgili amino asitlerin özelliklerine bağlı olarak, yanlış anlamlı mutasyonlar proteinin işlevini etkilemeyebilir, azaltabilir/arttırabilir ve nadiren de proteini iş göremez hale getirebilir. Yanlış anlamlı mutasyonlar genellikle protein işlevini etkilemediği ya da tolere edilebilecek ölçüde işlevi azalttığı için popülasyonda varlığı devam ettirilir.
- Anlamsız (nonsense) mutasyonlar bir amino asit kodonunun “dur” kodonuna dönüşmesine neden olurlar. Bu nedenle translasyon erken sonlanır ve oluşan protein işlevsizdir. Nadiren de olsa, proteinin 3’ ucuna yakın pozisyonda ortaya çıkan anlamsız mutasyonların protein işlevi üzerine etkisi olmayabileceği bilinmektedir.
- Çerçeve kayması (frame shift) mutasyonlar, DNA dizisine tek bir bazın eklenmesi ya da çıkarılmasıyla meydana gelir. Translasyon okuma çerçevesinin kaymasına neden olacağı için bu tip mutasyonlar neredeyse her zaman işlevsiz proteinlerin üretilmesine neden olur.

DNA dizisinde çok sayıda bazı etkileyen mutasyonlar ise dramatik değişikliklere neden olabilir ve etkilenen bölgeye göre daha vahim sonuçlar doğurabilir [14]:

- Delesyonlar, DNA molekülünün iki noktadan kırılması ve aradaki parçanın ayrılmasından sonra uçların yeniden birleşmesiyle gerçekleşebilir. Bu durum genetik bilginin bir kısmının kaybedilmesine yol açar.
- Duplikasyonlar, homolog kromozomların farklı bölgelerden kırılması ve yanlış eşlerle yeniden birleşmesiyle oluşurlar. Bu olayda, kromozomlardan birinde delesyon diğerinde ise duplikasyon olayı gerçekleşir.
- İnversiyonlar, kromozomların kırılarak yeniden birleşmesi ile oluşurlar. Kromozomdan kopan DNA parçası yerine ters yönde tekrar yerleşebilir.
- Translokasyonlar, bir kromozom parçasının farklı bir kromozoma katılması sonucu ortaya çıkar. Translokasyonlar genellikle delesyon ve duplikasyonlara beraber gözlenir.

### **2.3. DNA Onarımına Genel Bakış**

Replikasyonun mutajenik doğası, replikasyon sırasında var olan bazı lezyonların daha mutajenik hale gelmesi ve buna ek olarak replikasyonun (özellikle yanlış eşleşmiş baz çiftlerini kullanarak) yeni lezyonlar yarattığı gerçeği ile açıklanabilir [13]. Ancak her hücre replikasyon hata oranını tolere edilebilir düzeyde tutulabilmek için DNA onarım mekanizmalarından yararlanır.

Replikasyon olayının pek çok organizmada oldukça mutajenik olduğunu gösteren kanıtlar vardır. Örneğin insan erkek gamet hücrelerinde (yaklaşık 250 hücre bölünmesi geçirirler), yaklaşık 30 hücre bölünmesi geçiren dişi gamet hücrelerinden ortalama 6,5 kat daha fazla mutasyon gerçekleşir. Bu, her hücre bölünmesinde, yaklaşık  $1.8 \times 10^{-10}$  mutasyon gerçekleştiği anlamına gelmektedir ve bu mutasyonlar 2 yıl içinde dikkate değer bir sayıya ulaşacaktır [15].

DNA polimerazların çoğu yeni sentezlediği DNA zincirine eklediği her nükleotidi kontrol eder (proof reading). Bu işlemde hata oranı 10.000 bç için sadece 1'dir ve replikasyonun hata oranı  $1 \times 10^{-10}$ 'a kadar düşürülebilir. Hata okuma (proof reading) sırasında gözden kaçan yanlış eşleşmeler eğer hasar görmeyen nükleotitleri kapsıyorsa, yanlış eşleşme (Mismatch Repair, MMR) onarım yolağı tarafından kolaylıkla belirlenebilir. MMR yolağı lezyon oluşmadan önceki durumu güvenilir olarak yeniden şekillendirebilme yeteneğine sahiptir.

Yanlış eşleşmeler, heliksin geometrisinde belirlenebilen bozulmalar yaratır ve bu lezyon bölgesinde onarım enzimlerinin etkisini arttırır. Lezyon iki yolla tamir edilebilir: MMR, DNA hasarının tüm formları gibi, diploid organizmalarda homolog tamir sistemi ve rekombinasyon kullanılarak yanlış eşleşmelerin mutasyon yaratmasını önleyebilir [13]. MMR yeni sentezlenen DNA zincirinden yanlış eşleşen bölgelerin uzaklaştırılmasını ve kalıp zincirden DNA'nın yeniden sentezini gerçekleştirir. Bunu başarmak için, yeni sentezlenen zincirin ayırt edilmesinde görev yapacak bir sinyal gereklidir. Ancak bu sinyal geçicidir. Belirteçler bir kez yeni sentezlenen zinciri ayırt edip ortamdan uzaklaştırıldıklarında, tek zincir onarımı tam olarak güvenli bir şekilde çalışamaz. Fakat homolog bölgeler hasar belirlenebilir olduğu sürece hatanın düzeltilmesine yardımcı olabilir.

Son çalışmalarda translezyon sentezinde görevli (TLS) polimerazların mutasyon sürecindeki önemine odaklanılmıştır. Bunlar neredeyse tüm baz değişikliklerinin mutagenезine katılabilen hataya yatkın (error prone) polimerazlar olarak da adlandırılırlar. TLS polimerazlar, lezyonların karşısındaki nükleotitlerle birleşirler ancak replikasyondan sorumlu DNA polimerazlara kıyasla çok daha düşük doğrulukta çalışırlar. TLS polimerazlar (herhangi bir nedenle tıkanmış) replikasyon çatalında duraksamanın olduğu bölgede ilerlemeyi sağlamakla görevlidirler, ancak replikasyon sonrası ifade edilirler ve bundan dolayı replikasyonun durmasına neden olan lezyonların etrafındaki tek zincir boşluklarının onarımı esas fonksiyonlarıdır [16]. DNA tek zincirinde sadece tek

bazı kapsayan bir lezyon tipik olarak hasarlı bazın DNA'dan kesilmesi ve karşı zincirin kalıp olarak kullanılarak, yeniden sentezlenmesiyle tamir edilebilir. Öte yandan, birden fazla bazı kapsayan lezyonların (10-20 bç) tamiri daha zordur; çünkü DNA'nın küçük bir parçasının kesilmesi, hasarlı bir kalıptan DNA'nın yeniden sentezlenmesi ya da tamir süreci sırasında çift zincir kırıklarının oluşması riski vardır, bundan dolayı bir hata kümesinin tamir etkinliği tek bir hataya kıyasla daha düşüktür ve bu nedenle mutasyonların çoğunun birden çok baz çiftini kapsadığı görülmektedir [13].

#### **2.4. Mutasyona Yatkınlık**

Mutasyon oluşumu sürecini aydınlatmak için yapılan çalışmalar, mutasyonların genomun bazı bölgelerinde daha sık ortaya çıktığını göstermiştir. Çalışılan organizmaların neredeyse hepsinde GC bölgelerinde mutasyon oranı AT bölgelerinden daha yüksektir ve 5-metilsitozin (5-mC) deaminasyonunun bu duruma büyük katkıda bulunduğu düşünülmektedir. 5-metilsitozin amino grubunu kaybederek timine dönüştüğünde, T-G yanlış baz eşleşmesi oluşmuş olur. Sadece DNA ile su molekülleri arasında gerçekleşen ve katalizle oluşmayan bu deaminasyon olayı oldukça iyi anlaşılmiş bir süreçtir. Deaminasyonun sıcaklık ve pH'ya bağımlı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle organizmalar arasında değişkenlik göstermediği varsayılabilir. Fizyolojik koşullarda gerçekleştirilen in vitro deneylerde çift zincirli DNA'da 5-metilsitozinin deaminasyon hızının yaklaşık olarak  $1.8 \times 10^{-5}$  mutasyon/bölge/yıl olduğu gösterilmiştir [17].

Çoğu organizmada metilsitozin, sitozine metil grubunun enzimatik olarak eklenmesiyle oluşur. Ökaryotların çoğunda CpG bölgelerinde bulunan sitozinler gen ifadesini düzenlemek ve bazı prokaryotlarda restriksiyon endonüklezların ataklarını önlemek ya da yanlış eşleşme onarım (MMR) enzimlerini yönlendirmek için pek çok bölgeden metillenir. Bu şekilde oluşmuş 5-mC bölgeleri bazı bitki ve hayvan genomlarındaki mutasyonların temel kaynağıdır [8,18,19]. Çok hücreli organizmalarda 5-mC'nin kendiliğinden deaminasyonu, sitozinden timine



dönüşümlerin açıklanmasında daha yeterliyken (ki bu durumda C-T transisyonlarının oranı düşüktür), *E.coli* gibi mikroorganizmalarda ise daha az açıklayıcıdır (Çizelge 2.1).

Mutasyon oluşum mekanizmalarının ayrıntılı şekilde çalışıldığı canlılarda, özellikle insan, maya (*S.cerevisiae*) ve *E.coli* de, GC bölgelerinde daha fazla mutasyon görülmesinin depürinasyon ya da oksidatif stresten kaynaklanabileceğine dair kanıtlar vardır. Depürinasyon hücre içinde yürütülen kimyasal tepkimelerle ilişkili olarak sürekli meydana gelir ve oluşan apürinik bölge adenin ile bağ kurmak için güçlü bir eğilime sahiptir [20]. Çift zincirli DNA'daki apürinik bölgeler baz kesip çıkarma onarım (Base Exision Repair, BER) sistemi tarafından etkin şekilde onarılır. Ancak depürinasyon tek zincirli DNA'da gerçekleşiyse, tamamlayıcı zincirden gerekli bilgiyi alamayan BER, hasarlı bölgeyi yanlış bazı ekleyerek onarabilir ve böylece transisyon ya da tranversiyon tipi bir mutasyon oluşur. Bir insan hücresi her gün yaklaşık 18.000 depürinasyon olayından etkilenir [13], fakat bu olaylardan sadece bir milyonda biri mutasyon oluşumuna neden olur. Hücresel metabolizmanın bir sonucu olarak gelişen oksidatif hasara karşı guaninin diğer nükleotidlere kıyasla daha hassas olması [21], GC bölgelerinde daha sık mutasyon görülmesinin bir başka nedeni olabilir.

## 2.5. Mutasyon Hızı

Mutasyon hızı genellikle, "bir kuşakta ya da bir zaman biriminde, genomda mutasyon görülme sıklığı" şeklinde tanımlanır. DNA hataları tamir edilemediğinde mutasyonlar ortaya çıkar; fakat, mutasyon hızı DNA hasarının hızından basitçe belirlenemez. Eğer mutasyon hızı lezyon oluşum hızını yansıtıyorsa, mutasyon hızlarının fizyolojik olarak asgari düzeyde tutulduğu düşünülebilirdi. Ancak, DNA'da oluşan kimyasal hasarın yüksek sıcaklık etkisiyle arttığı gösterilmiş olmasına rağmen [21], yüksek sıcaklık koşullarında yaşayan bazı organizmaların (örneğin *Sulfolobus acidocaldarius* ya da *Thermus thermophilus*), mezofilik canlılara kıyasla (*E.coli*) daha düşük mutasyon hızına sahip oldukları belirlenmiştir [22,23]. Dolayısıyla genomda DNA hasarının oluşma hızının ve

DNA onarımı etkinliğinin farklı olması mutasyon hızları arasında farklılık yaratır [24,25].

Dört önemli ilişkinin mutasyon hızını etkilediği düşünülmektedir:

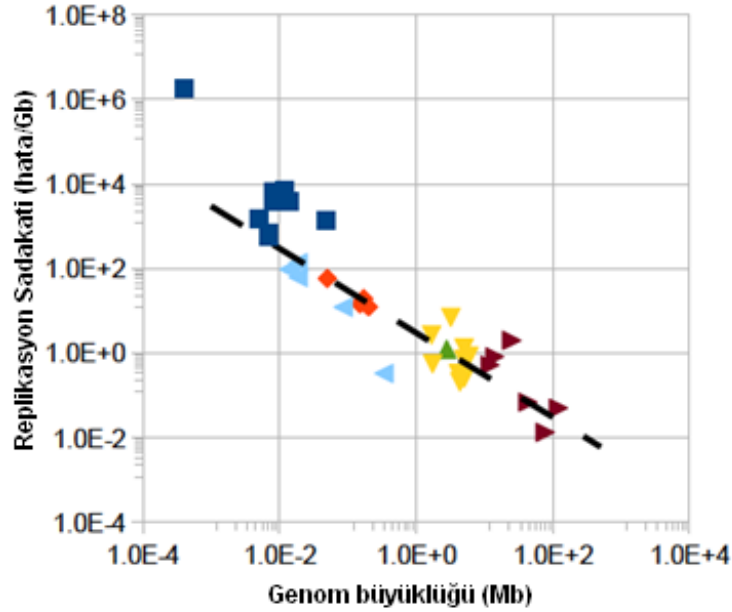
- Yüksek doğruluğa sahip replikasyon ve uyum başarısı arasındaki zıt pleitropi [26,27],
- Evrimleşebilme [2,28,29],
- Genetik sürüklenme [30,31],
- Fizyolojik ve çevresel varyasyon [32,33].

Evrim, aerobik solunum gibi DNA hasarı yaratabilecek süreçleri ve bu hasarı önleyecek, belirleyecek ya da onaracak kaynakların paylaşımını etkilemektedir. Yüksek doğrulukta çalışan homolog onarım sistemi ve daha mutajenik olan translezyon sentezi arasındaki aktivitenin ayarlanması buna örnek olarak verilebilir. Bazı durumlarda DNA kararlılık limitine ulaştığında, doğal seçilimin mutasyon hızını düşürmeme olasılığı vardır [3]. Organizmalar bir kere bu noktaya geldiklerinde, evrim DNA replikasyonunun doğruluğunu arttıramaz; çünkü DNA replikasyonunun doğruluğunun arttırılması için bir seçim baskısı yoktur. Ancak DNA'nın çevresel hasarın tüm çeşitlerinden korunması mümkün değildir [34].

Eğer mutasyon hızı üzerinde fizyolojik sınırlamalar varsa, tamir edilemeyecek spontan lezyonlar mutasyon oluşumuna, DNA replikasyonunun doğruluğunu düzenleyen içsel sınırlamalardan daha çok katkıda bulunmalıdır. DNA polimerazların doğruluğu, in vivo ve in vitro olarak enzimlerin hata okuma kapasiteleri arttırılarak geliştirilebilir [24,34,35]. İn vivo olarak bu enzimlerin doğruluğunun arttırılabilmesi, enzimlerin teorik olarak doğruluğun üst sınırında bulunmadıklarını gösterir. Ancak endojen lezyonların oluşum hızı isteğe bağlı olarak düşük seviyede gerçekleştirilemez. Çünkü lezyonların çoğu, örneğin depürinasyon, hasar oluşturan ajanlarla etkileşimden çok DNA'nın kimyasal kararsızlığından oluşur. Fiziksel sınırlamalar hipotezine göre, replikasyon doğruluğundaki evrimsel çeşitlilikten kaynaklı olarak organizmalar arasında DNA

hasarının endojen ve ekzojen hızı değişkendir. Ancak enzimin doğruluğundaki bu varyasyon endojen mutasyon hızı üzerinde ya etkisizdir ya da çok az etkiye sahiptir [36]. Bu nedenle mutasyonların çoğu tamir edilemeyen spontan hasardan kaynaklanmalıdır.

Fizyolojik sınırlamalar hipotezini destekleyen çeşitli kanıtlar mevcuttur. Çok hücreli organizmalarda artan mutasyon birikimi, canlıların nesiller boyunca çok sayıda eşeyssel (germ line) hücre bölünmesi (20-200) geçirmesinden dolayısıyla replikasyondan kaynaklanır. Ökaryotik replikasyonun doğruluğu, tek bir nesil (kuşak) yerine tek bir replikasyon olayı düşünüldüğünde, prokaryotik replikasyon doğruluğundan karakteristik olarak fazladır (Çizelge 2.1 ve Şekil 2.2). Her bir hücre bölünmesindeki mutasyon hızı, her bir nesildeki mutasyon hızından düşüktür; ancak bu istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p= 0.47$ ).



**Şekil 2.2.** Genom replikasyonunun doğruluğu ile genom büyüklüğü arasındaki ilişkinin gösterilmesi; RNA virüsleri (koyu mavi), organeller (açık mavi), DNA virüsleri (turuncu), öbakteriler (sarı), arkeler (yeşil) ve tek hücreli ökaryotlar (kırmızı) ile belirtilmiştir. [37] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

Ayrıca, organizmalar belli koşullar nedeniyle, mutasyon hızlarını yükseltebilir. Fakat en düşük mutasyon hızına sahip organizmalar DNA genomu için replikasyon doğruluğunun sınırına ulaşmıştır. Bu hipotez DNA'yı etkileyen sabit bir kimyasal hasara rağmen yüksek hatasızlığa sahip insan DNA polimerazları düşünüldüğünde daha makul görülebilir. Bir insan hücresi her gün yaklaşık 18000 depürinasyon olayından etkilenir [13], ancak bu olayların 1 milyonda 1'inin mutasyon oluşturduğu düşünülmektedir. DNA hasarının ekzojen kaynaklarının *E.coli*'de mutasyon hızını etkilediği, örneğin anaerobik koşullara karşı aerobik koşulların mutasyon hızını göreceli olarak arttırdığı açıktır [38].

Bazı organizmalar, örneğin Daphniid'ler, halofilik çevrelerde daha yüksek mutasyon hızına sahiptir [39]. Son olarak, metabolik hızın ve sıcaklığın hem bitkiler [32,40], hem de hayvanlarda [33] mutasyon hızıyla ilişkili olduğu durumlar vardır. Ancak bazı veriler pek çok taksonda fizyolojik olarak mutasyon hızlarının asgari düzeyde olmadığını güçlü bir şekilde işaret etmektedir.

Özetle, mutasyon hızları kesin olmayan tahminlerdir ve esasen mutasyonların belirlenmesi için kullanılan yöntemle bağlıdır. Mutasyon hızı iki şekilde tahmin edilebilir. Dolaylı yöntem, ortak atadan ayrılma tarihinden itibaren geçmiş olan kuşak sayısının, farklı türlerdeki homolog genler arasındaki baz çifti farklılıklarının sayısına oranlanmasına dayanır. Görece dolaysız yöntemde ise, bir laboratuvar soyunda ortaya çıkan mutasyonların sayısı, fenotipik etkileri ile ya da moleküler yöntemlerle belirlenebilir. Günümüzde ise DNA dizi analizi yoluyla mutasyonlar doğrudan belirlenebilmekte ve mutasyon hızı ölçülebilmektedir.

**Çizelge 2.1.** MA deneylerinden elde edilen mutasyon hızı hesaplamaları (G: Genom büyüklüğü,  $\mu$ : mutasyon/baz çifti, U: mutasyon/genom, Ts/Tv: transisyon/transversiyon, Ne: efektif populasyon büyüklüğü)

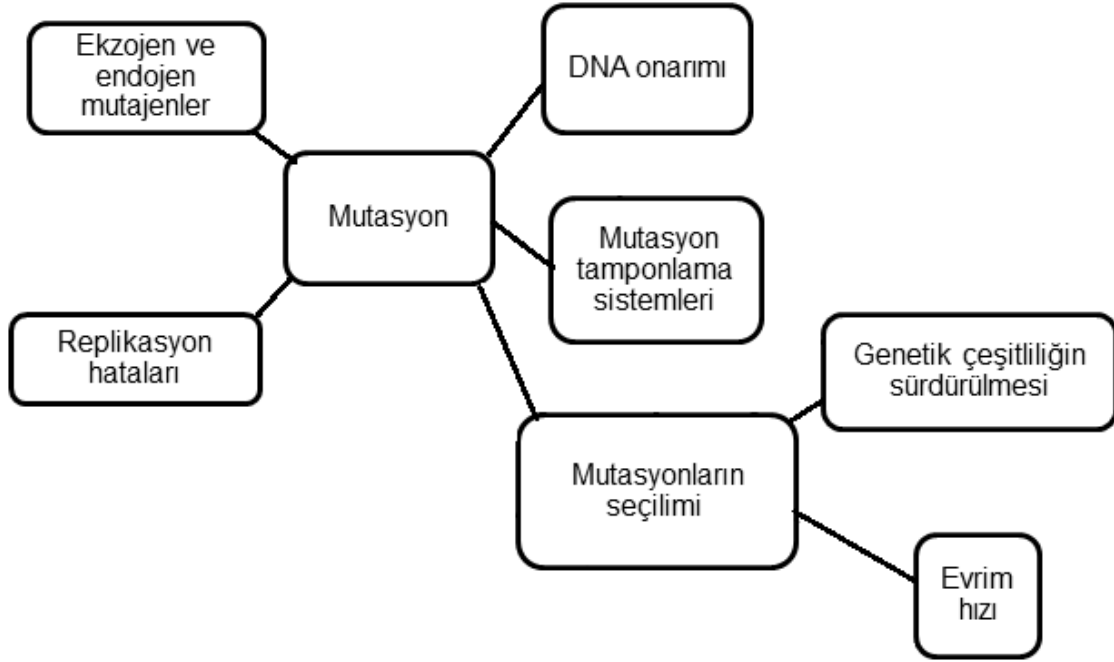
Organizma	G (Mb)	$\mu$ (bölünme)	$\mu$ (nesil)	$\mu$ (yıl)	U	Ts/Tv	GC-AT	Ne	Kaynak(lar)
<i>E.coli</i>	4.6	$1.99 \times 10^{-10}$	$1.99 \times 10^{-10}$	$5.5 \times 10^{-6}$	0.0009	?	?	$6.5 \times 10^8$	[41]
<i>B.subtilis</i>	4.5	$3.3 \times 10^{-10}$	$3.3 \times 10^{-10}$	$8.7 \times 10^{-6}$	0.0015	?	?	?	[42]
<i>P.tetraurelia</i>	47	$2 \times 10^{-11}$	$2 \times 10^{-11}$	$3 \times 10^{-8}$	0.0014	0.38	5	$1.2 \times 10^8$	[9]
<i>C.reinhardtii</i>	120	$5.1 \times 10^{-11}$	$5.1 \times 10^{-11}$	$7.5 \times 10^{-8}$	0.006	0.86	0.5	$3.1 \times 10^8$	[31]
<i>S.cerevisiae</i>	12	$3.3 \times 10^{-10}$	$3.3 \times 10^{-10}$	$1.4 \times 10^{-6}$	0.004	-	-	$8.5 \times 10^6$	[10]
<i>A. thaliana</i>	120	$2 \times 10^{-10}$	$7.1 \times 10^{-9}$	$1.7 \times 10^{-8}$	~ 1.8	2.4	3.6	$2 \times 10^5$	[8]
<i>D.melanogaster</i>	140	$2.1 \times 10^{-10}$	$3.5 \times 10^{-9}$	$1.8 \times 10^{-8}$	~ 1.0	-	-	-	[19], [43]
<i>C.elegans</i>	100	$3.3 \times 10^{-10}$	$2.7 \times 10^{-9}$	$2.8 \times 10^{-7}$	0.27	-	-	-	[18]

## 2.6. Mutasyonların Evrimsel Önemi

Genetik çeşitliliğin temel kaynağı mutasyondur. Mutasyonlar rasgele meydana gelir ve doğal seçim, adaptasyonla sonuçlanan bu rasgele varyasyon üzerinde çalışır. Mutasyonlar iki anlamda rastlantısaldır. Birincisi, bir mutasyonun gerçekleşme olasılığı tahmin edilebilmesine karşın, diploid/poliploid canlılarda, gen kopyalarından hangisinin mutasyona uğrayacağı tahmin edilememektedir. Mutasyonun kendiliğinden oluşum süreci de rastlantısaldır. İkincisi ve daha önemlisi belirli bir mutasyonun gerçekleşme şansının, canlının içinde yaşadığı ortamda mutasyonun yararlı olup olmayacağından etkilenmemesi anlamında da mutasyonlar rastlantısaldır. Bu durum canlının içinde bulunduğu çevrenin uyumsal mutasyonlara neden olmaması şeklinde yorumlanmaktadır [12].

Mutasyonların oluşma hızı, organizmanın fenotipik karakterleri gibi evrimsel sürecin konusudur, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi tarafından belirlenir. Mutagenезin altında yatan moleküler fenomenin karmaşıklığı, mutasyon hızını etkileyen evrimsel güçlerin de eşit derecede karmaşık olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 2.4). Mutasyon oranı genler ve hatta genler içindeki bölgeler arasında değişmektedir. Fakat fenotipik etkileri ile ölçüldüğünde, bir lokus yaklaşık olarak her bir kuşakta eşey hücresi başına  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  mutasyon geçirmektedir. Prokaryotlarda her bir baz çifti için ortalama mutasyon hızı, çoğunlukla farklı türlerin DNA dizilerini karşılaştıran dolaylı yöntemle dayanılarak yaklaşık  $10^{-10}$ - $10^{-11}$ , ökaryotlarda ise her eşeyli kuşak için  $10^{-9}$  olarak tahmin edilmektedir [44].

Haploid insan genomu ele alındığında ( $3.2 \times 10^9$  baz çifti), mutasyon hızı her kuşakta baz çifti başına  $14.81 \times 10^{-9}$  olarak hesaplanmıştır. Oluşan bu mutasyonların azami %5'inin zararlı etkilere sahip olduğu durumda, yaklaşık 6 kuşak (200 yıl) sonra bu mutasyonların, uyum başarısını %12-60 oranında düşüreceği öngörülebilmektedir [45].



**Şekil 2.3.** Mutasyon hızının evrimi için kontrol noktaları.

Buna göre 100.000 insanın bulunduğu bir popülasyonda, her bir kuşakta en az 160.000 yeni mutasyon ortaya çıkmaktadır. Araştırmacılar tarafından farklı canlılarda zigot hücresi genomunun işlevsel kısmında ortaya çıkan yeni baz çifti değişimlerinin sayısı *D.melanogaster*'de 0.14, *M.musculus*'da 0.9, *C.elegans*'da 0.036 olarak hesaplanmıştır [6].

Özetle, herhangi bir mutasyon nadir gerçekleşen bir durum olduğu halde, genom bütün olarak ele alındığında genetik çeşitliliğin değişim hızı kayda değerdir. Bununla beraber, mutasyon tek başına, bir karakterin bir durumdan diğerine evrimleşmesine neden olamaz, çünkü hızı oldukça düşüktür.

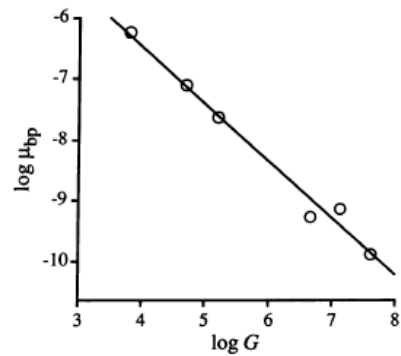
Mutasyon hızı; öncül mutajenik lezyonların ortaya çıkış hızına, lezyon oluşumu hızının evrimleşebilme yeteneği üzerine etkisine, lezyon onarımının azami etkinliğine, bu onarımın uyum başarısına etkisine, replikasyonun mutajenik lezyonlar üzerine etkisine ve mutasyonun ortalama seçilimsel sonucuna bağlı

olarak değişebilir. Örneğin büyük delesyonlar genellikle baz değişimlerinden daha zararlıdır [46]. Çift zincir kırıkları ise oksidatif hasarın pek çok formundan daha az etkin olarak onarılır. Dolayısıyla ortaya çıkan farklı mutasyon hızları evrimsel hipotezlerin bağımsız olarak test edilmesini sağlar.

### 2.6.1. Drake Kuralı

Drake kuralı, genom büyüklüğü ile mutasyon hızı arasında güçlü bir negatif ilişki olduğuna işaret eder. Drake 1991`de yayınladığı ünlü çalışmasında [47], mikroorganizmalarda kabaca her 300 genom replikasyonunda 1 mutasyon oluştuğu sonucuna varmıştır (Şekil 2.5). Bu çalışmasında Drake sadece üç mikroorganizma (*E. coli*, *N. crassa* ve *S. cerevisiae*) ve dört bakteriyofaja (M13,  $\lambda$ , T2 ve T4 fajları) ait verilerden yararlanmıştır. Bu öncü makaleyi izleyen diğer çalışmalarda, Drake`nin sonuçlarının desteklenmesiyle, prokaryotlar ve DNA`ya sahip virüsler için genom büyüklüğü ile mutasyon hızı arasında negatif bir ilişki olduğunu ortaya koyan “Drake kuralı” kabul edilmiştir. Bu kuraldan yola çıkarak, genom büyüklüğü hesaba katılmaksızın, genomda lezyon oluşum hızının sabit olması, fizyolojik sınırlamaların sonucu olarak açıklanabilir ve bu duruma neden olan evrimsel altyapı araştırılmalıdır.

Organism	Genome size, bp	Mutation rate Per bp ( $\mu_{bp}$ )
Bacteriophage M13	$6.41 \times 10^3$	$7.2 \times 10^{-7}$
Bacteriophage $\lambda$	$4.85 \times 10^4$	$7.7 \times 10^{-8}$
Bacteriophage T2	$1.60 \times 10^5$	$2.7 \times 10^{-8}$
Bacteriophage T4	$1.66 \times 10^5$	$2.0 \times 10^{-8}$
<i>E. coli</i>	$4.70 \times 10^6$	$4.1 \times 10^{-10}$
		$6.9 \times 10^{-10}$
<i>S. cerevisiae</i>	$1.38 \times 10^7$	$5.1 \times 10^{-10}$
		$2.8 \times 10^{-10}$
		$(7.9 \times 10^{-9})$
		$1.7 \times 10^{-10}$
<i>N. crassa</i>	$4.19 \times 10^7$	$4.5 \times 10^{-11}$
		$(4.6 \times 10^{-10})$
		$1.0 \times 10^{-10}$

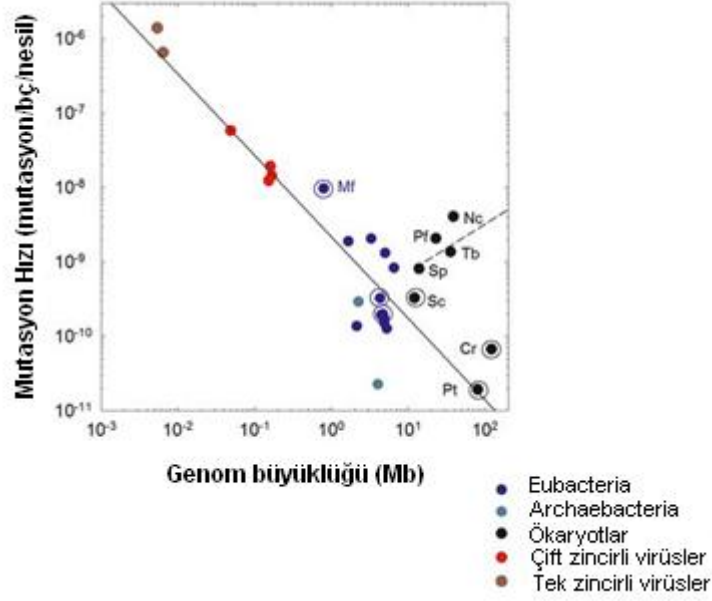


**Şekil 2.4.** Drake Kuralı. Genom büyüklüğünün bir fonksiyonu olarak ortalama mutasyon hızı. T2 ve T4 fajları grafiğe tek organizma olarak yansıtılmıştır. Çizelge ve grafik [47] numaralı kaynaktan alınmıştır.



Genom büyüklüğü ve mutasyon hızı arasında bu tip bir ilişki, ökaryotların çoğunun sahip olduğu büyük genomlar için potansiyel uyumsal (adaptif) bir açıklama olarak önerilmiştir [48]; ancak deneysel çalışmalarda bu tip bir ilişki belirlenmemiştir. Doğrusu, lezyonlar büyük genomlarda daha yüksek hızlarda oluşabilir [49]. Buna ek olarak, spontan DNA lezyonlarının çoğu, örneğin 5-mC deaminasyonları, her bir nükleotit için sabit bir hızda oluşur. Bundan dolayı, genom büyüklüğüne bakılmaksızın lezyonların sabit bir hızda nasıl ortaya çıktığını açıklamak zor görünmektedir; çünkü bu tip bir ilişkiyi destekleyen deneysel bir kanıt yoktur. Var olan deneysel veriler ise, genom büyüklüğü ile lezyon oluşumunun hızı arasında pozitif bir ilişki olduğuna işaret etmektedir [37]. Prokaryotlar ve ökaryotlardan elde edilen veriler tek bir grafiğe yansıtılırsa iki doğrunun yaklaşık 10 Mbç (genom büyüklüğünün prokaryotlar için kabaca üst sınırı ve aynı zamanda serbest yaşayışlı ökaryotlar için kabaca alt sınırı) civarında kesiştiği görülür. Şekil 2.6`da tek hücreli bir ökaryot olan *S. cerevisiae* (genom büyüklüğü 12.05 Mbç`dir) için mutasyon hızının da bu kesişim noktasının hemen yakınına denk düştüğü gösterilmiştir [31,37].

Drake kuralı`nın bakteriyofajlar, prokaryotlar ve bazı mikrobiyal ökaryotlar için geçerliliği hala açık değildir. Bu nedenle *E. coli* den daha küçük genoma sahip prokaryotlar ve mayadan daha büyük genoma sahip tek hücreli ökaryotlarda mutasyon hızları hesaplanmalı ve Drake kuralı sınanmalıdır. Bu amaçla kullanılacak en uygun yöntem MA deney sisteminin kullanılması ve elde edilen soy hatlarının tüm genom dizilerinin okunması yoluyla doğrudan mutasyon hızının hesaplanmasıdır.



**Şekil 2.5.** Genom büyüklüğü ile mutasyon hızı (mutasyon/bölge/hücre bölünmesi) arasındaki ilişkinin gösterilmesi ([31] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır, etrafı çevrilmiş noktalar tüm genom dizilemesinden elde edilen sonuçları göstermektedir, diğer veriler sadece bir ya da birkaç geni temel alan deneylerden elde edilmiştir. Cr, *Chlamydomonas reinhardtii*; Nc, *Neurospora crassa*; Pf, *Plasmodium falciparum*; Pt, *Paramecium tetraurelia*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Sp, *Schizosaccharomyces pombe*; Tb, *Trypanosoma brucei* ve prokaryot Mf, *Mesoplasma florum*).

### 2.6.2. Genetik Sürüklenme Engeli Hipotezi (Drift Barrier Hypothesis)

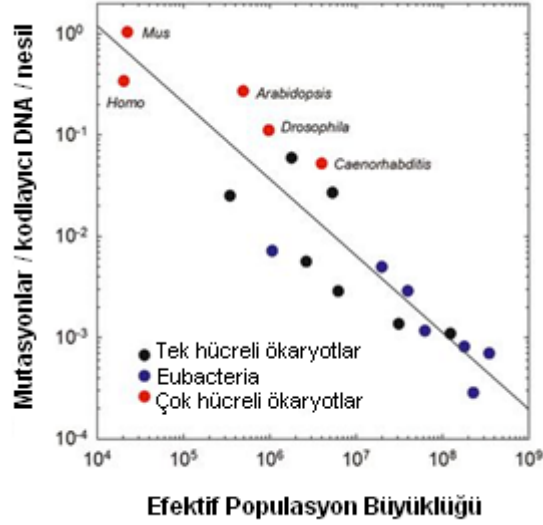
Doğal seçim, etkin popülasyon büyüklüğü ( $N_e$ ) ve genomun kodlayıcı DNA (etkin genom,  $G_e$ ) içeriğiyle negatif ilişkili olarak canlıların mutasyon hızını düşürmeye yönelir. Etkin popülasyon büyüklüğü küçüldükçe seçilimin etkisi azalır ve genetik sürüklenmenin etkisi artar. Genomun kodlayıcı bölgeleri ise zararlı mutasyonların hedefi olmalarından dolayı önemlidir. Genom büyüklüğündeki artışın bir sonucu olarak, etkin popülasyon büyüklüğü fazla olan bazı mikrobiyal ökaryotlar mutasyon hızını düşük tutmak üzere evrimleşmiştir. Ancak, çok hücreli ökaryotlar, etkin popülasyon büyüklüğünün azalmasından dolayı (tüm genomda), zararlı mutasyonların hızının yüksek olmasını tecrübe etmişlerdir. Günümüze kadar yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, toplam genom büyüklüğü ile mutasyon hızı (nükleotit/nesil) arasında güçlü bir

ilişki olmakla birlikte, ancak bu ilişkinin yönü çok hücreli ökaryotlar ve mikroorganizmalar karşılaştırıldığında dikkat çekecek derecede farklıdır [37]. DNA replikasyonunda görevli enzimlerin doğruluğunun ve DNA onarımı etkinliğinin yüksek olmasının bu farka yol açabileceği düşünülebilir.

Yaşam ağacı boyunca mutasyon hızında gözlenen varyasyonu açıklamaya yönelik bazı fikirler ortaya atılmıştır. İlk olarak, prokaryotlarla karşılaştırıldığında, bazı mikrobiyal ökaryotlarda gözlenen oldukça düşük mutasyon hızlarının varlığı, genetik sürüklenme engeli hipotezi ile uyumlu görünmektedir. Bazı mikrobiyal ökaryotlarda, tıpkı prokaryotlarda olduğu gibi, efektif populasyon büyüklüğü fazladır. Bu durum seçilimin etki edeceği genom dolayısıyla nükleotit sayısının artması anlamına gelir. Bir diğer nokta, Drake kuralı tüm taksonları kapsamayan ancak mikrobiyal türlerin bir alt kümesi için geçerli bir genelleme olabilir. Tek hücreli türler düşünüldüğünde, her hücre bölünmesinde kodlayıcı DNA'daki baz değişimlerinin toplam sayısı yaklaşık olarak  $10^{-4}$  ile  $10^{-1}$  arasındadır. Varyasyon aralığının bu derece geniş olması sadece efektif populasyon büyüklüğü ve efektif genom büyüklüğü hesaba katıldığında anlaşılır hale gelir [31].

Genetik sürüklenme engeli hipotezine göre, mutasyon hızının evrimi üzerinde, efektif popülasyon büyüklüğü ve kodlayıcı genomun büyüklüğü de etkilidir (Şekil 2.7). Bu ilişki  $\log_{10}(uGe) = 3.109 - 0.757 \log_{10}Ne$  formülüyle ifade edilebilir.

Eğer mutasyon hızının evriminde genetik sürüklenme bariyerinin varlığı gerçekse, bir karakterin evrimi için Drake kuralı'ndan daha açık bir genel açıklama ortaya çıkar. Bu hipotez, farklı filogenetik soylar için muhtemel olan evrimsel değişikliklerin mekanizmalarını ve bir evrimsel tempoyu dikte eder. Elde edilen sonuçlara göre, büyük Ge ve Ne değerine sahip mikrobiyal ökaryotlarda replikasyon doğruluğunun ve DNA onarımının daha hassas mekanizmalarla yürütüldüğü tahmin edilmektedir.



**Şekil 2.6.** Etkif populasyon büyüklüğü ( $N_e$ ) ve kodlayıcı DNA ile her hücre bölünmesinde gözlenen mutasyon hızı arasındaki ilişkinin gösterilmesi. Grafik [31] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

## 2.7. Mutasyon Hızının Hesaplanması

Yakın zamana kadar, mutasyon hızının hesaplanması oldukça zordu. Çalışmalar çoğunlukla birkaç geni temel alan fenotipik deneylerle sınırlıydı [6]. Ancak günümüzde tüm genom dizilemesinin yaygınlık kazanmasıyla mutasyon hızının doğrudan hesaplanabilmesi mümkündür. Mutasyon hızının hesaplanmasında kullanılan yöntemler ilk olarak Luria ve Delbrück tarafından tanımlanan ve daha sonra Lea ve Coulson tarafından genişletilen modellere dayanır [44,45].

Bu modellere göre, mutasyon biriktirme ve dalgalanma (fluctuation) analizi olmak üzere iki temel yöntemle mutasyon hızları hesaplanabilir. Üssel olarak üreyen bir populasyonda, daha önceden var olan mutantlarla beraber yeni mutantların ortaya çıkışı gözleniyorsa, bu durum her yeni nesilde mutantların sabit şekilde artışıyla sonuçlanır. Dolayısıyla mutantların oranında meydana gelen değişimin zamana karşı ölçülmesiyle mutasyon hızı belirlenebilir. Ancak populasyonun büyüklüğü ve her yeni nesilde yeni mutasyonların gözlenmesine olanak sağlayacak yeterlilikte olmalıdır [52]. Aralıksız bölünen bir hücre populasyonu için mutasyon hızı aşağıdaki eşitlikten hesaplanabilir [53]:

$$\mu = \left( \frac{r_2}{N_2} - \frac{r_1}{N_1} \right) \div \left[ \ln \left( \frac{N_2}{N_1} \right) \right] = (f_2 - f_1) \div (\ln N_2 - \ln N_1) ^*$$

Dalgalanma analizi ise az sayıdaki hücrenin çok sayıda paralel kültürler halinde çoğaltılmasıyla başlar. Gelişen kültürler doymunluk fazına ulaştıklarında her kültür seçici bir besiyerine aktarılır ve mutant bireylerin koloni oluşturmaları sağlanır. Paralel kültürlerde ortaya çıkan mutantların sayısı mutasyon hızının hesaplanmasında kullanılır [50]. Katı kültür ortamlarında mutantların sayısını doğrudan saptamak mümkündür. Ancak eğer sıvı kültürlerle çalışılıyorsa, mutasyon sayısı hücre yoğunluğu ve kültürün hacminden etkilenen bir parametredir. Mutasyon sayısını ( $m$ ) hesaplamaya yönelik çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Her yöntemin pozitif ve negatif yönleri vardır. Kullanıcının tercihi ve deney şartlarına bağlı olarak uygun yöntem seçilebilir. MSS maximum likelihood (MSS azami olabilirlik) yöntemi, bir deney sistemindeki sonuçların tamamını değerlendirebilmesi ve mutasyon hızlarının aralığının tamamında geçerli olması nedeniyle en başarılı yöntemdir [52]. Lea-Coulson'ın ürettiği fonksiyonu temel olarak geliştirilmiş bir algoritmadır [45,48]:

$$p_0 = e^{-m}; p_r = \frac{m}{r} \sum_{i=0}^{r-1} \frac{p_i}{(r-i+1)} \quad \dagger$$

Günümüze kadar pek çok araştırmacı mutasyon hızları için kalitatif hesaplamalar yaparak [6,49–52] ya da spontan mutasyon hızlarının ölçülmesi için kavramsal yöntemler [4,53,54] ortaya koyarak sürece katkıda bulunmuştur. Ancak biyoteknolojideki ilerlemeler ve buna paralel olarak biyoinformatik uygulamaların gelişmesiyle bu yöntemler ve hesaplamalar, en azından DNA dizisi seviyesinde spontan mutasyon hızlarının belirlenmesi bağlamında, oldukça hızlı bir şekilde kullanılamaz hale gelmiştir. Fakat, yıllar ve nesiller boyu emek vermiş

\*  $\mu$ : mutasyon hızı,  $r$ : bir kültürde gözlenen mutantların sayısı,  $N$ : hücre sayısı,  $f$ : mutant sıklığı ( $r/N$ ).

†  $p_0$ : mutantları içermeyen kültürün oranı,  $m$ : her kültürdeki mutasyonların sayısı,  $p_r$ :  $r$  ya da diğer mutantları içeren kültürlerin oranı,  $r$ : kültürde gözlenen mutantların sayısı.

araştışıcılaraya övgü olarak tez metninde bu yöntemlere dair kısa birer özet verilecektir (Tez çalışmasında kullanılan yöntem 2.7.6'da verilmiştir).

### **2.7.1. Mutasyonların Fenotipik Olarak Taranması**

Bu yöntem fenotipik olarak belirlenebilen mutantların taranmasıyla mutasyon hızını hesaplamak için geliştirilmiş basit ve açık bir yöntemdir [6], [60]. Bu yöntemin uygulanması geçmişte zordu; çünkü bizim genomdaki fonksiyonel bölgelerle ilgili bilgimiz sınırlıydı. Ancak pek çok canlı, özellikle de model organizmalar için tüm genom dizilerinin elde edilmesi bu sorunu ortadan kaldırmıştır. Bu yöntem insan [55–57], *Drosophila* [6] ve başka bazı türler [23,58] için kullanılmıştır. Ancak ökaryotlar için popüler hale gelmemiştir. Bu yöntem kullanıldığında, mutasyon hızı neredeyse kesinlikle eksik hesaplanır; çünkü bütün anlamsız (nonsense) mutasyonlar fenotipe yansımaz [6] veya bazı mutantlar kolaylıkla gözden kaçırılabilir. Bu yöntemde temel sorun, yapılan için zorluğuna karşın elde edilen spontan mutasyon hızının düşük ve neredeyse her zaman hatalı olmasıdır. Örneğin Yang ve arkadaşları yaklaşık olarak 900.000 sinek taramış ve 8 lokusta sadece 16 mutasyon bulmuştur [65].

### **2.7.2. Mutasyonların Uyum Başarısına Etkisinin Ölçülmesi**

Zararlı mutasyonların hızının hesaplanması için seğıilimin hiç olmadığı ya da etkisinin oldukça az olduğu bir laboratuvar popülasyonunda zamanla biriken mutasyonların uyum başarısı üzerine etkisinin ölçülmesi oldukça çok tercih edilen bir seğıenektir [60–65]. Bu yöntem kendileşmiş bir popülasyonla başlatılan sistemde düzinelerce nesil boyunca biriken çok sayıda mutasyonun uyum başarısı üzerine etkisini ölçmeyi hedefler. Ancak sistemin bazı aksaklıkları vardır ve uygulanması hala tartışmalıdır [55]. Kendileşmiş bir popülasyon yabancı bir popülasyondan beklenen şekilde mutasyon örüntülerini yansıtmayabilir. Ayrıca, homozigotluğun yüksek olması seğıilimi geniş ölçüde belirsizleştirir (örter) ve laboratuvarında popülasyonun bakımını zorlaştırır. Küçük ve rasgele eşleşen kendileşmemiş popülasyonlarla çalışmak bu sorunlardan kaçınmanın bir yoludur [72]. Bununla birlikte, laboratuvar koşulları altında seğıilimin tamamen etkisiz hale

gelmesinin prensip olarak olanaksızlığı, asgari düzeyde zararlı mutasyonların belirlenmesindeki zorluklar ve gevşetilmiş seçim altında çok sayıda neslin bulunduğu süreçte mutasyonun kendisinin mutasyon hızını etkilemesi olasılığını da kapsayan diğer sorunlardan kaçınılamaz. Bundan dolayı, bu yöntemi kullanan farklı araştırmacıların mutasyon hızları için farklı sonuçlar bulmaları şaşırtıcı değildir. Ayrıca, bu yöntem oldukça zaman alıcıdır ve kendileşmiş popülasyonun sabit bir şekilde özenli bakımını gerektirir. Çalışma süresince kontaminasyon önlenmeli ve uyum başarısı tekrar eden şekilde test edilmelidir [5].

### **2.7.3. Evrimleşme Hızının Nötral Bölgeler Kullanılarak Ölçülmesi**

Bu yöntem nötral evrim hızının mutasyon hızına eşit olmasına dayanır [2]. Bu basit ilişki pek çok kez spontan mutasyon hızının hesaplanmasında kullanılmıştır [6], [73]–[75]. Bu yöntemle bulunan sonuçlarda [70–72], spontan mutasyon hızlarının altında yatan esasın doğruluğu hala sorgulanmaktadır, çoğu nötral belirteçler olarak sinonim bölgeleri de hesaba katar [79]. Bu yöntemde iki sorun vardır. İlki, sinonim bölgelerin kullanılmasıdır; nötraliteyi genel diziden ayırmak için iyi bir neden olmalıdır. İkincisi, her bir bölgede saklanmış çok sayıda baz değişimini hesaplamanın zorluğu nedeniyle nötral evrimin hızı uzak türler arasında karşılaştırmalı olarak ölçülmemelidir ve ayrıca iki türün ayrılmasından itibaren geçen gerçek nesil sayısının bilinmediği unutulmamalıdır [5]. Nachman ve Crowell çalışmasında bu iki sorundan kaçınmak için insan ve şempanzeler arasındaki ortolog pseudogenleri seçmiştir ve sonuç olarak yaptıkları hesap hala bu yöntemin en iyi uygulamasıdır [73].

### **2.7.4. Kendileşen Popülasyonlarda Zararlı Mutasyonların Hızının Hesaplanması**

Dengedeki popülasyonların birçok özelliği mutasyon hızına bağlıdır. Özellikle, diploid canlılarda, DNA dizisi seviyesindeki nükleotid çeşitliliği,  $4Ne\mu$  (Ne: efektif popülasyon büyüklüğü,  $\mu$ : mutasyon hızıdır) formülünden basitçe hesaplanabilir [53,74–76]. Ancak, Ne bağımsız olarak bilinmeyeceği için bu formül  $\mu$  yerine  $Ne'$ 'nin hesaplanması için daha kullanışlıdır [53,77]. Ayrıca, aşırı derecede

kendileşen populasyonlarda (kendileşme depresyonu) elde edilen verilerden zararlı mutasyonların hızı hesaplanabilir. Bu zararlı mutasyonlar temel olarak son dönemde gerçekleşen mutasyonlardır ve genetik sürüklenmenin kuvvetine bağlı değildir [84].

### **2.7.5. Mutajen Uygulanması**

En basit yöntemlerden biri yapay mutajenlerin uygulanmasıdır. Eğer daha önceden spontan mutasyonların uyarılmış mutasyonlara oranı biliniyorsa, uyarılmış mutasyonların hızı spontan mutasyonların hızını belirlemede kullanılabilir. Mutajen uygulanması mutasyonların hızını büyük miktarda artırabilir ve bu da iş yükünü azaltabilir. Yapay mutagenез uzun zamandır mutantların elde edilmesinde ve mutasyonun kantitatif karakterler üzerine etkisinin hesaplanmasında kullanılmaktadır [43,79]. İki çalışmada bu yolla spontan mutasyon hızı hesaplanmıştır [80,81]. Bu yöntemin çözülebilecek olan sorunu mutajenin etkisini nicel olarak belirlemenin zorluğudur. Yöntemin esas sorunu ise, kullanılan mutajenin doğasının farklı tipte mutasyonlara yol açabilecek olmasıdır ki, bunların etkileri farklı olabilir. Bu nedenle bu yöntem tüm spontan mutasyonların hesaplanmasında iyi bir sonuç sağlamak için kullanılamaz [5].

### **2.7.6. Mutasyon biriktirme (Mutation Accumulation, MA) Soy Hatlarında Biriken Mutasyonların Doğrudan DNA Dizisinde Taranması**

Yakın zamana kadar, mutasyon hızının doğrudan hesaplanması çoğunlukla birkaç geni temel alan fenotipik deneylerin analizi ile sınırlıydı [6]. Ancak günümüzde mutasyon biriktirme (MA) deney sistemi ile yeni nesil dizileme tekniğinin beraber kullanılması yeni ve umut vaat eden bir teknolojidir. Böylece genomun kodlayıcı olan ya da kodlayıcı olmayan herhangi bir bölgesindeki herhangi bir mutasyon tek bazı etkilese dahi belirlenebilir. Bu yöntem kullanılarak spontan mutasyon hızının bazı tek hücreli ve çok hücreli canlılarda doğrudan DNA seviyesinde hesaplandığı çok sayıda çalışma yayınlanmıştır [8], [9], [11], [18], [19], [88], [89]. Yapılan ilk çalışmalarda bu yöntem, doğrudan dizileme yöntemi (Sanger yöntemi) ile beraber kullanılmış ve mutasyon hızı düşük olsa

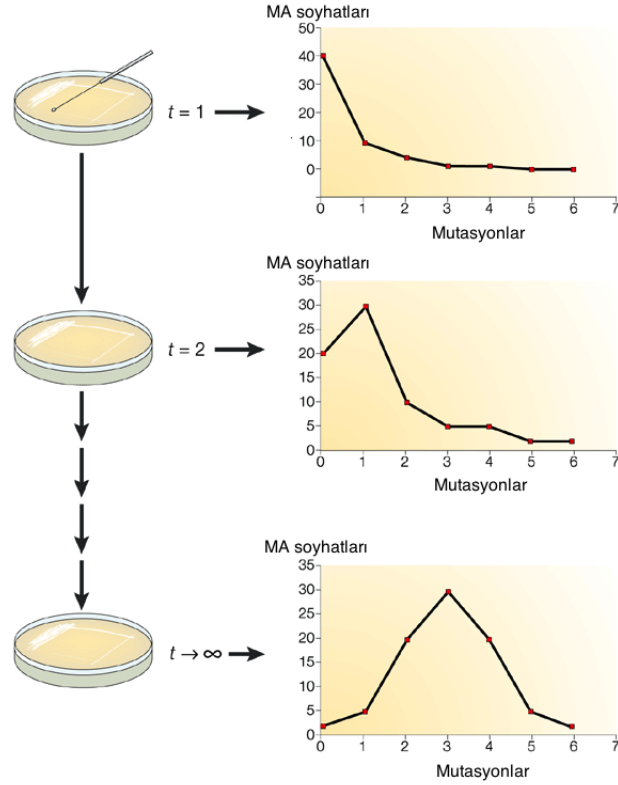


dahi, hesaplama için yeterince güvenli olduğu gösterilmiştir [19], [88].

Bu yöntemde, mutasyon hızının belirlenmesi için kullanılacak model organizmanın tek bir atasal hücresinden farklı soy hatları (line) oluşturulur ve bu soy hatları istenilen nesil sayısı kadar devam ettirilerek mutasyon biriktirme deneyi gerçekleştirilir. Bu deney sisteminin gücü, bağımsız MA soy hatlarının sayısına kritik derecede bağlıdır. Genel olarak kabul gören yaklaşım 25'den çok soy hattı oluşturulmasıdır.

MA deney sistemi, mutasyon hızını hesaplamakta kullanılan diğer yöntemlere göre çok sayıda avantaja sahiptir. Bu yöntemde, spontan mutasyonların, şiddetli derecede zararlı olmadıkları müddetçe, birikmeleri uyum başarısını etkilemez. Doğal seçilimin etkisinin tekrar eden populasyon darboğazları (population bottlenecks) ile hafifletilmesi ölümcül olmayan ancak zararlı olan mutasyonların rekabetle elenmesine engel olur ve doğal aleler gibi onların da genetik sürüklenme ile sabitlenmesine izin verir. Tekrarlayan populasyonlar tek bir ortak atayı paylaşırlar; böylece bu yöntem, tamamen aynı deneysel koşullar altında rasgele oluşan mutasyonların bağımsız olarak birikmesine izin verir (Şekil 2.3). Bu deney sistemi, çoğu evrimsel değişimlerle ilgili olan, genomda görülen delesyon tipi mutasyonların hızı ve büyüklüğü hakkında da bilgi sağlayabilir. Çoğu çalışmada mutasyonlar tiplerine ya da özgül bölgelere ayrılarak hızları hesaplanabilmektedir.

MA deneylerinden elde edilen sonuçlar türler arasında karşılaştırılabilir ve mutasyon hızının, yeni mutasyonların genomda dağılımının ve etkilerinin belirlenmesi, eşeylerin ve rekombinasyonun [90], DNA dizi çeşitliliği örüntülerinin, farklı rekombinasyon hızına sahip kromozomal bölgelerin zamanla değişiminin, diploidinin ve poliploidinin [84,85] evrimini ve küçük populasyonların devamlılığını [93] kapsayan, evrim ve populasyon genetiğinin önemli sorularını cevaplandırmada kullanılabilir.



**Şekil 2.7.** MA deney sisteminde seçilim etkisi olmaksızın mutasyonların birikmesi

## 2.8. Mutasyon Hızı, Moleküler Spektrumu ve Etkilerinin Belirlenmesinde Kullanılabilecek Model Organizmalar

Mutasyon biriktirme deneyleri çok sayıda soy hattını nesiller boyunca takip etmeyi gerektirmesinden dolayı, ancak uzun sürelerde gerçekleştirilebilir. Dolayısıyla bazı organizmalar bu çalışmalarda tercih edilen modellerken, bazı organizmalar ise kullanılamamaktadır. MA deneyleri için uygun bir model organizma küçük bir alanda büyük populasyonlar oluşturabilme yeteneğine sahip olmalıdır. Bu tip çalışmalarda, çok sayıda bireyin genomunun dizilenmesi ve karşılaştırılması sırasında oluşabilecek zorluklara karşı genellikle genomu nispeten küçük olan ve tüm genom dizisi bilinen organizmalar tercih edilmektedir.

Mutasyon birikim çalışmaları virüsler [94], bakteriler [31,41,94], mantarlar [88], bitkiler [8] ve hayvanları kapsayan [18] çok sayıda organizmada yapılmıştır.

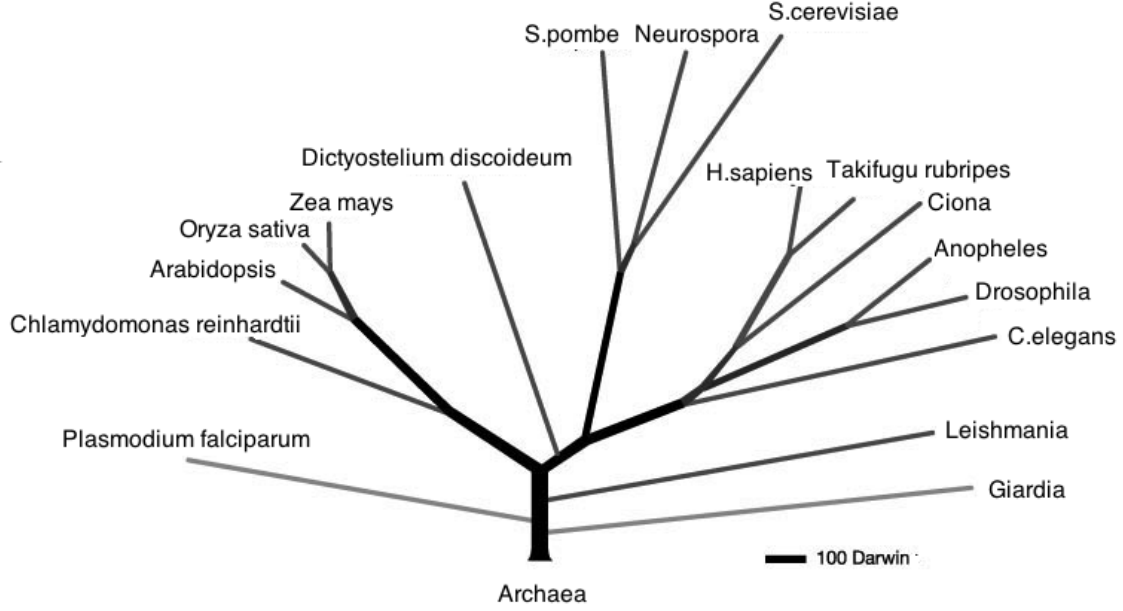
Bulunan sonuçlara göre özellikle tek hücreli ökaryotlarda ve bakterilerde mutasyon hızı, Drake kuralına uygun olarak, kabaca 0.003 mutasyon/genom/nesil`dir. Virüsler en yüksek mutasyon hızına sahip olup, DNA virüslerinde mutasyon hızı  $10^{-6}$ - $10^{-8}$  mutasyon/baz/nesil; RNA virüslerinde hesaplanan mutasyon hızı ise  $10^{-3}$ - $10^{-5}$  mutasyon/baz/nesil`dir. Ökaryotik canlılar arasında, *A.thaliana*  $7 \times 10^{-9}$  ile en yüksek hıza sahiptir [8], [70]. En düşük hız ise *Paramecium tetraurelia`* da [9] gözlenmiştir:  $1.94 \times 10^{-11}$  (Çizelge 2.1). İnsanlar için mutasyon hızı  $\sim 2.5 \times 10^{-8}$  mutasyon/baz/nesil olarak hesaplanmış olmakla birlikte [73], daha sonra tüm genom dizilemesinin kullanılmasıyla bu değer yaşlaşık  $1.1 \times 10^{-8}$  mutasyon/bölge/nesil olarak düzeltilmiştir [96].

Mitokondriyal sonuçlar ise farklı organizmalar arasında daha sabit bir durum sergiler. En yüksek hız *Daphnia pulex`*in, eşeyli soylarında  $1.37 \times 10^{-7}$  ve eşeysiz soylarında  $1.73 \times 10^{-7}$  olarak hesaplanmıştır [97]. En düşük hız ise *C.elegans`*a aittir [18]:  $9.7 \times 10^{-8}$ ; *S.cerevisiae`*de  $1.29 \times 10^{-8}$  [88], *P.tetraurelia`*da  $6.96 \times 10^{-8}$  [9] ve *D.discoideum`*da  $6.76 \times 10^{-9}$  [11] mutasyon/bölge/hücre bölünmesi olarak bulunmuştur.

## **2.9. Dictyostelium discoideum**

Amipler tüm ökaryotların paylaştığı son ortak atadan ayrılan en erken dallardan biri olması bakımından önemlidir ve Opisthokontlarla (hayvan ve fungus) yakından ilişkilidirler (Şekil 2.8). Günümüzde ökaryotların yaşayan dallarından her biri, atasal genomun soya özgül gen duplikasyonu, ıraksama (divergens) ve delesyonla uyum sağlamasına (adaptasyon) ve farklı yollarda biçimlendirilmesine bir örnek sağlar. Amipler tek hücreli ökaryotları (örneğin *Acanthamoeba castellanı*), zorunlu parazitik amipleri (örneğin *Entamoeba histolytica*), gerçek cıvık mantarları (örn, *Physarum polycephalum*) ve sosyal amipleri (ya da Dictyostelidleri) de kapsayan filogenetik olarak oldukça çeşitli bir gruptur. Genom ölçeğinde yapılan çalışmalarla amiplerin monofiletik bir grup olduğu doğrulanmış

ve temel amip soy hatları arasındaki filogenetik ilişkiler aydınlatılmıştır [97–99]. Ancak, pek çoğunun genomu henüz detaylı olarak incelenmemiştir.



**Şekil 2.8.** Proteom temelli ökaryotik filogeni (Dalların göreceli uzunlukları Darwin birimi olarak verilmiştir. Örneğin, *S.cerevisiae* ile *H.sapiens* karşılaştırmasında 1 Darwin birimi 1/2000 oranında uzaklığı belirtmektedir. Şekil, [101] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

Sosyal amip olarak da adlandırılan *Dictyostelium discoideum* geçtiğimiz 50 yılda oldukça fazla çalışılmış bir organizmadır ve bu çalışmalar, hücresel hareket, sinyal ve hücreler arası etkileşim mekanizmalarının anlaşılmasına büyük katkıda bulunmuştur [98]. Örneğin *D. discoideum* ile yapılan çalışmalarda, bir ökaryotik hücre kemo-atraktanı ve bir hücre-hücre adezyon proteini ilk defa tanımlanmıştır [102]. *Dictyostelium discoideum* aynı zamanda tüm genomu dizilenen ilk serbest yaşayan protozodur [101].

*Dictyostelium discoideum*, kuzey yarımkürenin ılıman bölgelerinde bolca bulunan bir toprak amibidir. *Dictyostelium discoideum*'un doğal habitatu toprağın organik

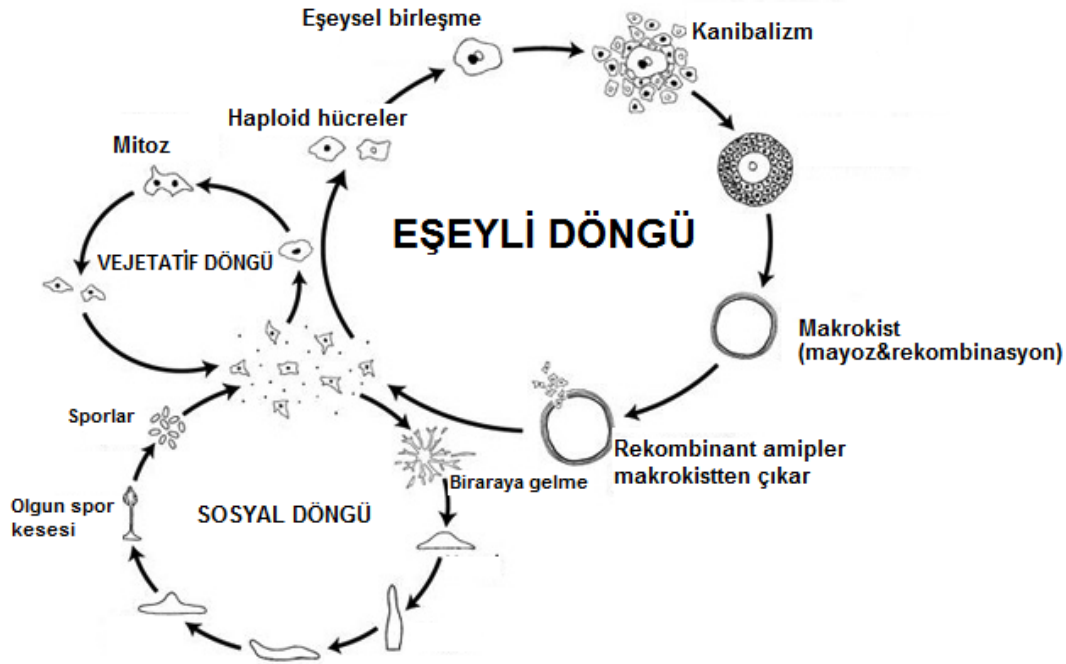
maddece zengin olan üst tabakasıdır. Temel besin kaynağı bakteriler ve mayalardır. Habitatında yeterli besin olduğu sürece, tek hücreli olarak yaşar.

Besin sıkıntısı başladığında sorus ve sap hücreleri olmak üzere iki temel hücre tipinden oluşan çok hücreli agregatlar oluştururlar. Bu çok hücreli organizma 10.000-100.000 hücre içerir; ancak kimi zaman hücre sayısının 2.000.000'a kadar artabileceği rapor edilmiştir [101].

*Dictyostelium discoideum* tek hücreli ve çok hücreli yaşam formları arasında dönüşüm yapabilme yeteneği ile canlılar dünyasında bir istisnadır. Homojen bir hücre popülasyonundan değişik hücre tiplerinin farklılaşmasını yönlendirecek mekanizmaları yönetecek şekilde evrilmiştir. Tek hücreli canlıdan, çok hücreli yapıya geçişte, farklı hücre tipleri tek bir yapıyı (spor kesesi -fruiting body-) oluşturmak için düzenli şekilde bir araya gelir ve bir orkestra gibi çalışır. *Dictyoselium*'da bu mekanizmalar için gerekli olan genlerin çoğunun, aynı zamanda Metazoa'da da bulunduğu saptanmıştır ve bu genler, gelişimin farklı dönemlerinde kullanılmak üzere evrim süresince biçimlendirilmiştir [101].

*D.discoideum*, vejetatif, agregat, göç ve geçiş olarak adlandırılan 4 aşamadan oluşan bir hayat döngüsüne sahiptir (Şekil 2.9). Hayat döngüsü görece kısadır, fakat tüm aşamalar gözlenebilir.

Hayat döngüsünün basitliği genetik, hücresel ve biyokimyasal süreçler üzerine yapılacak çalışmalar için *D.discoideum*'u uygun bir model organizma yapar. Literatürde yer alan çalışmalarda hücre farklılaşması, kemotaksis ve programlı hücre ölümü gibi normal hücresel süreçlerin araştırılmasında kullanılmıştır. Ayrıca sinyal iletimi, fagositoz, hücrelerin ayrıştırılması, hareket gibi konularda da kullanılmaktadır.



Şekil 2.9. *D. discoideum*'un hayat döngüsü

### 2.9.1. *Dictyostelium discoideum*'un Genomu

*D. discoideum*'un genom dizisi 2005'de yayınlanmıştır [101]. Genom büyüklüğü yaklaşık 34 Mb'dır; her biri 4 ile 7 Mb büyüklüğünde DNA içeren 6 kromozomu vardır (Çizelge 2.2). Genomun 8.000 ile 10.000 arasında gen içerdiği tahmin edilmektedir. Bilinen genlerinin çoğu, omurgalı türleriyle yüksek oranda benzer diziler içerir. Genom AT'ce zengindir (%77.57) ve bazı bölgelerde görülen GC tekrarlarının dışında, genel olarak değişmeyen bir bileşime sahiptir. CpG sayısı oldukça düşüktür; ancak daha önce düşünülenin aksine sitozin metilasyonu mekanizması vardır ve bu mekanizmanın gelişimsel role sahip olduğu belirlenmiştir [100,102–104].

*D. discoideum* genomu diğer genomlarla karşılaştırıldığında, genomun %11'ini kapsayan, basit dizi tekrarlarının (Simple Sequence Repeats, SSR) çokluğu dikkat çekicidir. Kodlamayan bölgelerin %6.4'ü, iki ya da daha uzun motiflerin tekrarlarından oluşur ve ortalama olarak her 392 bç'de bir tekrar bölgesi bulunur. Üç ila altı bazdan oluşan tekrar birimleri, diğer tekrar birimlerine kıyasla daha

fazla görülür. Tüm dizisi bilinen diğer genomların çoğunda ise dinükleotit tekrarları yaygındır. Homopolimer alanlara da sıkça rastlanır, bu alanlar kodlamayan dizilerin %16'sını kapsar. Homopolimer alanların ve kodlamayan bölgelerde bulunan SSR'lerin baz bileşimi etraflarını saran diziden bile daha fazla AT eğilimine sahiptir (%99.2 AT içerir). SSR dizileri yüksek mutasyon hızına sahip olmaları ve replikasyon sırasında yanlış hizalama/kayma neticesinde gelişen mutasyonlarla farklı tekrar sayılarına ulaşmaları nedeniyle seçim tarafından engellenmedikçe genomda birikebilirler [106]. SSR dizileri çoğunlukla işlev görmeyen "junk" DNA olarak düşünölmelerine rağmen, bazılarının işlevsel olduğu bilinmektedir [107].

*D. discoideum*'dan evrimsel olarak azımsanmayacak derecede uzak olmasına rağmen, *Dictyostelium purpureum* genomunda da SSR dizilerinin yoğunluğu kayda değerdir. *D. purpureum* genomunda SSR dizileri %4.4 oranında bulunur [108]. *D. discoideum* genomunda 100 bç uzunluğu aşan tekrar bölgelerinin sayısı 1436 iken, *D. purpureum* genomunda bu sayı sadece 54 adettir. Dinükleotit tekrarları, diğer türlerin genomlarında en çok rastlanan ortak tekrar iken, her iki dictyostelid genomunda ise nispeten nadir görülür [100,107].

*D. discoideum* genomunda bir diğer dikkat çekici özellik SSR'lerin aynı zamanda protein kodlayan dizilerde de çok bulunmasıdır. Ekzonlarda ortalama her 724 bç'de bir görölen bu SSR'lerin protein içeriğiyle ilişkili olabileceği düşünölmektedir [101]. Ekzonlarda rastlanan uzun trinükleotit tekrarları, proteinlerin içeriğinde homopolimer amino asit dizilerinin görölmesine neden olur. Proteinlerde en çok rastlanan homopolimer amino asit tekrarları asparajin ve glutaminden oluşur. *D. discoideum* genomunun dizilemesi tamamlandığında varlığı öngörölen 13541 genin 2091'nde ardışık tekrar dizilerinin olduğu ve bu alanlardan bazılarının çoklu halde bulunduğu rapor edilmiştir [101]. Diğer ökaryotik genomlarda da proteinler amino asit tekrarları içermektedir ancak bu, *D. discoideum* genomuna kıyasla daha az rastlanan bir durumdur [109].

*D.discoideum*'un genomu, hareketli genetik (transposable) elementler açısından da zengindir [110], [111]. Yapılan çalışmalara göre aynı tipteki elementlerin kümelendiği ve tercihen benzer yerleşik elementler arasına eklendikleri düşünülmektedir. Ancak bu elementlerden hiçbirinin insersiyon için özgül bir hedefi tercih ettiği henüz gösterilmemiştir. Uzun terminal tekrar (long terminal repeat, LTR) içermeyen retrotranspozonların sıklıkla tRNA genlerinin yakınına eklendiği gösterilmiş olmakla birlikte, insersiyon hedefi olan özgül diziler tanımlanmamıştır [101].

*D.discoideum* genomunda 402 adet tRNA geni belirlenmiştir, bu sayı ökaryotik spektrumun üst limitindedir. Örneğin, *Plasmodium falciparum*'da 43, *Drosophila melanogaster*'de 284, *Homo sapiens*'de 496 adet tRNA geni vardır. Alanin amino asidini kodlayan, *D.discoideum* genomu için nadir, GCG kodonu dışında, her kodon dejenere olabilir. Ayrıca, TGAN-NGAN dizisi selenosistein insersiyon dizisi (Selenocysteine insertion sequence, SECIS) olarak görev yaparak, bu dizinin bulunduğu mRNA'da, normalde "dur" kodonu olarak işlev gören UGA dizisinin selenosistein kodonu olarak okunmasını sağlar (normalde serin amino asidini taşıyan tRNA modifiye olarak selenosistein taşır). *D.discoideum*'da selenosistein içeren iki hipotetik protein vardır. Mitokondri genomunda ise esansiyel tRNA'lardan bazılarının olmadığı gösterilmiştir. Bu durum *D.discoideum*'un bir diğer amip türü olan *Acanthamoeba castellanii* ile paylaştığı bir özelliktir [111,112]. Bu nedenle, çekirdek genomundan kodlanan tRNA'ların en azından bir kısmının (valin, treonin, asparajin, glisin tRNA'ları ile arjininin bir ve serinin iki tRNA'sı) mitokondriye taşındığı düşünülmektedir.

tRNA genlerinin küme olarak dağılımı değişmez görünmesine rağmen, daha detaylı incelendiğinde bu genlerinin organizasyonu dikkat çekicidir. Yirmi kb ya da daha sık rastlanan haliyle 5 kb olarak bölünmüş ve yaklaşık olarak %20'si tamamen aynı antikodonlarla ikililer ya da üçlüler halindedir (ve genellikle %100 dizi benzerliği görülür). Genomda bu tip gruplardan 41 adet bulunur ve rasgele dağılım nadirdir. Bu örüntü tüm genomu dizilenen organizmalardan sadece



*D. discoideum*'da görülür ve son dönemde genomda gerçekleşen duplikasyonların neticesinde ortaya çıkmış olabileceği öne sürülmektedir. Ancak, tRNA ikilileri ardışık olarak yakınlaşan ve uzaklaşan oryantasyonlarda ve değişken sıklıkta bulunur, bu nedenle tek düze bir duplikasyon mekanizması ya da genellikle komşu dizilere yayılan duplikasyonun olmadığı düşünülmektedir [101].

*Dictyostelium*'da ribozomal RNA genleri 88 kb'lık palindromik ekstrakromozomal bir element olarak bulunur ve her bir genomda bu elementin 100 kopyası vardır [114]. Ayrıca kromozomal kopyaların varlığına dair kanıtlar da vardır. Kromozomlardan en azından dört tanesi üzerinde yerleşmiş merkezi 3.2 kb'lık bölge [114] vardır ve kromozom 2 hem kısmi rDNA dizisi taşır hem de bir adet 5S rRNA pseudogeni içerir [111], [115]. Bu ekstrakromozomal kopyaların nasıl oluşturulduğunu açıklayan bir transkripsiyon mekanizması (saç tokası oluşumu ve ikinci zincir sentezi) önerilmektedir. Bu mekanizma ayrıca palindromun iki ucu arasında dizi varyasyonunun olmamasından sorumlu olabilir [101].

Sentromerler hücre bölünmesi sırasında ökaryotik kromozomları hareket ettirir ancak yapısal ve organizasyon açısından çeşitlidirler [116] ve bu tanımlanmalarını güçleştirir. Her *Dictyostelium* kromozomu, DIRS (Dictyostelium Intermediate Repeat Sequence) elementlerinde, uçlardan birine yakın, tekrar bölgelerince zengin tek bir küme taşır. Dikkat çekici şekilde yapısal tutarlılığı nedeniyle bu kümelerin sentromerler olarak işlev görebileceği önerilmektedir [116,117]. *Dictyostelium* hücrelerinde, mitoz sırasında kondanse haldeki kromozomlarda DIRS elementleri için hazırlanan propların her kromozomun sadece bir ucuna hibridize olduğu gösterilmiştir. Diğer türlerde ise, DIRS benzeri elementler kromozom boyunca daha tekdüze biçimde dağılır [119] ve *Dictyostelium* kromozomlarında bunların dağılımının sınırlı olmasının fonksiyonel bir öneminin olabileceği öne sürülür [101].

**Çizelge 2.2.** *Dictyostelium discoideum* kromozomlarına ve mitokondri genomuna ait özellikler [120].

	<b>Büyükük (Mb)</b>	<b>GC içeriği (%)</b>	<b>Protein sayısı</b>	<b>rRNA genleri</b>	<b>tRNA genleri</b>	<b>Diğer RNA genleri</b>	<b>Gen sayısı</b>	<b>Pseudogen sayısı</b>
Kromozom 1	4,92	22,8	1.925	-	79	9	2.019	13
Kromozom 2	8,48	22,2	3.285	-	91	15	3.431	46
Kromozom 3	6,36	22,3	2.477	-	79	14	2.604	39
Kromozom 4	5,45	22,2	2.105	-	33	25	2.183	23
Kromozom 5	5,13	22,5	1.959	-	33	14	2.030	25
Kromozom 6	3,6	22,9	1.392	-	87	4	1.498	17
<b>Toplam</b>	<b>34,13</b>	<b>22,4</b>	<b>13.267</b>	<b>-</b>	<b>402</b>	<b>81</b>	<b>13.892</b>	<b>163</b>
<b>mtDNA</b>	<b>0,055564</b>	<b>27,4</b>	<b>42</b>	<b>2</b>	<b>18</b>	<b>1</b>	<b>63</b>	<b>-</b>

*D.discoideum* genomunda GT`ce zengin telomer benzeri motifler tanımlanamamıştır ancak kromozomların GA`ce zengin aynı tekrar motifi (ekstrakromozomal rDNA elementlerini kapatan) ile sonlandığı düşünülmektedir [118]. İçerdikleri özgül tekrar dizileri nedeniyle *Dictyostelium*'da kromozom uçlarında yer alan telomer yapısında rDNA benzeri elementlerin olduğu düşünülmektedir [101].

### **2.9.2. *Dictyostelium discoideum* Proteomunun İçeriği ve Organizasyonu**

*Dictyostelium discoideum* genom konsorsiyumunun internet adresi olan [www.dictpbase.org](http://www.dictpbase.org) veritabanında yer alan (en son 2 Mart 2015 tarihinde güncellenmiş) verilere göre, *Dictyostelium discoideum* genomunda 13,267 protein tanımlanmıştır ve bunların %97.8'si (11,987) için güvenilir modeller oluşturulmuştur [121]. 155,036 EST tanımlanmış ve 6801 adet genin EST içerdiği bulunmuştur. Genomun %62'si protein kodlamaktadır. *Dictyostelium* sahip olduğu gen sayısı bakımından tek hücreli ökaryotlardan ziyade çok hücreli organizmalara yakın görünmektedir (Çizelge 2.3). Gen yapısı incelendiğinde intronların kısa ve az sayıda, intergenik bölgelerin ise küçük olduğu görülmektedir. Genler genom boyunca neredeyse tek düze dağılmıştır. İfade örüntüsüyle ilişkili olarak genlerin kümelenmediği alanlar yoktur; ancak gelişimin farklı dönemlerinde ifade olan genler kümelenmiştir [101].

Genomun AT`ce zengin olması sadece sinonim kodonların seçimini değil aynı zamanda proteinlerdeki amino asit bileşimini de yansıtır. Genellikle WWN (W, A ya da T nükleotitlerini, N ise herhangi bir nükleotiti göstermektedir) kodonlarının şifrelediği amino asitler (Asn, Lys, Ile, Tyr ve Phe) *Dictyostelium* proteinlerinde insandaki homologlarına kıyasla daha yaygındır [101].

Üç ve üçün katları şeklindeki ardışık nükleotit tekrarları *Dictyostelium* ekzonlarında olağandışı şekilde çok bulunur ve doğal olarak amino asitlerin tekrarlayan dizilerine karşılık gelir. Öngörülen proteinler arasında 9582 SSR (iki ya da daha fazla amino asidi kapsayan peşpeşe tekrarlar) bölgesi bulunur.

Bunlardan çoğu dikkat çekecek ölçüde (en az 20 rezidü) poliasparajin ve poliglutamin rezidülerinden oluşan alanlardır. Tahmin edilen proteinlerin 2091 tanesinde bu durum görülür. Ayrıca QLQLQQQQQQQLQLQQ gibi az karmaşık bölgeler en az 15 rezidü ile 2379 proteinde bulunur ve sadece iki amino asit içerirler. Toplamda basit dizi tekrarları tahmin edilen proteinlerin %34'ünde bulunur ve tüm amino asitlerin %2.2'sini kodlamaktadır [101].

Bu tekrarların nükleotit genişlemesi sırasında ortaya çıktığı ve protein seviyesinde seçildiği düşünülmektedir. Protein seviyesinde seçilimin kanıtı olarak, herhangi bir üç nükleotit tekrarının üç okuma çerçevesinden sadece birinin baskın olması verilebilir. Örneğin, ..... ACAACAACAACA.... tekrarı genellikle polithreonin ([ACA]<sub>n</sub>) ya da poliasparajin ([AAC]<sub>n</sub>) yerine genellikle poliglutamin ([CAA]<sub>n</sub>) olarak translasyona uğrar. Bir başka kanıt ise trinükleotit tekrarlarının çoğunun görünüşte sadece sinonim kodonlar üretmek üzere mutasyona uğramasından elde edilir. Ayrıca, SSR bölgelerinin dağılımı rasgele değildir: proteinlerin çoğu ya bu özelliğe sahip değildir (%66) veya iki ya da daha fazla olmak üzere bu bölgelere sahiptir (%18). Buna göre sadece bazı proteinlerin bu durumu tolere ettiği önerilebilir. Poliasparajin ya da poliglutamin içeren proteinler, protein kinazlarda, lipid kinazlarda, transkripsiyon faktörlerinde, RNA helikazlarda ve splayozom gibi mRNA ile ilişkili proteinlerde çokça görülür. Protein kinazlar ve transkripsiyon faktörleri gibi *S.cerevisiae*'nin poliasparajin ya da poliglutamin içeren proteinlerinde de durum benzerdir. Dolayısıyla bu durumun proteinin fonksiyonu ile ilişkili olabileceği düşünülebilir [101].

Sonuç olarak, *Dictyostelium* sahip olduğu proteom ile hücrel ve gelişimsel biyoloji için yeni bir bakış açısı sağlayabilecek bir model organizmadır. Bir sistem seviyesinde, *Dictyostelium* mayalardan yüksek karmaşıklık seviyesindedir; ancak yüksek bitki ya da hayvanlardan daha basittir. Bundan dolayı, daha karmaşık sistemlerde çalışılması zor olan kontrol ağlarının yüksek çözünürlüklü moleküler analizlerini olanaklı kılabilir ve yüksek canlılar tarafından kullanılan düzenleyici stratejilerin öngörülmesini sağlayabilir [120–122]. Aynı zamanda hastalık

**Çizelge 2.3.** *Dictyostelium discoideum* ile bazı ökaryotik canlılara ait genom özelliklerinin karşılaştırılması [125].

<b>Özellik</b>	<b><i>D.discoideum</i></b>	<b><i>P.falciparum</i></b>	<b><i>S.cerevisiae</i></b>	<b><i>A.thaliana</i></b>	<b><i>D.melanogaster</i></b>	<b><i>C.elegans</i></b>	<b><i>H. sapiens</i></b>
Genom büyüklüğü (Mb)	34.111	23.264	12.157	135.670	168.736	103.022	3.381.944
Kromozom sayısı	6	14	16	5	4	6	23
Gen sayısı	13.212	5.429	6.692	27.416	15.682	20.447	20.364
Ort. gen uzunluğu(bç)	1.756	2.534	1.428	2.036	1.997	2.991	27.000
Ort. kodlayıcı bölge büyüklüğü (amino asit)	518	761	475	437	538	435	509
Intron içeren gen (%)	69	54	5	79	38	5	85
Ort. intron büyüklüğü(bç)	146	179	-	170	-	270	3.365
Ort. intron sayısı (bölünmüş genlerde)	1,9	2,6	1	5,4	4	5	8,1
Kodonlarda AT biyası	86	83	62	57	50	64	41
Ortalama AT yüzdesi (ekzonlarda)	73	76	72	72	45	58	55
Ortalama AT yüzdesi (intronlarda)	88	87	51	55	38	71	62
Ortalama AT yüzdesi (intergenik)	85	86	51	56	38	72	62
Toplam GC içeriği (%)	22,4	19	38	36	41	35,5	44,5

gelişiminin anlaşılmasında da ilgi çekici bir modeldir, insan hastalıklarıyla ilişkili çok sayıda proteine sahiptir. *Dictyostelium* hücrelerinin amino asit homopolimerlerine sahip çok sayıda proteini nasıl tolere ettiğini öğrenmek proteinlerdeki bu motiflerin fonksiyonu nasıl etkilediğini anlamaya yardım edecektir.

## 2.10. Yeni Nesil DNA Dizileme (Next Generation DNA Sequencing, NGS)

Son yıllarda geliştirilen yeni nesil DNA dizileme teknolojisi, genetik/epigenetik düzenleyici ağların, kromatin yapısı, nükleer yapılanma ve genom çeşitliliği hakkında bilgi üretimini sağlayan önemli bir araç olmuştur. Yeni nesil DNA dizileme sistemleriyle yüksek doğrulukla, oldukça hızlı olarak, dizileme yapılabilmektedir. Örneğin 4.6 Mb'lık *E. coli* genomu tek bir okuma ile tamamlanabilmektedir. Yapılan bir çalışmada *E. coli* genomu dört kere, her bir işlemde 400.000 okuma yapılarak de novo dizilenmiş ve okumanın %99.997 ila %99.999 arasında doğrulukla yapıldığı tespit edilmiştir [126].

Bu tez çalışmasında kullanılan sistem olan Illumina, tersinir sonlandırıcı (reversible terminator) teknolojisini kullanır. Yöntem Sanger dizileme yöntemine oldukça benzerdir ve temel olarak sentezleme yoluyla dizileme mantığıyla çalışır. Sentezleme reaksiyonu her bir bazın eklenmesinden sonra durdurulur ve son eklenen bazın floresan etiketi cihaz tarafından okunur. İşlem zincire eklenen her yeni baz için durdurularak devam eder [127].

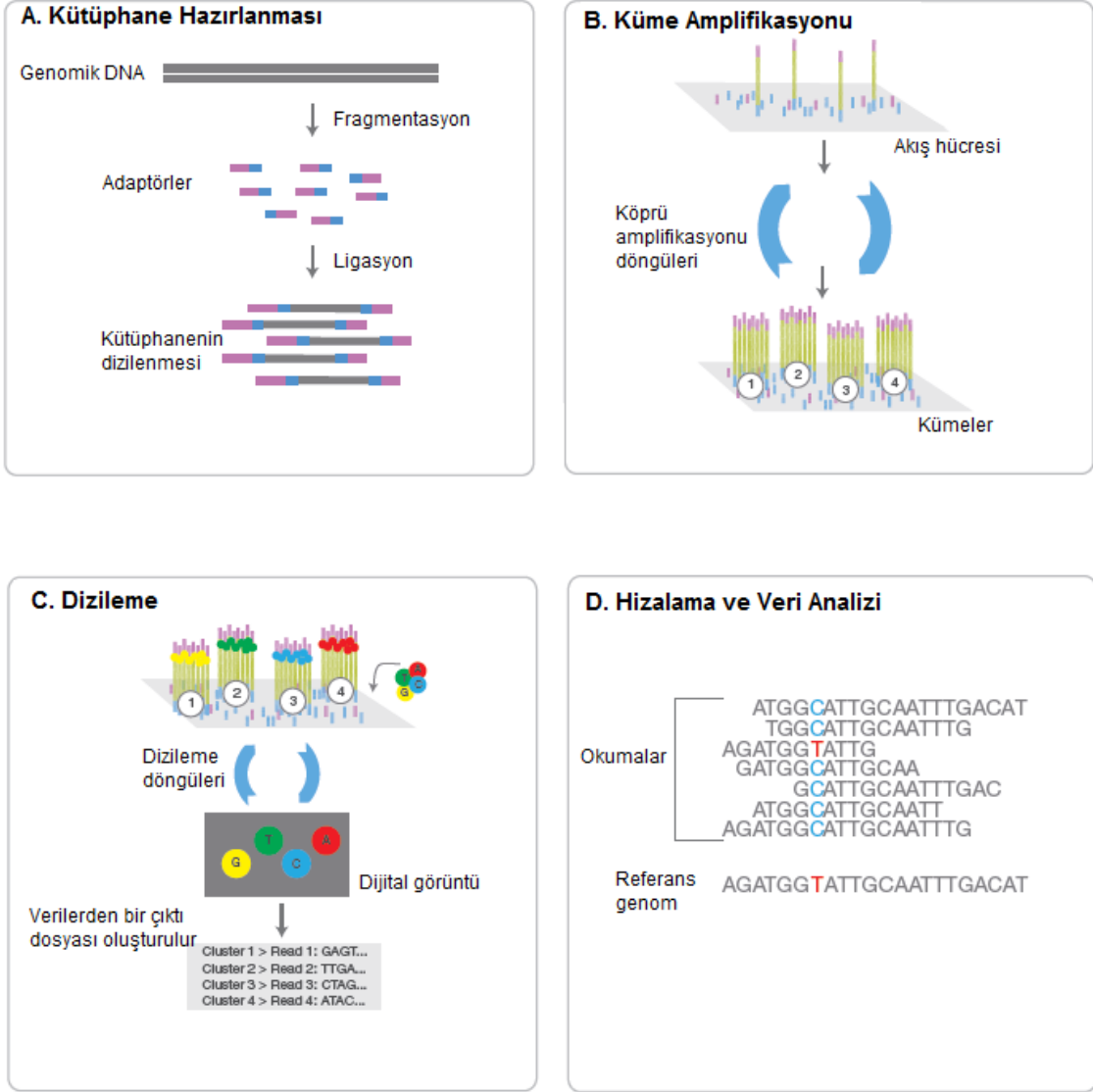
Yöntem dizilenecek DNA'nın kütüphaneye dönüştürülmesine gereksinim duymaktadır, bu DNA'nın dizileme reaksiyonu için çoğaltılmasına ve hareketsizliğinin sağlanmasına olanak tanır [127]. Bu nedenle iki farklı adaptör dizi tüm moleküllerin 5' ve 3' uçlarına ligasyon ile eklenir. Kütüphane daha uzun primer dizilerin kullanılmasıyla çoğaltılır (amplifiye edilir). Elde edilen çift zincirli kütüphane sodium hidroksit kullanılarak tek zincirli hale getirilir ve akış hücresi boyunca oldukça düşük konsantrasyonda pompalanır. Akış hücresi yüzeyinde sabitlenmiş iki

adet tek zincirli oligonükleotid popülasyonu vardır ve bu oligonükleotidler dizilenecek kütüphanenin uçlarındaki adaptör dizilerin tamamlayıcısıdır. Oligonükleotidler, tek zincirli kütüphanelerle hibridize olurlar. Ters zincir sentezi hibridize olan (çift zincirli) kısımdan başlayarak yeni zinciri oluşturur. Eğer yeni zincir diğer tarafa doğru eğilir ve ikinci adaptörünün tamamlayıcısı olan oligonükleotid dizinine bağlanırsa bu şekilde karşı DNA zinciri de sentezlenebilir. Bu işlem, eğilen ve karşı zincir sentezi köprü amplifikasyonu (bridge amplification) olarak adlandırılır ve pek çok kez tekrar edilerek kümeleri (cluster) oluşturur, Böylelikle her bir akış hücresinde orijinal dizinin birkaç bin kopyası birikir [127].

Rastgele dağılan bu kümeler, orijinal dizinin ileri ve geri primerlerle dizilenmiş kopyalarını içerir. Diziyi belirlemeden önce, zincirlerden biri tamamlayıcı baz eşleşmesi tarafından ya da sterik olarak reaksiyonun devam etmesini önlemek için uzaklaştırılmalıdır. Seçici zincirin uzaklaştırılması akış hücresi üzerinde bulunan oligonükleotid popülasyonlarının baz modifikasyonlarını hedefler. Zincir uzaklaştırılmasını takiben, akış kümesi üzerindeki tek zincirli her bir küme, aynı dizinin aynı yöndeki kopyalarını içerir ve adaptörlerdeki dizileme primerlerinin hibridizasyonu ile dizileri çıkarılabilir ve tersinir sonlandırıcı kimyası başlar (Şekil 2.10).

## **2.11. Biyoinformatik Yöntemler**

Yeni nesil DNA dizileme sistemleriyle yüksek doğrulukta, oldukça hızlı olarak dizileme yapılabilmektedir. Bu yöntemle elde edilen sonuçlar araştırmacılara başka hiçbir deneysel yöntem ile sağlanamayacak kadar zengin ve özgün bilgi sağlamaktadır. Fakat elde edilen bilginin depolanması, analizi ve değerlendirmesinde halen büyük güçlükler vardır. Bu nedenle yeni nesil DNA dizileme yönteminin başarısı büyük ölçüde kullanılan biyoinformatik araçlarla ilişkilidir.



**Şekil 2.10.** Tez çalışmasında kullanılan Illumina sisteminin çalışma prensibi

### 2.11.1. Verilerin İşlenmesi

Dizileri belirlenen DNA parçalarını etkin şekilde birleştirmenin tek yolu dizilerin bilgisayarda birleştirilmesidir. Ancak, verilerin kalitesi ve miktarı bu aşamada önemlidir. Birleştirme programları büyük veri setleri ile etkin şekilde çalışmayı olanaklı kılar ve büyük tekrar bölgeleri, gereksiz bölgeler ya da duplike olmuş bölgelerin varlığında yanlış birleştirme yapmayı önler. Dizi birleştirmesini doğru



şekilde tamamlamak için büyük veri setlerini bilgisayarda en kısa sürede ve en az bellek kullanarak yapabilmek için etkin algoritmalar gereklidir.

Bilgisayar kullanarak genomu birleştirmenin en zor taraflarından biri, yanlış birleştirmeye neden olabilecek tekrar eden DNA bölgelerinin uzunluğunu belirleyebilecek algoritmik yöntemler geliştirilmesidir. Tekrarlayan diziler, farklı genom bölgelerinden köken alan ancak aynı tekrarı paylaşan diziler olabilir ve bu durum birleştirme işlemini karmaşıktırır. Parçalar çakışan dizilerin bulunmasıyla bir araya getirilebilir ancak, tekrarlar bu esnada hatalı şekilde bir araya getirilebilir. Shotgun dizileme verilerinde tekrarlayan bölgeler genellikle, rastlantısal olarak gerçekleşmesi beklenenden daha fazla çakışan okuma içeren kümelerin bulunmasıyla ortaya çıkarılır [128].

DNA dizilerinin birleştirilmesinde izlenen yol, geleneksel birleştirme programlarının çoğuyla aynı olan ve çakışma-düzen-uzlaşma (overlap-layout-consensus) olarak bilinen yöntemeye dayanır. DNA dizilerini birleştirme işleminin temel basamakları şu şekilde özetlenebilir:

- Diziler ve veri kalitesi kontrol edilir ve okumalar temizlenir.
- Okumalar arasında çakışanlar belirlenir. Yanlış çakışmalar, duplike ve kimerik okumalar ile kendisiyle eşleşen okumalar (tekrar dizileri de dahil) tanımlanır ve ilerleyen basamaklarda kullanılmamak üzere elenirler.
- Okumalar, bir kontig düzeni oluşturmak üzere gruplandırılır.
- Okumaların çoklu dizi hizalamaları yapılır ve bir uzlaşma (consensus) dizisi her bir kontig düzeninden oluşturulur (genellikle her bir bazın hesaplanmış nitel değeri ile).
- Yanlış birleştirme için olası bölgeler kalite değerinin doğrulaması yapılarak kullanıcı tarafından tekrar kontrol edilir.

Bir birleştirme işlemi tamamlandığında, özellikle veri kalitesinin düşük olduğu, dizi içeriğinde eksiklik olan ya da yanlış birleştirme şüphesinin duyulduğu bölgelerin yeniden sınanmasına ihtiyaç vardır. Yeniden sınama genellikle şüphe duyulan

bölge ya da bölgelerin belirlenmesinde kullanılan ve kullanıcı tarafından gerçekleştirilen ayrıntılı bir süreçtir. Bu zorluğun aşılabilmesi için yeni yollar araştırılmaktadır [128]. Ayrıca diziler arasında kalan boşlukların geleneksel dizileme yöntemi kullanılarak kapatılması mümkündür.

Genomu birleştirmeyi tamamlamak üzere kullanılan araçlara örnek olarak; CONTIGuator [129], SIS [130], Consed [131] ve BACcardi [132] verilebilir.

### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1. *Dictyostelium discoideum* Kùltürlerinin Hazırlanması

*D. discoideum* laboratuvarında kolaylıkla kùltürü yapılabilen bir model organizmadır. *D. discoideum*, sıvı besiyerinde çoğaltılabilir ancak genellikle nemi tutan zengin (besleyici, nutrient) agar kullanılarak kùltürü yapılır. *D. discoideum*'un temel besini *E.coli*'dir ve bu besin hayat döngüsünün tüm evreleri için uygundur. Gelişimi için en uygun sıcaklık 22-24°C'dir. Gelişimin herhangi bir döneminde hücreler toplanabilir ve yeniden hızlıca geliştirilebilirler.

Laboratuvarında *D. discoideum* kùltürü yapılırken ışık, nem, düşük iyon konsantrasyonu ve asidik pH gereksiniminin olduğu unutulmamalıdır. Bu parametrelerden herhangi biri gelişim hızını ve hayatta kalma başarısını değiştirebilir.

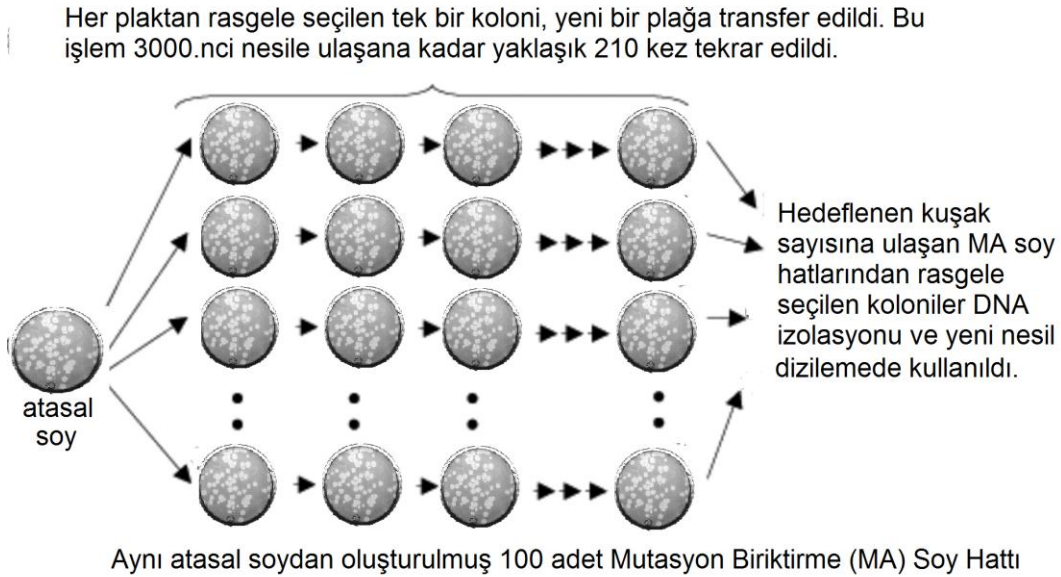
Bakteri ile beslenen *D. discoideum* hücrelerinin bölünme süresi yaklaşık 4 saattir. Laboratuvarında genellikle *D. discoideum* kùltürünün bakteri olmaksızın (axenic) yapılması arzulanır. Yabani suşlar bakteri ile beslenmeden gelişemezler. Ancak yabani bir suş olan NC4'den türetilmiş akzenik suşların (AX) herhangi bir canlı besin olmaksızın kùltürü yapılabilir. Canlı besin kullanmadan kùltürü yapılan suşlar daha yavaş gelişirler ve hücrelerin bölünme süresi sıcaklığa, kullanılan besin ortamına ve seçici ilaçların varlığına bağlı olarak kabaca 8-12 saattir. Akzenik suşlar bakteri ile yapılan kùltürlerden kolaylıkla sentetik kùltürlere aktarılabilirler.

Bu tez çalışması kapsamında yabani suş NC4'den türetilmiş olan AX4 suşu kullanıldı. Bu suşun seçilmesinin en önemli nedeni akzenik olmasının yanı sıra, genom dizisinin biliniyor olmasıdır [101]. Besiyeri olarak zengin bir agar ortamı olan SM agar (10 g glukoz, 10 g pepton, 1 g maya özütü, 1 g MgSO<sub>4</sub>, 1.9 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.6 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH=6.4), 15 g agar, 1 L H<sub>2</sub>O) kullanıldı ve *D. discoideum*, *Klebsiella aerogenes* ile beslendi. Katı besin ortamına bakteri (*K.aerogenes*) ile beraber ekilen *D. discoideum* 48 saat 22°C'de inkübe edilerek kùltürü yapıldı.

### 3.2. Mutasyon Biriktirme (MA) Soy Hatlarının Oluşturulması

MA deneyi *D. discoideum*'un akzenik bir suşu olan AX4'un tek bir klonal izolatu oluşturularak başlatıldı. Bu izolat, tez çalışması kapsamındaki tüm soy hatlarının oluşturulmasında atasal soy olarak kullanıldı. MA soy hatlarını elde etmek için, atasal soy üzerinde *Klebsiella aerogenes* ekili olan bir katı ortama (SM agar) ekildi ve bakteri üzerinden beslenip oluşturduğu plaklar (koloniler, plaque) tek tek seçilerek yeni katı ortama aktarıldı.

Tez çalışmasında atasal soy (AX4) kullanılarak 100 MA soy hattı oluşturuldu. Tüm MA soy hatları, SM agar ortamı ve besin kaynağı olarak *K. aerogenes* kullanılarak 22°C'de üretildi. Her bir MA soy hattı, yeni bir ortama aktarıldıktan 48 saat sonra oluşturduğu kolonilerden biri rasgele seçilerek, yeni bir ortama aktarıldı (Populasyon darboğazı, single cell bottlenecks). Bu işlem tez çalışması için hedeflenen 3000. nesil elde edilinceye dek yaklaşık 210 kez tekrar edildi (Şekil 3.1). Her 10 transferin ardından kültürlerde spor oluşumuna izin verildi ve toplanan sporeler %10 DMSO içeren SM sıvı besiyerine (10 g glukoz, 10 g pepton, 1 g maya özütü, 1 g MgSO<sub>4</sub>, 1.9 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.6 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH=6.4), 1 L H<sub>2</sub>O) alındı ve dondurularak -80°C'de saklandı.



Şekil 3.1. Kullanılan MA deney sistemi.

*D. discoideum*'un laboratuvarında yaratılan kültür koşullarında nesil süresini hesaplamak amacıyla, MA deneylerinin sürdürüldüğü her ay boyunca, 5 adet koloni rasgele seçilerek, 1 ml PBS (80 g/L NaCl, 2g/L KCl, 14.4 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 2.4 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) içeren tübe konuldu, seri sulandırma ile 10<sup>-3</sup> e kadar seyreltildi ve oluşturulan her bir seyreltmeden 100 µl alınarak SM agar içeren petri kaplarına ekildi. SM plaklarında oluşan her bir koloni ilkin kolonideki yaşayan bir hücreyi temsil ettiği için jenerasyon süresinin hesaplanmasında kullanıldı. Ortalama jenerasyon süresi her ay elde edilen bütün ölçümlerin ortalaması alınarak hesaplandı.

### 3.3. DNA İzolasyonu

210 tek koloni transferi sonucunda 3000'nci jenerasyona ulaşan soy hatlarından 22 tanesi rasgele seçildi. Bu soy hatlarının her birinden seçilen bir koloni 5ml SM sıvı besiyeri+0,1mg/ml penisilin ve 0,05g/ml streptomisin içeren tüpte 24 saat 22°C`de 120 rpm hızında çalkamalı etüvde inkübe edildi. 24 saat sonunda (logaritmik fazdan durağan faza geçmekte olan hücrelerden oluşan) kültür 4°C`de 300 xg`de 3 dakika santrifüje edildi. Bakterilerin uzaklaştırılması amacıyla hücre çökeltisi 2 kez soğuk fosfat tamponu (2.25 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 0.67 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 litre H<sub>2</sub>O) ile yıkandı ve 4°C`de 300 xg`de 3 dakika santrifüj edildi. Elde edilen hücrelerden Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA) kullanılarak genomik DNA, üreticinin talimatları doğrultusunda izole edildi:

1. Süspansiyon halinde bulunan hücreler çöktürülür ve hücre çökeleği üzerine 600 µl Nuclei Lysis Solution ve 10 µl Proteinaz K (20mg/ml) konulur, vortekslenerek iyice karıştırılır ve 55°C`de 1 saat inkübe edilir.
2. Inkübasyon süresi sonunda örnekler 5 dakika oda sıcaklığına soğutulur. Örnekler 3µl RNase Solution (5mg/ml) eklenir ve tüpler 5 kez alt-üst edilerek karıştırılır. 37°C`de 15-30 dakika inkübe edilir.
3. Örnekler 5 dakika oda sıcaklığına soğutulur, 200µl Protein Precipitation Solution eklenerek 20 saniye vorteks ile karıştırılır. Örnekler buz üzerinde 5 dakika inkübe edilir.

4. Proteinlerin çöktürülmesi için 13000 xg`de 10 dakika santrifüje edilir.
5. DNA içeren üst faz yeni bir tübe aktarılır ve üzerine 600 µl isopropanol eklenir. Tüp alt üst edilerek iyice karıştırılır.
6. DNA`nın çöktürülmesi için 13000 xg`de 1 dakika santrifüje edilir. Sıvı kısım uzaklaştırılır.
7. DNA çökeleği üzerine %70`lik etanol eklenir. Tüp bir kaç kez alt üst edilir. 13000 xg`de 1 dakika santrifüje edilir ve alkol uzaklaştırılır.
8. Pellet oda sıcaklığında 15-20 dakika kurutulur.
9. DNA üzerine 100 µl Tris-EDTA (pH=8) eklenir ve çözünmesi için gece boyu 4°C`de inkübe edilir.
10. Elde edilen DNA örnekleri 2–8°C`de saklanır.

### **3.3.1. DNA Örneklerinin Nitel ve Nicel Analizi**

DNA izolasyonundan sonra örneklerdeki DNA miktarlarının ölçülüp, saflığının belirlenmesi için NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific Inc.) kullanıldı. A260/280 ve A260/230 değerleri temel alınarak örnekler değerlendirildi.

Dizileme işleminin yapılacağı merkezin talimatları doğrultusunda kütüphane hazırlamadan önce, DNA örneklerinin miktarı Qubit® 2.0 (Invitrogen Q32866) Fluorometre kullanılarak belirlendi. Bu işlemin amacı DNA`yı bir floresan boya ile işaretleyerek DNA miktarının ortamda bulunan diğer moleküllerden bağımsız olarak en doğru şekilde tespit edilmesidir.

Tüm örnekler %1`lik agaroz jel kullanılarak kontrol edildi. 2 µl genomik DNA örneği ve 10µl 6x Sybr green I (Invitrogen S7563) içeren yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. Jelin görüntülenmesi için UVP GelDoc-It Imaging System kullanıldı.

### 3.4. Yeni Nesil DNA Dizileme

Tez çalışmasında, tüm genom dizilemesinin yapılması için; Illumina HiSeq platform 2500 sistemi kullanıldı. Yöntemin doğru şekilde işlemlerini sağlamak için firmanın önerdiği protokol uygulandı ve DNA'nın yüksek hız ve yüksek doğrulukta dizilenmesi amaçlandı.

#### 3.4.1. Yeni Nesil Dizileme İçin Genomik DNA Kütüphanesi Hazırlanması

Genomik DNA Kütüphanesinin hazırlanması 4 adımda gerçekleştirilmektedir (Şekil 3.2):

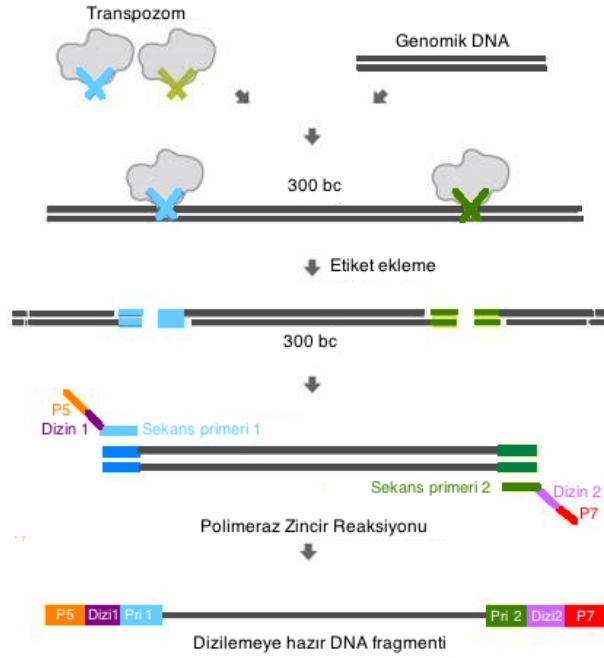
- Genomik DNA'nın Transpozaz enzimi kullanılarak küçük parçalara ayrılması
- DNA parçalarına adaptörler ve dizinler (index) eklenmesi
- Polimeraz zincir reaksiyonu ile DNA parçalarının çoğaltılması
- DNA parçalarının büyüklüklerine göre seçilmesi ve örneğin temizlenmesi

##### 3.4.1.1. Fragmentasyon

Qubit® 2.0 Fluorometre sonuçlarına göre tüm örnekler DNA konsantrasyonları 2,5ng/ µl olacak şekilde seyreltildi. Kütüphane hazırlama işleminin ilk basamağı olan DNA örneklerinin transpozaz enzimi kullanılarak küçük parçalara ayrılması için aşağıda verilen şekilde bir karışım hazırlandı ve iyice karıştırıldı:

- 1 µl genomik DNA örneği (2,5ng/µl)
- Nextera ® 1,25 µl Tagment DNA tamponu
- 0,25 µl Tagment DNA enzimi (Illumina Nextera FC-121-1031)

Hazırlanan karışım oda sıcaklığında, 300 xg`de 1 dakika santrifüje edildi. Daha sonra 55°C`de 5 dakika inkübe edildi ve 2. basamağa kadar 4°C`de muhafaza edildi.



**Şekil 3.2.** Yeni nesil dizileme için genomik DNA kütüphanesi hazırlanması.

### 3.4.1.2. DNA Parçalarına Dizinler Eklenmesi

Kütüphane hazırlamanın ikinci basamağında, dizileme ve küme oluşturmak için gerekli olan dizin 1 (index1, i7) ve dizin 2 (index2, i5) ile adaptör diziler fragmentlerine eklenmelidir. \*

Birinci basamakta elde edilen DNA fragmentleri doğrudan kullanılarak aşağıda verilen şekilde karışım hazırlandı (Kapa biosystems KM2605) ve iyice karıştırıldı:

- 3,5 µl 2x KAPA HiFi HotStart Ready master mix
- 0,5 µl dizin 1
- 0,5 µl dizin 2

\* Adaptörler kullanılacak NGS platformuna özgül oligonükleotit dizileridir ve dizileme işlemi için gereklidirler. Yeni nesil dizileme yöntemi, çok sayıda örneğin paralel olarak dizilenmesine olanak tanır. Bu nedenle örneklerin birbirlerine karışmasını önlemek amacıyla dizin (index) adı verilen kısa oligonükleotit dizileri DNA dizilerinin iki ucuna eklenerek barkod görevi yaparlar.



Hazırlanan karışım oda sıcaklığında 300 xg`de 1 dakika santrifüje edildi.

Dizinlerin DNA fragmentlerine eklenmesi için ısı döngüleyici ile aşağıdaki program uygulandı:

72°C	3 dk	
98°C	2 dk 45 sn	
98°C	15 sn	} 9 döngü
62°C	30 sn	
72°C	1 dk 30 sn	
4°C	-	

Bu işlemde en önemli nokta, her örnek için dizinlerin (i5 ve i7) farklı kombinasyonlarda uygulanmasıdır. Tez çalışmasında kullanılan kit içeriğinde 12 adet dizin 1 (i701-712), 8 adet dizin 2 (i501-508) mevcuttur (Illumina Nextera FC-121-1012). Çalışma kapsamında her örnek için kullanılan dizinler Çizelge 3.1`de görülmektedir.

#### 3.4.1.3. Amplifikasyon

İkinci basamakta elde edilen DNA fragmentleri doğrudan kullanılarak aşağıda verilen karışım hazırlandı (Kapa biosystems KM2605) ve iyice karıştırıldı:

- 8 µl 2x KAPA HiFi HotStart Ready master mix
- 0,5 µl primer 1
- 0,5 µl primer 2

Bu aşamada kullanılan primerlerin dizileri Çizelge 3.2`de görülmektedir. Hazırlanan karışım oda sıcaklığında 300 xg`de 1 dakika santrifüje edildi.

Fragmentlerin çoğaltılması için ısı döngüleyici ile aşağıdaki program uygulandı:

95°C	5 dk		
98°C	20 sn	}	4 döngü
62°C	20sn		
72°C	30 sn		
72°C	2 dk		
4°C	-		

#### 3.4.1.4. DNA Parçalarının Seçilmesi ve Temizlenmesi

Polimeraz zincir reaksiyonunun tamamlanmasının ardından hazırlanan kütüphaneler büyüklüklerine göre seçilmelidir. Bu amaçla,

1. Örnekler üzerine 17 µl Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter) magnetik boncuklar eklenir ve iyice karıştırılır.
2. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir.
3. Daha sonra örnekler bir magnetik desteğe (Life Technologies, 123-31D) alınır ve magnetik boncukların DNA`ya bağlanarak çökmesi için 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
4. Inkübasyondan sonra sıvı kısım uzaklaştırılır.
5. DNA çökeleği üzerine 200 µl %70`lik etanol eklenir ve 30 saniye beklenip alkol uzaklaştırılır.
6. Alkolün tamamen uzaklaştırılması için 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
- 7.Çökelek üzerine 30 µl 10 mM Tris tamponu (pH=8) eklenerek DNA`nın çözünmesi sağlanır.
8. Örnekler tekrar magnetik desteğe alınır ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilir.
9. Magnetik boncukların DNA`dan ayrılarak çökmesi sağlanır. DNA`lar temiz tüplere aktarılır.

**Çizelge 3.1.** Kütüphane hazırlanırken kullanılan dizinler

Örnek	Dizin 1 (i7)	Dizin 2 (i5)
D1	TAAGGCGA	TAGATCGC
D2	TAAGGCGA	CTCTCTAT
D3	TAAGGCGA	TATCCTCT
D4	TAAGGCGA	AGAGTAGA
D5	TAAGGCGA	GTAAGGAG
D6	TAAGGCGA	ACTGCATA
D7	TAAGGCGA	AAGGAGTA
D8	TAAGGCGA	CTAAGCCT
D9	CGTACTAG	TAGATCGC
D10	CGTACTAG	CTCTCTAT
D11	CGTACTAG	TATCCTCT
D12	CGTACTAG	AGAGTAGA
D13	CGTACTAG	GTAAGGAG
D14	CGTACTAG	ACTGCATA
D15	CGTACTAG	AAGGAGTA
D17	AGGCAGAA	TAGATCGC
D18	AGGCAGAA	CTCTCTAT
D19	AGGCAGAA	TATCCTCT
D20	AGGCAGAA	AGAGTAGA
D21	AGGCAGAA	GTAAGGAG
D22	AGGCAGAA	ACTGCATA

**Çizelge 3.2.** Kütüphane hazırlanırken kullanılan primerler

Primer 1 (5`-3`)	AATGATACGGCGACCACCGA
Primer 2 (5`-3`)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGA

### **3.4.2. Genomik DNA kütüphanelerinin Nicelik ve Niteliklerinin Kontrol Edilmesi**

Hazırlanan kütüphanelerin hepsi ya da birkaçının nitel ve nicel kontrollerinin yapılması önerilmektedir. Aşağıda belirtilen şekilde kontrolü tamamlanan kütüphaneler DNA dizilemesinin yapılacağı laboratuvara gönderilinceye kadar dondurularak -20°C`de saklandı.

Hazırlanan kütüphanelerin nicel olarak değerlendirilmesi Qubit fluorometer kullanılarak yapıldı. Florometrik ölçümü takiben, kütüphanelerin nitel kontrollerinin yapılması amacıyla rasgele seçilen 7 örneğe ait genomik DNA kütüphaneleri Agilent High Sensitivity DNA Kit ve Agilent Technologies 2200 Tape Station kullanılarak kontrol edildi. Örnekler 2 µl kütüphane üzerine 2 µl Agilent High Sensivity D1000 Sample buffer (Agilent Technologies 5190-6504) konularak hazırlandı. Agilent Technologies screen tape ve örnekler cihaza yerleştirildi ve program başlatıldı.

### **3.4.3. Dizileme**

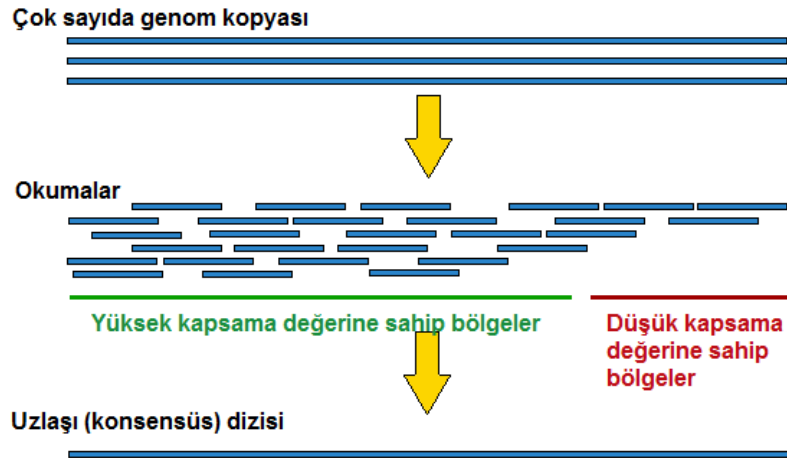
Tez çalışması kapsamında, genomik DNA kütüphanelerinin hazırlanmasının ardından, yeni nesil dizileme için Illumina HiSeq platform 2500 cihazına yüklenmesi ve dizilerin elde edilmesi University of New Hampshire Hubbard Center for Genomic Studies (New Hampshire Üniversitesi Hubbard Genom Araştırmaları Merkezi)`nde gerçekleştirilmiştir.

## **3.5. Biyoinformatik Analiz**

### **3.5.1. Mutasyonların Tanımlanması ve Uzlaşma Yaklaşımı**

Yeni nesil DNA dizileme yöntemi yüksek doğrulukta ve oldukça hızlı dizileme yapabilmeyi olanaklı kılmasının yanında, elde edilen verinin düzenlenmesi ve doğru şekilde işlenebilmesi için uygun algoritmalar ve yaklaşımlar gereklidir. Boşluklar, düşük kapsama (coverage) değerine sahip bölgeler ya da tekrarlayan uzun DNA bölgeleri nedeniyle verilerin birleştirilmesi oldukça karmaşıktır.

Tez çalışmasında *Dictyostelium discoideum* mutasyon biriktirme soy hatlarından elde edilen genom dizilerinin her biri *Dictyostelium discoideum* referans genomuna (GenBank erişim numaraları NC\_007087-NC\_007092) [120], Burrows-Wheeler Aligner (BWA) [133] ve Novoalign [134] yazılımları kullanılarak haritalandı. İzlenen yöntem, Sung ve arkadaşlarının çalışmasından değiştirilerek alındı [9]. Tek nükleotit mutasyonlarını tanımlamak için SAM alignment (hizalama) dosyaları her bir hizalayıcı yazılım (bwa ve novoalign) için oluşturuldu ve ilk olarak mpileup dosya biçimi samtools kullanılarak dönüştürüldü [135]. Mutasyonların belirlenmesinde uzlaşma yönteminden yararlandı. Uzlaşma yöntemine başvurulmasının temel nedeni, *Dictyostelium discoideum* genomunda uzun tekrar dizilerinin oldukça fazla bulunması ve genomun bazı bölgelerinde istenilen kapsama (coverage) değerinin elde edilememiş olmasıdır. Düşük kapsama değerine sahip bölgelerde, ilgili nükleotit pozisyonuna ait bilgi her örnekten sağlanamadığı için, uzlaşma yaklaşımı kullanılarak mutasyonların en doğru şekilde tanımlanması hedeflendi (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3.** Düşük ve yüksek kapsama değerlerinin şematik olarak gösterilmesi

Uzlaşma yönteminde, bir örnekteki her nükleotit pozisyonu için bazlar tanımlanır, bu aşamada her pozisyon için ileri (forward) ve geri (reverse) okumaların hizalamaları perl kodları kullanılarak yapıldı. Bu yaklaşımda, hizalanmış en az üç ileri ve üç geri okuma ile okumaların en az %80`inde ilgili pozisyondaki

nükleotidin aynı olması gereklidir. Daha sonra, mutasyonları belirlemek için üç basamaklı bir işlem kullanıldı. Bu işlemin ilk basamağına göre, bir örneğe ait bahsedilen şekilde hizalanan dizide eğer ilgili pozisyonda farklı bir baz varsa bu bir varsayılan mutasyon (putation) adayı olarak kabul edilir. Yöntemin ikinci basamağı, eğer yeterli bilgi varsa kaynak genom ve tüm diğer örneklerden elde edilen veriler kullanılarak bir atasal uzlaşma dizisi oluşturulmasıdır. Bu uzlaşma dizisinde bulunan her nükleotit, oluşturulduğu örneklere ait okumaların en az %80`inde aynı nükleotit olmalıdır. Bu eşik noktasının uygulanmasıyla, analiz edilen dizi büyüklüğü en yüksek seviyeye gelirken aynı zamanda yanlış pozitiflik oranı (gerçekte mutasyon olmayan dizileme hataları) da en alt düzeyde tutulur. Eğer bir örnekte, herhangi bir noktada, diğer örneklerden oluşturulmuş uzlaşma dizisinden farklı bir baz varsa, bu bazın bir varsayılan mutasyon olabilmesi için diğer örneklerden en az ikisiyle karşılaştırmaya yetecek kadar okuma olmalıdır (Şekil 3.4).

Son basamakta ise, bir örnekte bulunan ve uzlaşma dizisiyle karşılaştırılarak mutasyon adayı olarak tanımlanan bölgeler, referans genom dizisiyle karşılaştırıldı ve eğer farklıysa varsayılan mutasyon olarak tanımlandı. Varsayılan baz değişimi mutasyonları, iki hizalayıcı (bwa ve novoalign) yöntem tarafından bağımsız olarak mutasyon olarak tanımlandıysa mutasyon olarak kabul edildi. Bu sınırlamalar analizi herhangi bir bölge için asgari üç örnekle sınırlanmış olmasına rağmen, tüm örnekler için genomun ortalama analiz edilen dizi boyutunu arttırdığı önceki çalışmalarda belirtilmiştir [9,31].

Kromozom	Pozisyon	Referans	Uzlaşma dizisi	Örnekler			Kapsama değerleri			Sonuçlar		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3
2	1	A	A	A	A	A	15	18	1	◆	◆	●
2	2	A	A	T	A	A	24	25	15	★	◆	◆
2	3	A	A	T	A	A	1	25	10	●	◆	●
2	4	A	A	T	A	A	25	18	1	◆	◆	●
2	5	A	T	T	T	A	25	25	10	★	★	●

◆ değişiklik yok

● kapsama değeri düşük

★ mutasyon

★ paylaşılan monomorfizm

### Şekil 3.4. Uzlaşma yaklaşımı

Uzlaşma yaklaşımıyla belirlenen mutasyonlar daha önce yayınlanmış pek çok çalışmada geleneksel Sanger dizileme yöntemiyle kontrol edilmiş ve doğrulanmıştır [8,9,18].

### 3.5.2. İnsersiyon ve Delesyonların Belirlenmesi

İnsersiyon-delesyon (indel) mutasyonlarının tanımlanmasında, boşluklar ve tekrar elementlerinin doğasından kaynaklanan zorluklar nedeniyle, hizalamada gerçek indel olması durumunda bile, karar vermeyi güçleştirebilir. Bu nedenle, varsayılan indeller ilk olarak bwa ve novoalign beraber kullanılarak elde edildi. Kriter olarak tüm bölgeler için en az üç ileri ve üç geri okumanın indeli kapsamı ve bu okumaların en az %30'unun tam olarak aynı indeli (büyüklük ve motif olarak) tanımlanması uygulandı. Daha sonra, hizalamadan elde edilen varsayılan indeller, pater-growth algoritması PINDEL'e yönlendirildi. Daha büyük indeller paired-end bilgisi kullanılarak tanımlandı [136]. Bir varsayılan indelin gerçek indel olarak kabul edilmesi için, her iki hizalama algoritması (bwa ve novoalign) ve PINDEL tarafından bağımsız olarak belirlenmesi gereklidir. Ayrıca, varsayılan indelin bulunduğu bölgenin her iki tarafından en az 25 baz tam kapsayan okumaların en az %50'sinde tanımlanmalıdır. İndel sadece bwa ve novoalign tarafından tanımlandıysa, iyi kapsamaya sahip okumaların en az %80'inde tanımlanmış olmalıdır. Daha büyük indeller PINDEL tarafından daha katı filtreler uygulanarak belirlenebilir.

Baz değişimi mutasyonlarından farklı olarak, okumaların çoğu bir indel mutasyonu kapsamakta ve mutasyonu tanımlamakta başarısız olabilir. Bu, mutasyonun her iki tarafından yeterli kapsama olmaması ve kimi zaman da referans genomla bağlanamamasından kaynaklanabilir. Bu durum özellikle basit dizi tekrarlarında (SSR) meydana gelir. Bundan dolayı, başlangıçta varsayılan indellerin izole edilmesinde daha yumuşak filtrelerin uygulanması tüm olası indellerin tanımlanmasını eşitler. Sadece iyi kapsamaya sahip okumalara odaklanması ve PINDEL uygulanmasıyla, sadece çok sayıda algoritma tarafından desteklenen yüksek uyuşmaya sahip indeller korunurken yanlış pozitiflik yüksek olsa da filtrelenebilir.

### 3.5.3. Paylaşılan Monomorfizmlerin Belirlenmesi

Kaynak genomda bulunmayan bazı değişikler analize katılan tüm örneklerde mevcutsa (tam olarak aynı şekilde) bunlar paylaşılan ya da ortak monomorfizmler olarak düşünülebilir. Bu değişiklik, kaynak genom dizilemesinin gerçekleştiği suşta olmayan ancak bu tez projesine başlamadan (MA soy hatları oluşturulmadan) önce atasal soy hattında oluşmuş değişikliklerdir. Ortak monomorfizmler doğal seçim etkisi altında gerçekleşen polimorfizmlerin spektrumunu yansıtır. Bu değişikliklerden elde edilen veriler transition/transversion (Ts/Tv) oranının hesaplanmasında ve MA deney sisteminde seçilimin etkisinin değerlendirilmesi amacıyla kullanıldı.

### 3.5.4. Mutasyon Hızının Hesaplanması

Her örnek (soy hattı) için yeni nesil dizilemeyle ortaya çıkarılan ve çeşitli biyoinformatik araçlar kullanılarak tanımlanan baz değişimi ve indel mutasyon hızları aşağıdaki eşitlik kullanılarak doğrudan hesaplandı:

$$\mu = \frac{m}{n * T}$$

Bu eşitlikte  $\mu$  mutasyon hızını,  $m$  gözlenen mutasyon sayısını,  $n$  çalışmada analiz edilen dizinin büyüklüğü ve  $T$  ise ilgili örneğin MA çalışması sırasında ulaştığı



kuşak sayısını belirtir. Her örnek için hesaplanan mutasyon hızının standart hatası eşitliği ile hesaplandı [18], [89] :

$$SE = \sqrt{\frac{\mu}{n * T}}$$

Toplam standart hata, tüm örnekler için hesaplanan mutasyon hızlarının standart sapması (s) olarak analiz edilen soy hattı sayısının (N) kareköküne bölünerek hesaplandı [89] :

$$SE = \frac{s}{\sqrt{N}}$$

"You can't even begin to understand biology, you can't understand life, unless you understand what it's all there for, how it arose - and that means evolution."

Richard Dawkins

## 4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

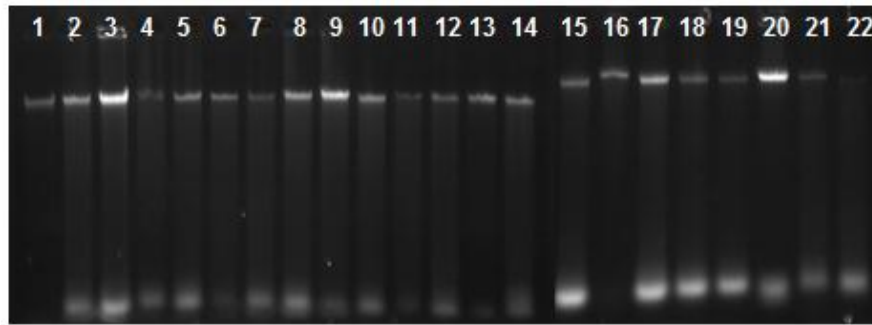
### 4.1. Bulgular

#### 4.1.1. Kuşak Süresinin Hesaplanması

MA deneylerinin sürdürüldüğü her ay boyunca, rasgele seçilen 5 koloni, *D. discoideum*'un laboratuvarında yaratılan kültür koşullarında kuşak süresinin hesaplanması için kullanıldı. Ortalama jenerasyon süresi her ay elde edilen bütün ölçümlerin ortalaması alınarak hesaplandı. Ortalama kuşak süresi 8 kuşak/gün olarak belirlendi, elde edilen sonuç literatürle uyumludur [11,136,137] .

#### 4.1.2. DNA Örneklerinin Nitelik ve Niceliklerinin Değerlendirilmesi

Yeni nesil DNA dizilemesi için temiz ve parçalanmamış DNA elde edilmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle izolasyon sırasında DNA'nın degrade olup olmadığını kontrol etmek için agaroz jel (%1) elektroforezi kullanıldı (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** İzole edilen DNA'ların agaroz jelde görüntülenmesi (örnekler numara sırasıyla jele yüklenmiştir).

NanoDrop ND- 1000 Spectrophotometer kullanılarak, izole edilen DNA`ların miktarı ve saflığı kontrol edildi. Dizileme işleminin yapılacağı merkezin talimatları doğrultusunda kütüphane hazırlamadan önce, DNA örneklerinin miktarı ayrıca Qubit® 2.0 Fluorometre kullanılarak da belirlendi. Her iki ölçümden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1`de verildi.

**Çizelge 4.1.** Genomik DNA örneklerine ait ölçümler

Örnek	Nanodrop sonuçları		Qubit sonuçları
	(ng/µl)	260/280	(ng/µl)
D1	237,16	2,09	50,0
D2	147,61	2,09	23,4
D3	341,17	2,03	36,1
D4	67,5	2,16	8,4
D5	112,2	2,13	27,2
D6	58,29	2,12	11,9
D7	82,79	2,15	11,2
D8	143,58	2,17	29,2
D9	87,73	2,15	28,5
D10	143,71	2,09	29,0
D11	49,67	2,17	7,3
D12	145,13	2,10	20,3
D13	72,45	2,19	20,9
D14	129,87	2,18	20,1
D15	73,85	2,14	7,4
D16	101,55	2,12	8,6
D17	242,22	2,09	25,8
D18	44,35	2,17	4,9
D19	233,05	2,09	23,5
D20	187,73	2,08	22,8
D21	178,11	2,12	21,3
D22	207,54	2,05	26,9

### 4.1.3. Dizileme Aşamalarında Elde Edilen Sonuçlar

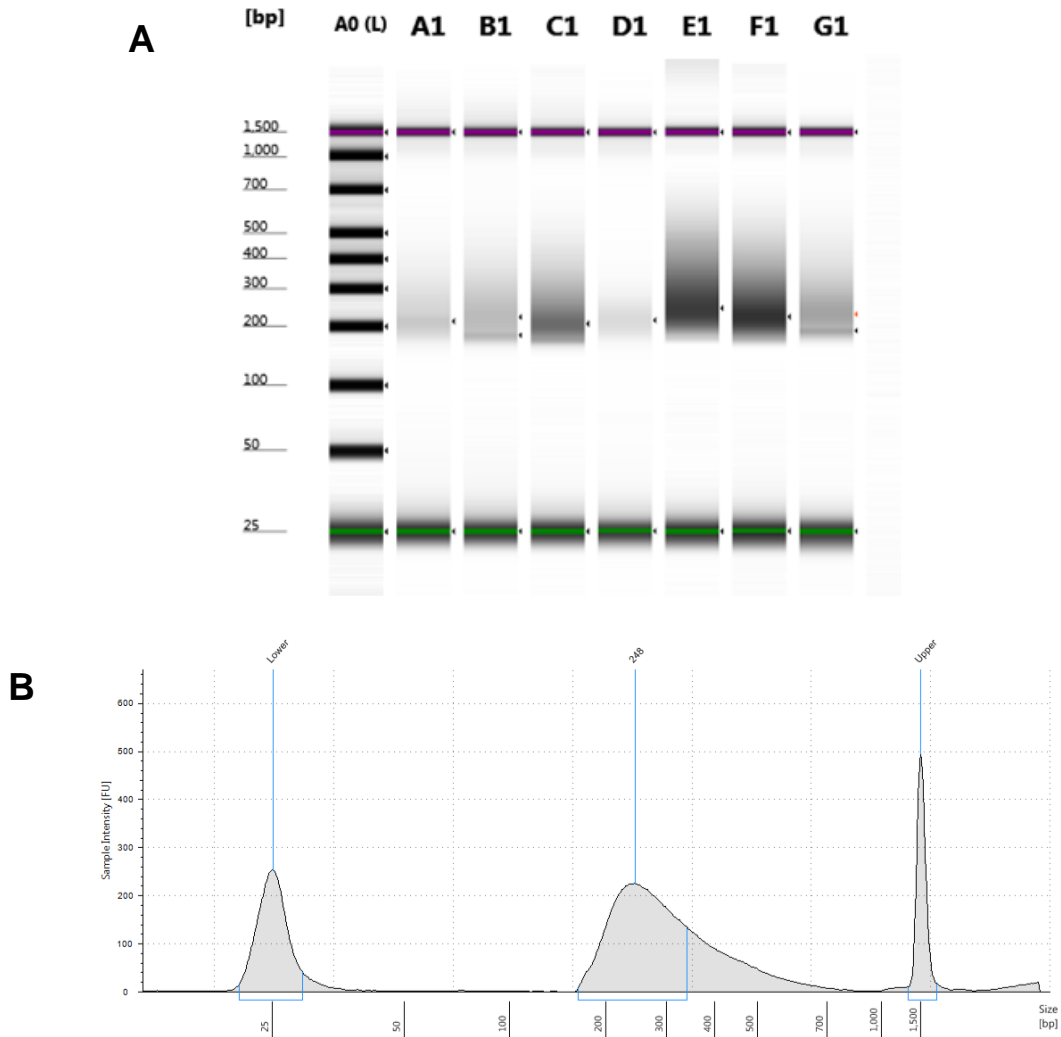
#### 4.1.3.1. DNA Kütüphanelerinin Nicel Olarak Değerlendirmesi

İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonlarının ve saflığının değerlendirilmesi sonucunda tüm örneklerin genomik kütüphanelerinin hazırlanmasına karar verildi. Dizileme işleminin yapılacağı merkezin talimatları doğrultusunda, hazırlanan kütüphanelerin miktarları Qubit® 2.0 Fluorometre kullanılarak kontrol edildi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2`de verildi. Sonuçlara göre 16 no`lu örnek (D16) ölçüm değerlerinin dışında kalması nedeniyle (miktarı çok düşük olduğu için), çalışmanın ilerleyen basamaklarına dahil edilmedi.

**Çizelge 4.2.** DNA kütüphanelerinin konsantrasyonları

Örnek	Qubit sonuçları (ng/µl)
D1	0.51
D2	0.29
D3	0.41
D4	0.15
D5	0.26
D6	0.33
D7	0.59
D8	0.11
D9	0.62
D10	0.71
D11	0.64
D12	0.51
D13	1.3
D14	1.3
D15	0.97
D17	0.52
D18	0.46
D19	0.9
D20	0.43
D21	0.71
D22	0.73

Dizileme işleminin yapılacağı merkez, hazırlanan kütüphanelerden hepsinin ya da bazılarının Agilent 2100 BioAnalyzer cihazı kullanılarak nitelik ve niceliklerinin kontrol edilmesini önermektedir. Qubit fluorometer ile yapılan ölçümden elde edilen sonuçlara (konsantrasyon) göre rasgele seçilen 7 örnekte hazırlanan kütüphanelerin fragman uzunlukları ve miktarlarının değerlendirilmesi amacıyla Agilent 2100 BioAnalyzer cihazı kullanıldı. Cihazdan elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.2`de ve DNA parçalarına ait veriler Çizelge 4.3`de verildi (Bu ölçüme ait detaylı sonuçlar EK-2`de verildi).



**Şekil 4.2.** DNA kütüphanelerinin görüntülenmesi (A) ve D14 numaralı örneğin elektroferogram görüntüsü (B).

**Çizelge 4.3.** DNA kütüphanelerinin büyüklüğü ve konsantrasyonları (Parantez içinde örneklerin gerçek numaraları görülmektedir).

Örnek	Konsantrasyon [pg/µl]	DNA Fragmentinin büyüklüğü (bç)
Ladder (Belirteç)	2350	
A1 (D4)	81.2	213
B1 (D5)	78.3	185 ve 224
C1 (D7)	404	207
D1 (D8)	74.7	216
E1 (D14)	805	248
F1 (D15)	694	225
G1 (D18)	291	232

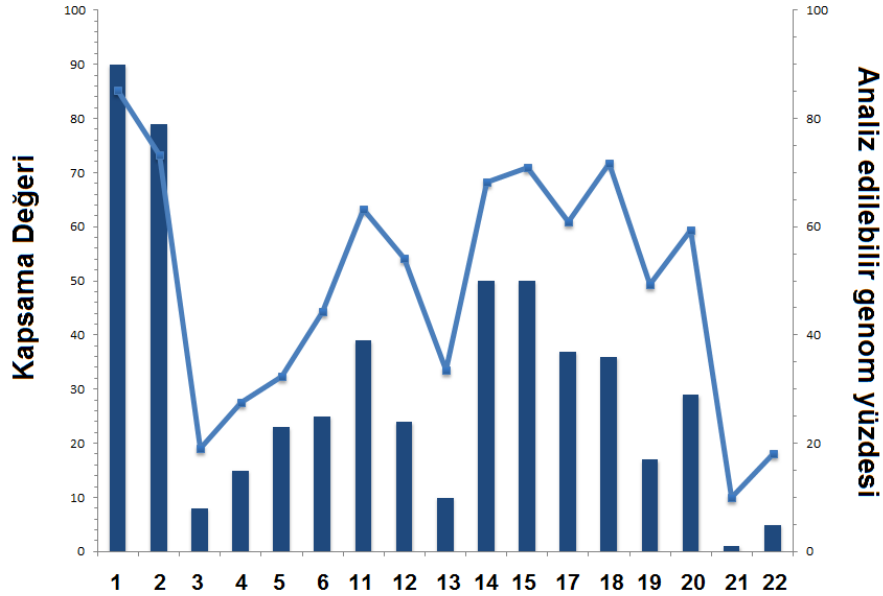
Sonuçlara göre kütüphanesi hazırlanan 22 örnekten, 21'inin tüm genom dizilemesinin yapılması için University of New Hampshire Hubbard Center for Genomic Studies (New Hampshire Üniversitesi Hubbard Genom Araştırmaları Merkezi)'ne gönderilmesine karar verildi.

#### 4.1.3.2. Dizilemeden Elde Edilen Sonuçlar

Soyhatları ortalama 210 kez popülasyon darboğazına sokularak yaklaşık 3000 hücre bölünmesi boyunca mutasyon biriktirmeleri hedeflendi. DNA dizilemesine gönderilen 21 örnekten 4'ü kontaminasyon, diğer 4'ü ise kapsama (coverage) değerleri çok düşük olması (1x-10x) nedeniyle analizlere dahil edilmedi. Analizlere dahil edilen 13 örneğe ait kapsama değerleri ise 15x ile 90x arasında değişmektedir. DNA dizilemesi yapılan örneklerden ortalama 19,8 Mb okuma elde edildi ve kaynak genomla karşılaştırılarak hizalandı.

Mutasyonlar oldukça nadir gerçekleşen olaylar olduğundan, gerçek mutasyonları tanımlamak -dizileme ve hizalama hatalarından kaynaklanan arka plan gürültülerden ayırt etmek- için tek düze ve katı yöntemlerin izlenmesi gereklidir.

Okuma kapsama değeri'nin yüksekliği her baz için güveni arttırmaya rağmen, verinin bütününe bakıldığında bilginin düşmesine neden olacaktır çünkü genomun daha küçük bir yüzdesi kapsanacaktır. Genomu dizilenen tüm örnekler için kapsama değeri ve genomun analiz edilebilen yüzdesi Şekil 4.3`de grafik üzerinde gösterildi. Tekrarlayan ya da birbirine çok benzer olan dizilerin neden olduğu hizalama hatalarını azaltmak için ortalama kapsama değeri'nden 3 kat büyük kapsama değeri'ne sahip olmayan bölgeler analiz dışı bırakıldı. Bahsedilen sınırlamalar uygulandıktan sonra genomun yaklaşık % 58.3`ünün (19.8 Mb) analiz edilebileceği belirlendi.



**Şekil 4.3.** Kapsama (coverage) değeri ve genomun analiz edilebilen yüzdesi arasındaki ilişkinin gösterilmesi

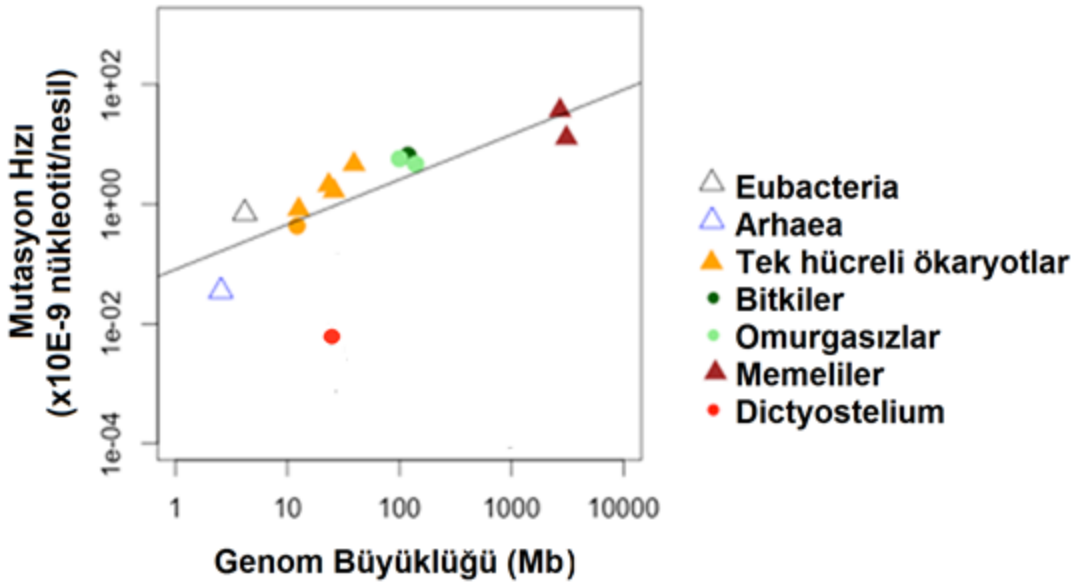
Kapsama değeri kriterinin uygulanmasından sonra, tüm örneklerde aynı bölgeler analize dahil edilemedi. Bu nedenle mutasyonların en doğru şekilde tanımlanabilmesi için uzlaşma yaklaşımından yararlanıldı.

#### 4.1.3.3. *Dictyostelium discoideum*'da Spontan Mutasyonların Hızı ve Moleküler Spektrumu

Tez çalışmasında genomu dizilenen 21 örnek için analizin kalitesini korumak amacıyla kapsama değeri için bir alt limit uygulanmasına karar verildi. Kapsama değeri alt limiti 15X'e sahip olan 13 örnekte tespit edilen mutasyonlar tekrar kontrol edilerek paylaşılan monomorfizmlerden ayırt edildi.

Analizleri tamamlanan 13 örnekte belirlenen baz değişimi tipindeki 7 mutasyon kullanılarak mutasyon hızı  $0.89 (SE=0.41) \times 10^{-11}$  bölge/nesil olarak hesaplandı. Mutasyonların her bir soy hattındaki dağılımları Çizelge 4.4`de verildi.

Benzer genom büyüklüğüne sahip ökaryotlar düşünüldüğünde elde edilen mutasyon hızı beklenen değerden küçüktür ve hatta literatürle kıyaslandığında prokaryotlarda gözlenen değerden de küçüktür (Çizelge 2.1). *Dictyostelium discoideum*'da hesaplanan mutasyon hızı ile genom büyüklüğü arasındaki ilişki Şekil 4.4'de gösterildi.



**Şekil 4.4.** *Dictyostelium discoideum*'da belirlenen mutasyon hızının diğer canlılarla karşılaştırılması.



Belirlenen baz değişimi tipindeki mutasyonların 2'sinin transisyon, 5'inin ise transversiyon tipinde olduğu belirlendi. Mutasyonel yatkınlığın Adenin ve Timin yönünde olduğu belirlendi (Çizelge 4.4).

Belirlenen mutasyonların *Dictyostelium discoideum* genomunda yerleşimleri ve bu mutasyonların neden olduğu amino asit değişiklikleri değerlendirildi (Çizelge 4.5.) Bulunan 7 mutasyondan ikisinin kodlayan bölgelerde, beşinin ise intergenik bölgelerde olduğu belirlendi. Beklenildiği üzere mutasyonların çoğunlukla kodlamayan bölgelerde olduğu görüldü.

Kodlayan bölgelerde yer alan mutasyonların her ikisi de amino asit değişikliğine neden olmaktadır (Çizelge 4.5). D11 numaralı örnekte, kodlayıcı bölgede belirlenen mutasyon 3. kromozom üzerinde yer almaktadır ve yapılan karşılaştırmalı analizlerin sonuçlarına göre bu genin DNA polimeraz theta (POL $\theta$ ) enzimini kodladığı tahmin edilmektedir [120]. DNA Polimeraz theta, DNA polimeraz alpha süper ailesinin bir üyesidir ve translezyon sentezine katılarak DNA onarımında rol oynamaktadır. Belirlenen mutasyon, kodonun glisin amino asidi yerine alanin amino asidini kodlamasına neden olmaktadır. Her iki amino asit de hücre içinde nonpolar özellikte davranırlar. Ancak, glisin amino asidi, sahip olduğu küçük yan grubu ile amino asitler arasında ayrıcalıdır (sadece Hidrojen) ve proteinlerin özgül üç boyutlu yapılarının kurulmasında öneme sahiptir. Mutasyon sonucu glisinin yerine diziye dahil olan alanin amino asidinin ise yan grubu bir metil grubudur (-CH<sub>3</sub>). Belirlenen mutasyonun gen üzerinde yer aldığı bölge ve ilgili amino asitlerin özellikleri düşünöldüğünde, gerçekteşen bu mutasyonun proteinin katlanmasında dramatik bir etkiye neden olması beklenmemektedir.

D20 numaralı örnekte belirlenen mutasyon ise 1. Kromozomda yer alan ve yapılan karşılaştırmalı analizlere göre DNA2/NAM7 helikaz ailesinden bir proteini kodladığı tahmin edilen bir geni etkilemektedir [120]. Dolayısıyla bu mutasyonun DNA replikasyonu, rekombinasyonu ve onarımı ile ilgili sonuçlarının olacağı

önerilebilir. Belirlenen mutasyon, kodonun asparajin amino asidi yerine serin amino asidini kodlamasına neden olmaktadır. Her iki amino asit de polar yan gruplara sahiptir. Serin amino asidi hidroksil grubu içeren yan zinciriyle kolaylıkla bağ yapabilir. Ancak yine de, her iki amino asidin benzer özelliklere sahip olması ve mutasyonun gerçekleştiği bölge nedeniyle bu mutasyonun, proteinin yapısında radikal bir değişikliğe yol açmayacağı ve protein işlevini etkilemeyebileceği düşünülebilir.

**Çizelge 4.4.** *Dictyostelium discoideum*'da belirlenen mutasyonlara ait bilgiler.

MA Soyhattı	Mutasyonlar						Bölge ( $\times 10^7$ )	Nesil sayısı	Mutasyon hızı ( $\times 10^{-11}$ ) /bölge/nesil	Ts/Tv
	Transisyonlar		Transversiyonlar							
	AT>GC	GC>AT	AT>TA	GC>TA	AT>CG	GC>CG				
D1	0	0	0	0	0	0	2.90	2784	0.00	-
D2	0	0	0	0	0	0	2.49	3024	0.00	-
D4	0	0	0	0	0	0	0.94	2976	0.00	-
D5	0	0	0	0	0	0	1.10	2880	0.00	-
D6	0	0	0	0	0	0	1.51	3024	0.00	-
D11	1	0	0	0	0	1	2.15	2912	3.20	1.00
D12	0	0	0	0	0	0	1.84	3088	0.00	-
D14	0	0	0	1	0	0	2.32	2928	1.47	0.00
D15	0	0	0	0	0	0	2.41	2784	0.00	-
D17	0	0	0	0	0	0	2.07	2656	0.00	-
D18	0	0	2	0	0	0	2.44	2672	3.07	0.00
D19	0	0	0	0	0	0	1.68	2704	0.00	-
D20	1	0	0	1	0	0	2.02	2624	3.78	1.00
Toplam	2	0	2	2	0	1	--	--	--	--
Ortalama	0.15	0.00	0.15	0.15	0.00	0.08	1.99	2850	0.89	0.4
Standart hata	0.10	0.00	0.15	0.10	0.00	0.08	0.16	43.44	0.41	

**Çizelge 4.5.** *Dictyostelium discoideum*'da belirlenen mutasyonların genomda yerleşimi ve neden oldukları değişiklikler

MA Sothattı	Kromozom: lokasyon	Mutasyon	Yerleşim	Kodon değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Gen	Mutasyon tipi
D11	3:6112244	G>C	Ekzon	GGT>GCT	Glisin>Alanin	-	nonsinonim
D11		A>G	Intergenik				
D14		C>A	Intergenik				
D18		A>T	Intergenik				
D18		T>A	Intergenik				
D20	1:1875399	T>C	Ekzon	AAT>AGT	Asparajin>Serin	-	nonsinonim
D20		G>T	Intergenik				

Uygulanan filtrelemeler sonucu analizlere dahil edilen 13 örnekten sadece 4'ünde toplam 5 insersiyon ve 3 delesyon belirlendi ve insersiyon/delesyon olayları için mutasyon hızı  $0.89 (SE=0.48) \times 10^{-11}$  olay/nesil olarak hesaplandı (Çizelge 4.6 ve EK-3). Elde edilen sonuçlar baz değişimi tipindeki mutasyonlarla uyumludur.

**Çizelge 4.6.** *Dictyostelium discoideum*'da belirlenen küçük insersiyon/delesyon olayları.

MA Soy hattı	Insertiyonlar	Delesyonlar	Bölge ( $\times 10^7$ )	Nesil sayısı	Indel Hızı ( $\times 10^{-11}$ ) /olay /nesil
D1	0	0	2.90	2784	0.00
D2	1	1	2.49	3024	2.65
D4	0	0	0.94	2976	0.00
D5	0	0	1.10	2880	0.00
D6	0	0	1.51	3024	0.00
D11	0	1	2.15	2912	1.60
D12	0	0	1.84	3088	0.00
D14	3	1	2.32	2928	5.89
D15	1	0	2.41	2784	1.49
D17	0	0	2.07	2656	0.00
D18	0	0	2.44	2672	0.00
D19	0	0	1.68	2704	0.00
D20	0	0	2.02	2624	0.00
Toplam	5	3	--	--	--
Ortalama	0.38	0.23	1.99	2850	0.89
Standart Hata	0.22	0.11	0.16	43.44	0.48

## 4.2. Tartışma

Mutasyon biriktirme deney sistemi ile tüm genom dizileme tekniklerinin beraber yürütüldüğü diğer projelerden elde edilen sonuçlar göstermektedir ki DNA`ya sahip mikroorganizmalar için belirlenen mutasyon hızı (mutasyon/nesil) ökaryotik ve prokaryotik mikro organizmalar arasında kabaca birbirine benzerdir (yaklaşık 0.003). Mutasyonların bu istikrarlı seviyesinden uzaklaşma sadece çok hücreli organizmalar ve küçük genoma sahip RNA virüslerinde görülür. Yüksek mutasyon hızının görüldüğü çok hücreli canlılar, nispeten daha küçük efektif populasyon büyüklüğü ya da daha uzun nesil süresine sahip olmaları nedeniyle somatik DNA`nın devamlılığını korumanın bedelini ödemelidirler. Büyük genomlara sahip ökaryotik canlılar ise prokaryotlara benzer mutasyon hızlarına (mutasyon/replikasyon) sahip olabilirler.

Bu çalışmada karmaşık hayat döngüsüne sahip mikrobiyal bir ökaryot olan *D.discoideum* genomunda spontan mutasyonların hızının belirlenmesi hedeflenmiştir. Tüm genom düzeyinde mutasyon hızı  $0.89 \times 10^{-11}$  olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç aynı yöntemin kullanıldığı ve diğer ökaryotik canlıların model olduğu çalışmalarda hesaplanan hızdan daha düşüktür (EK-4). *Dictyostelium discoideum* genom kompozisyonu diğer ökaryotik canlılarla karşılaştırıldığında sahip olduğu genlerin sadece %69`unun intron içerdiği ve ortalama intron büyüklüğünün, ortalama kodlayıcı bölge büyüklüğünün %10`ndan daha az olduğu görülebilir (Çizelge 2.3). Genomun büyük kısmının ifade ediliyor olması mutasyon hızının düşük tutulması yönünde seçilimsel bir baskı oluşturabilir. Bugün sahip olduğumuz bilgiler ışığında, benzer genom özelliklerine sahip diğer mikrobiyal ökaryotlarda da (*Paramecium tetraurelia* ve *C.reinhardtii*) hesaplanan mutasyon hızı oldukça düşüktür [9], [89]. Efektif populasyon büyüklüğü ve genomun kodlayıcı bölgeleri ile beraber ele alındığında *D.discoideum`da* hesaplanan mutasyon hızı genetik sürüklenme engeli hipotezi ile uyumludur.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, *D. discoideum*'da gerçekleşen spontan mutasyon olaylarında transversiyonlar transisyonlardan daha fazla görülmektedir, bu oldukça nadir gerçekleşen bir durumdur. Literatürde yer alan bilgilere göre, genomun AT içeriğinin etkisi olmaksızın, transisyon tipindeki mutasyonların görülme sıklığı transversiyonlardan fazladır [139]. Transisyon yönündeki eğilimin temel kaynağı olarak 5-mC'lerin timine dönüşmesi gösterilmektedir [140]. Ancak, *D. discoideum* genomunda bulunan sitozinlerin sadece %0.2'sinin metillendiği bilinmektedir [104]. Bu bilgilere ek olarak, Keller ve arkadaşları transisyon biyasinin evrensel olmadığını vurguladıkları çalışmalarında, C:G-T:A transisyonlarının analiz dışı bırakılmasıyla transversiyonlar yönünde biyas meydana geldiğini, bu durumda en sık gözlenen transversiyon olayının ise G:C-T:A (ikinci sırada ise A:T-T:A) olduğunu göstermişlerdir [140]. Bu sonuçlar, tez çalışmasında *D. discoideum*'da gözlenen transversiyon biyası ile uyumludur.

Daha önce aynı model organizmanın kullanıldığı benzer bir çalışmada Saxer ve arkadaşları sadece iki örneğin (MA soy hattı) tüm genomunu dizilemiş ve mutasyon hızını oldukça düşük ( $2.9 \times 10^{-11}$ ) olarak hesaplamışlardır [11]. Sonuçları bu tez çalışmasının sonuçlarıyla uyumludur, ancak elde ettikleri ortalama coverage değeri oldukça düşüktür (10X). Bu nedenle, kendilerinden sağlanan 20 MA soy hattına (1000.kuşak) ait DNA örneklerinin tüm genomu dizilenmiş ve sadece biyoinformatik analizleri tarafımızdan yapılarak sonuçların karşılaştırılması hedeflenmiştir (Bu örneklere ait sonuçlar EK-5'de verilmiştir).

Bugün pek çok laboratuvarında, bu tez çalışmasında kullanılan yöntemle benzer metotlarla mutasyon hızı hesaplanmaktadır. Ancak özellikle mikrobiyal ökaryotlarda hesaplanan mutasyon hızının beklenenden çok düşük çıkması ya da bakterilerle gerçekleştirilen deneylerde sonuçların tekrar edilememesi yöntemi tartışılır hale getirmektedir. Uygulanan yöntemin sınanması amacıyla, bu çalışmadan elde edilen sonuçların, aynı canlının aynı yöntemle kültürünü yapan

bir başka laboratuvardan edinilen sonuçlarla karşılaştırılması bakımından bu tez çalışması önem taşımaktadır.

Ancak her iki örnek grubunda, mutasyon hızının bir mikrobiyal ökaryot için beklenen değerden oldukça düşük olarak hesaplanması nedeniyle sonuçları açıklamak için iki temel soruya odaklanılabilir: 1) Çalışma sırasında izlenen yöntemde herhangi bir etken mutasyon hızının gerçek değerden daha az hesaplanmasına neden olabilir mi? 2) *D.discoideum*'da mutasyon hızının beklenenden daha düşük olmasının nedenleri nedir ve bu nedenleri destekleyen kanıtlar var mıdır?

Yöntemde gerçekleşen bir bias sonucu mutasyon hızının eksik hesaplanması birkaç faktörden kaynaklanabilir. Tüm deneyler laboratuvarda *D.discoideum* gelişimi için optimum kabul edilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. Dolayısıyla kültürlerin devam ettirildiği 14 ay boyunca *D.discoideum* doğal habitatında var olan patojen bakteriler ya da ultraviyole (U.V.) ışınları ve toprakta bulunabilen toksik bileşikler gibi DNA'ya zarar verme potansiyeline sahip herhangi bir etkenle karşılaşmamıştır. *D.discoideum*'un doğal çevresi oldukça mutajenik olabileceğinden doğal habitatında yaşayan yabancıl *D.discoideum*'da mutasyon hızı bu etkenler nedeniyle daha yüksek olabilir.

Mutasyon hızının beklenenden düşük hesaplanmasına neden olabilecek bir diğer yöntemsel bias çapraz kontaminasyon olasılığıdır. Bunun için önlem alınmıştır ancak gösterilen tüm hassasiyete karşın ilkin analizlerde bazı örneklerde ortak örüntüler gözlenmiştir. Bu nedenle 4 adet örnek analizlere dahil edilmemiştir. Tez çalışması kapsamında değerlendirilen tüm mutasyonlar soy hattına özgül olarak tanımlanmıştır.

Yapılan analizlerde kullanılan filtrelemelerde katı kurallar uygulanmıştır, bu nedenle mutasyon hızının eksik hesaplanması olasılığı vardır. Ancak tez çalışmasının biyoinformatik analizleri hususunda mutasyon hızının evrimi



hakkında tecrübe sahibi Prof.Dr. Michael Lynch ve Dr. Way Sung ile görüş alışverişlerinde bulunulmuştur (Dr.Lynch ve ekibi tarafından arasında ökaryot canlıların da bulunduğu pek çok organizmanın mutasyon hızına ait hesaplamalar yapılmıştır ve halen yapılmaktadır).

Genomda, özellikle tekrar bölgelerinde AT içeriğinin olağandışı fazlalığı ile beraber, benzerliği yüksek kısa dizilerin genomun birleştirilmesini zorlaştırması bir diğer yönetsel biyas olabilir. Ancak bu durum pek çok canlının genomu için geçerli bir sorundur. Bu dizilerin analiz dışı bırakılması ise hesaplamayı daha da eksik yapmaya ve dolayısıyla bir başka biyasa neden olacaktır. Ayrıca mutasyonların tekrar bölgelerinde çok görüldüğü gerçeği de bilinmektedir, bu durumda mutasyon hızının aynı yöntemle hesaplandığı tüm canlılar için bu biyas geçerlidir sonucuna varabiliriz.

Yöntemden kaynaklanan biyaslar dışında *D.discoideum*'un kendi doğası da mutasyon hızının beklenenden daha düşük olmasının nedeni olabilir. *D.discoideum*'un sosyal hayat döngüsü mutasyon hızının oldukça düşük olmasına katkıda bulunabilir. *D.discoideum*'un sahip olduğu genlerin azımsanamayacak bir kısmı (yaklaşık %25) çok hücreli safhaya geçişle alakalıdır, tek hücreli durumda hiç ifade edilmezler ancak spor kesesi oluşturulacağı zaman çokça ifade edilirler [141]. Tez çalışması sırasında gerçekleştirilen MA deneyi süresince hücreler hep vejetatif halde tutulmuş ve çok hücreli hale geçişlerine olanak tanınmamıştır. Ancak süreç boyunca çok hücreliliğe geçişte fenotiplerin değiştiği gözlenmiştir. Nesil sayısı arttıkça hücrelerin bir kısmının spor kesesi oluşumunu tamamlayamadığı görülmüştür. Dolayısıyla bazı soy hatlarında çok hücreliliğe geçişte görev yapan genlerde zararlı mutasyonların biriktiği önerilebilir. Dolayısıyla bu genlerde biriken mutasyonlar aslında deney süresince vejetatif üremeyi etkilemediklerinden gözlemlenebilmiştir.

Unutulmamalıdır ki, *D.discoideum*'un doğal ortamında olgun spor kesesi oluşurana kadar kaç hücre bölünmesinin gerekli olduğunu ya da her bir hücre bölünmesinde kaç mutasyon gerçekleştiğini henüz belirleyemiyoruz. Şüphesiz pek çok parametre bu sayıyı etkilemektedir. Ancak, spor kesesinin 10-100 hücre bölünmesi sonucunda oluştuğunu varsayarsak, bu durumda meydana getirilen her çok hücreli nesil için mutasyon hızı bizim hesapladığımızdan 10-100 kat fazla olmalıdır. Literatürde çok hücreli ökaryotların tek hücreli ökaryotlara kıyasla her bir hücre bölünmesinde daha az mutasyon geçirdiklerine dair kanıtlar mevcuttur. Hücrelerin çoğunda ifade edilmeyen çok hücreliliğe ait karakterlerin devamının sağlanması bunun nedeni olabilir.

Bahsedilenlere ek olarak, *D.discoideum*'un mutasyon hızının gerçekte de bu tez çalışmasında hesaplanan kadar düşük olabileceğini düşünebiliriz. Bu durumda *D.discoideum*'un mutasyon hızını düşük tutmak üzere geliştirmiş olabileceği stratejiler ve bu hipotezleri destekleyen kanıtlar tartışılmalıdır.

İlk olarak, genomda AT içeriğinin yüksek olması mutasyon hızının düşük olmasının sebebi olarak düşünülebilir. Pek çok canlıda GC bölgeleri AT bölgelerine kıyasla mutasyon oluşumuna daha yatkındır. Sitozin metilasyonu ve guaninin oksidatif hasara ve lezyonlar oluşturmaya diğer nükleotitlere kıyasla daha yatkın olması mutasyonların GC bölgelerinde daha sık görülmesiyle sonuçlanır. Mutagenez mekanizmasının ayrıntılı çalışıldığı canlılarda, özellikle insan, maya ve *E.coli*'de en sık rastlanan lezyonlar depürinasyon, 7-metil guanin ve 8-oxoguanin oluşumudur [142].

İkinci olarak, mutasyonların çoğu uyum başarısı üzerinde zararlı etkilere sahip oldukları için doğal seçim, genellikle replikasyon hataları oluşumunun asgari düzeyde tutulması (daha yüksek doğrulukta çalışan enzimler) ve DNA onarımının etkinliğinin en üst düzeyde olmasını (geliştirilmiş onarım enzimleri) sağlamak üzere çalışacaktır [37], [143]. *D.discoideum* ökaryotik organizmalar arasında en düşük nükleotit çeşitliliğinin gözlemlendiği türlerden biridir. Geniş bir coğrafi aralıktan

izole edilen (genetik açıdan birbirine uzak) yabancı tip suşlar arasında bile çok az sayıda mutasyon tanımlanabilmiştir. Yapılan hesaplamalara göre genomda yaklaşık 27.000 SNP bulunur [137]. Varyasyonun bu kadar düşük olmasının sebebi açık değildir. Mutasyon hızının düşüklüğü, küçük Ne değeri ile populasyonun dengede olması ya da son dönemde gerçekleşen bir populasyon darboğazı olayı ile açıklanabilir.

Mutasyon hızını düşük tutmak üzere replikasyon enzimlerinin doğruluğunun artırılması enzimlerin amino asit dizilimindeki modifikasyonlar aracılığıyla başarılabilir. DNA replikasyonunda doğrudan görev alan alfa ( $\alpha$ ), delta ( $\delta$ ), epsilon ( $\epsilon$ ) ve zeta ( $\zeta$ ) enzimlerini kapsayan DNA polimeraz Beta ( $\beta$ ) ailesi mutasyon hızı üzerinde doğrudan etkiye sahiptir [144], [145]. DNA polimeraz Beta ( $\beta$ ) ailesi, replikasyonun başlatılması, kesintili ve kesintisiz zincirin sentezi ve lezyonlardaki DNA'nın sentezi gibi işlevlere sahiptirler [144], [146]. DNA'nın her iki zincirinin sentezine ek olarak,  $\delta$  ve  $\epsilon$  DNA polimerazları yanlış polimerize olan nükleotitlerin diziden uzaklaştırılmasını sağlayan 3' ekzonükleaz (hata okuma) aktivitesine de sahiptir [147]. *D. discoideum*'da replikasyonun doğruluğunun artırılması yoluyla mutasyon hızının düşük tutulabileceği hipotezini sınamak amacıyla BLAST programı kullanılarak replikasyonda doğrudan görev aldığı bilinen  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  ve  $\zeta$  enzimlerine ait amino asit dizileri diğer ökaryotik organizmalara ait dizilerle karşılaştırıldı. Enzimlerin sadece katalitik bölgelerine ait karşılaştırma sonuçları EK-6'de verildi.

Diğer ökaryotlarda oldukça korunmuş olan DNA polimeraz  $\alpha$  altbiriminin katalitik bölgesinde threonin amino asidinin izolösine (T992I) ve  $\epsilon$  altbiriminin 3'-5' ekzonükleaz (hata okuma) altbiriminin substrat ile ilişki kurduğu bölgede fenilalanin amino asidinin metiyonin (F364M) amino asidine dönüştüğü belirlendi. Her iki durumda da amino asitlerin farklı polaritelere sahip olması nedeniyle protein katlanması ve dolayısıyla enzim işlevi etkilenebilir. Ayrıca bahsi geçen değişiklikler sadece *Dictyostelium discoideum* ve *D. purpureum*'da gözlenmeleri nedeniyle soya özgül bir modifikasyon ihtimali de düşünülmelidir. Diğer

ökaryotlarda oldukça korunmuş olan amino asit dizilerinin karşılaştırılması sonucunda *Dictyostelium discoideum*'da gözlenen bazı değişikliklerin enzimin yapısına, katlanmasına ve işlevine nasıl etki ettiğinin anlaşılabilmesi için potteinlerin modelleri oluşturuldu (EK-6). Amino asit dizilerinde saptanan değişikliklerin kimi zaman beklenen etkiyi yaratmayabileceği (enzimin doğruluğunu arttıramayabilir ya da daha düşük mutasyon hızlarına neden olmayabilir) unutulmamalıdır. Ancak incelenen diğer ökaryotik canlılarda (Ciliate'lar hariç) oldukça korunmuş olan bu bölgelerin değişimi kayda değerdir.

*D.discoideum* doğal yaşam ortamının oldukça mutajenik olması nedeniyle, mutasyon hızı, genom büyüklüğü ve etkin populasyon büyüklüğünü dengede tutabilmelidir. Bu dengeyi sağlamak için replikasyon doğruluğunun artırılmasının yanı sıra *D.discoideum*'un geliştirebileceği diğer taktik etkin DNA onarım sistemlerine sahip olmaktır. Yanlış eşleşme onarım sistemi prokaryotlarda ve ökaryotlarda replikasyonun doğruluğunu 50 ila 1000 kat arttırabilir [142]. MMR sisteminin başlatılmasından sorumlu olan MutS ve MutL proteinlerinin ökaryotlarda çok sayıda homoloğu tanımlanmıştır. Ökaryotik türlerle yapılan karşılaştırmalı analiz sonucuna göre, *D.discoideum*'un da dahil olduğu mikrobiyal ökaryotlar MutS ve MutL proteinlerinin ökaryotlarda tanımlanmış tüm homologlarına sahiptirler [148]. Etkin çalışan bir MMR yolağı genomun kararlılığına katkıda bulunacaktır. McConnel [149], *D.discoideum*'un etkin DNA onarım sisteminin toprakta yaşaması, aynı ortamı paylaştığı mikroorganizmaların salgıladığı DNA hasarı oluşturacak bileşiklerle temasta olması ve avcı yaşam tarzının sonucu olarak gelişen bir adaptasyon olabileceği öne sürülmektedir. *D.discoideum*'da SSR bölgelerinde mutasyon hızının oldukça düşük olmasını, replikasyon sırasında SSR bölgelerinde gerçekleşmesi muhtemel kayma olayları ile MMR sisteminin etkinliği arasındaki dengeyle açıklamıştır.

Bu tez çalışmasında bir model organizma olan *D.discoideum*'da spontan mutasyonların hızı ve genomda dağılımı belirlenerek sonuçları değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *D. discoideum*'da gözlenen mutasyon hızının Drake kuralına uymadığı belirlenmiştir. *D.discoideum* ve Drake kuralına uymayan diğer mikrobiyal ökaryotların uyum başarısını etkileyecek olmasına karşın, mutasyon hızını oldukça düşük tutmak üzere evrimleştiklerinin nedeni açık değildir. Gelecekte bu tip çalışmalardan elde edilen verilerin artmasıyla, mutasyon hızının limitlerini şüphesiz daha iyi şekilde hesaplayabileceğiz ve evrimsel biyolojide anlaşılması en zor parametrelerden birini daha iyi anlama şansına sahip olacağız.

## KAYNAKLAR

- [1] Lewontin R. C. and Hubby J. L., “A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*,” *Genetics*, vol. 54, pp. 595–609, **1966**.
- [2] Kimura M., “Evolutionary rate at the molecular level.,” *Nature*, vol. 217, pp. 624–626, **1968**.
- [3] Sturtevant A. H., “Essays on Evolution. I. On the Effects of Selection on Mutation Rate,” *The Quarterly Review of Biology*, vol. 12. p. 464, **1937**.
- [4] Baer C. F., Miyamoto M. M., and Denver D. R., “Mutation rate variation in multicellular eukaryotes: causes and consequences.,” *Nature Reviews of Genetics*, vol. 8, pp. 619–631, **2007**.
- [5] Kondrashov F. A. and Kondrashov A. S., “Measurements of spontaneous rates of mutations in the recent past and the near future.,” *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 365, pp. 1169–1176, **2010**.
- [6] Drake J. W., Charlesworth B., Charlesworth D., and Crow J. F., “Rates of spontaneous mutation,” *Genetics*, vol. 148, pp. 1667–1686, **1998**.
- [7] Eyre-Walker A. and Keightley P. D., “The distribution of fitness effects of new mutations,” *Nature Reviews of Genetics*, vol. 8, no. 615, pp. 610–618, **2007**.
- [8] Ossowski S., Schneeberger K., Lucas-Lledó J. I., Warthmann N., Clark R. M., Shaw R. G., Weigel D., and Lynch M., “The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in *Arabidopsis thaliana*.,” *Science*, vol. 327, pp. 92–94, **2010**.
- [9] Sung W., Tucker A. E., Doak T. G., Choi E., W. K. Thomas, and Lynch M., “Extraordinary genome stability in the ciliate *Paramecium tetraurelia*.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.*, vol. 109, pp. 19339–44, **2012**.
- [10] Lynch M., Sung W., Morris K., Coffey N., Landry C. R., Dopman E. B., Dickinson W. J., Okamoto K., Kulkarni S., Hartl D. L., and Thomas W. K., “A genome-wide view of the spectrum of spontaneous mutations in yeast.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.*, vol. 105, pp. 9272–9277, **2008**.

- [11] Saxer G., Havlak P., Fox S. A., Quance M. A., Gupta S., Fofanov Y., Strassmann J. E., and Queller D. C., "Whole Genome Sequencing of Mutation Accumulation Lines Reveals a Low Mutation Rate in the Social Amoeba *Dictyostelium discoideum*," *PLoS One*, vol. 7, **2012**.
- [12] Futuyma D.J., *Evolution*, Third edition, Sinauer Associates, Inc., **2013**.
- [13] Friedberg E., Schultz R., Siede W., and Walker G., *DNA repair and mutagenesis*, 2<sup>nd</sup> edition, ASM Press, **2006**.
- [14] Sadava D.E., Hillis D.M., Heller H.C., and Berenbaum M., *Life: The Science of Biology*, 10th edition, W.H. Freeman, **2012**.
- [15] Drost J. B. and Lee W. R., "Biological basis of germline mutation: Comparisons of spontaneous germline mutation rates among *Drosophila*, mouse, and human," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 25, pp. 48–64, **1995**.
- [16] Waters L. S. and Walker G. C., "The critical mutagenic translesion DNA polymerase Rev1 is highly expressed during G(2)/M phase rather than S phase.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.*, vol. 103, no. 24, pp. 8971–6, **2006**.
- [17] Shen J. C., Rideout W. M., and Jones P. A., "The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA.," *Nucleic Acids Research*, vol. 22, pp. 972–976, **1994**.
- [18] Denver D. R., Dolan P. C., Wilhelm L. J., Sung W., Lucas-Lledó J. I., Howe D. K., Lewis S. C., Okamoto K., Thomas W. K., Lynch M., and Baer C. F., "A genome-wide view of *Caenorhabditis elegans* base-substitution mutation processes.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.*, vol. 106, pp. 16310–16314, **2009**.
- [19] Keightley P. D., Trivedi U., Thomson M., Oliver F., Kumar S., and Blaxter M. L., "Analysis of the genome sequences of three *Drosophila melanogaster* spontaneous mutation accumulation lines," *Genome Research*, vol. 19, pp. 1195–1201, **2009**.
- [20] Kunkel T. A., "Mutational specificity of depurination.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.*, vol. 81, pp. 1494–1498, **1984**.
- [21] Bruskov V. I., Malakhova L. V, Masalimov Z. K., and Chernikov A. V, "Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA.," *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 6, pp. 1354–63, Mar. **2002**.

- [22] Grogan D. W., Carver G. T., and Drake J. W., "Genetic fidelity under harsh conditions: analysis of spontaneous mutation in the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.*, vol. 98, pp. 7928–7933, **2001**.
- [23] Mackwan R. R., Carver G. T., Kissling G. E., Drake J. W., and Grogan D. W., "The rate and character of spontaneous mutation in *Thermus thermophilus*," *Genetics*, vol. 180, pp. 17–25, **2008**.
- [24] Loh E., Choe J., and Loeb L. A., "Highly tolerated amino acid substitutions increase the fidelity of *Escherichia coli* DNA polymerase I," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, pp. 12201–12209, **2007**.
- [25] Storz G., Christman M. F., Sies H., and Ames B. N., "Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.*, vol. 84, pp. 8917–8921, **1987**.
- [26] Kondrashov A. S., "Modifiers of Mutation-Selection Balance - General-Approach and the Evolution of Mutation-Rates," *Genetic Research*, vol. 66, pp. 53–69, **1995**.
- [27] Dawson K. J., "Evolutionarily stable mutation rates," *Journal of Theoretical Biology*, vol. 194, pp. 143–157, **1998**.
- [28] Allen Orr H., "The rate of adaptation in asexuals," *Genetics*, vol. 155, pp. 961–968, **2000**.
- [29] Taddei F., Radman M., Maynard-Smith J., Toupance B., Gouyon P. H., and Godelle B., "Role of mutator alleles in adaptive evolution," *Nature*, vol. 387, pp. 700–702, **1997**.
- [30] Lynch M., "The lower bound to the evolution of mutation rates," *Genome Biology and Evolution*, vol. 3, pp. 1107–1118, **2011**.
- [31] Sung W., Ackerman M. S., Miller S. F., Doak T. G., and Lynch M., "Drift-barrier hypothesis and mutation-rate evolution," *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.*, vol. 109, no. 45, pp. 18488–92, **2012**.
- [32] Gillman L. N., Keeling D. J., Gardner R. C., and Wright S. D., "Faster evolution of highly conserved DNA in tropical plants," *Journal of Evolutionary Biology*, vol. 23, pp. 1327–1330, **2010**.
- [33] Martin A. P. and Palumbi S. R., "Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock," vol. 90, pp. 4087–4091, **1993**.



- [34] Herr A. J., Williams L. N., and Preston B. D., "Antimutator variants of DNA polymerases," *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. pp. 1–23, **2011**.
- [35] Reha-Krantz L. J., "Regulation of DNA polymerase exonucleolytic proofreading activity: studies of bacteriophage T4 'antimutator' DNA polymerases.," *Genetics*, vol. 148, no. 4, pp. 1551–7, **1998**.
- [36] Quiñones A. and Piechocki R., "Isolation and characterization of Escherichia coli antimutators. A new strategy to study the nature and origin of spontaneous mutations.," *Molecular and General Genetics*, vol. 201, no. 2, pp. 315–22, **1985**.
- [37] Lynch M., "Evolution of the mutation rate.," *Trends in Genetics*, vol. 26, no. 8, pp. 345–52, **2010**.
- [38] Farr S. B., D'Ari R., and Touati D., "Oxygen-dependent mutagenesis in Escherichia coli lacking superoxide dismutase.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.*, vol. 83, pp. 8268–8272, **1986**.
- [39] Hebert P. D. N., Remigio E. A., Colbourne J. K., Taylor D. J., and Wilson C. C., "Accelerated molecular evolution in halophilic crustaceans.," *Evolution*, vol. 56, pp. 909–926, **2002**.
- [40] Wright S. D., Gray R. D., and Gardner R. C., "Energy and the rate of evolution: inferences from plant rDNA substitution rates in the western Pacific.," *Evolution*, vol. 57, no. 12, pp. 2893–8, **2003**.
- [41] Lee H., Popodi E., Tang H., and Foster P. L., "Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium Escherichia coli as determined by whole-genome sequencing.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.*, vol. 109, no. 41, pp. E2774–83, **2012**.
- [42] Sung W., Ackerman M. S., Gout J.-F., Miller S. F., Williams E., Foster P. L., and Lynch M., "Asymmetric Context-Dependent Mutation Patterns Revealed through Mutation-Accumulation Experiments.," *Molecular Biology and Evolution*, p. msv055–, **2015**.
- [43] Mukai T., "Viability mutations induced by ethyl methanesulfonate in Drosophila melanogaster.," *Genetics*, vol. 65, no. 2, pp. 335–48, **1970**.
- [44] Lynch M., Blanchard J., Houle D., Kibota T., Schultz S., Vassilieva L., and Willis J., "Spontaneous deleterious mutation," *Evolution (N. Y.)*, vol. 53, pp. 645–663, **1999**.

- [45] Lynch M., "Rate, molecular spectrum, and consequences of human mutation.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.*, vol. 107, pp. 961–968, **2010**.
- [46] Emerson J. J., Cardoso-Moreira M., Borevitz J. O., and Long M., "Natural selection shapes genome-wide patterns of copy-number polymorphism in *Drosophila melanogaster*," *Science*, vol. 320, pp. 1629–1631, **2008**.
- [47] Drake J. W., "A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.*, vol. 88, pp. 7160–7164, **1991**.
- [48] Patrushev L. I. and Minkevich I. G., "The problem of the eukaryotic genome size.," *Biochemistry. (Mosc.)*, vol. 73, pp. 1519–1552, **2008**.
- [49] Heddle J. A. and Athanasiou K., "Mutation rate, genome size and their relation to the rec concept.," *Nature*, vol. 258, no. 5533, pp. 359–61, **1975**.
- [50] Luria S. E. and Delbrück M., "Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance.," *Genetics*, vol. 28, pp. 491–511, **1943**.
- [51] Lea D. E. and Coulson C. A., "The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations," *Journal of Genetics*, vol. 49, pp. 264–285, **1949**.
- [52] Foster P. L., "Methods for determining spontaneous mutation rates.," *Methods in Enzymology*, vol. 409, pp. 195–213, **2006**.
- [53] Drake J. W., *The molecular basis of mutation*, First edition, Holden-Day, **1970**.
- [54] Sarkar S., Ma W. T., and Sandri G. H., "On fluctuation analysis: a new, simple and efficient method for computing the expected number of mutants.," *Genetica*, vol. 85, no. 2, pp. 173–9, **1992**.
- [55] Keightley P. D. and Eyre-Walker A., "Terumi Mukai and the Riddle of Deleterious Mutation Rates," *Genetics*, vol. 153, pp. 515–523, **1999**.
- [56] Lynch M., "The origins of eukaryotic gene structure," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 23, pp. 450–468, **2006**.
- [57] Lynch M., Koskella B., and Schaack S., "Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture.," *Science*, vol. 311, pp. 1727–1730, **2006**.
- [58] Keightley P. D. and Halligan D. L., "Analysis and implications of mutational variation," *Genetica*, vol. 136, pp. 359–369, **2009**.

- [59] Kondrashov A. S., "Measuring spontaneous deleterious mutation process.," *Genetica*, vol. 102–103, pp. 183–197, **1998**.
- [60] Fu Y. X. and Huai H., "Estimating mutation rate: How to count mutations?," *Genetics*, vol. 164, pp. 797–805, **2003**.
- [61] Sommer S. S., "Recent human germ-line mutation: inferences from patients with hemophilia B.," *Trends in Genetics*, vol. 11, pp. 141–147, **1995**.
- [62] Sommer S. S. and Ketterling R. P., "The factor IX gene as a model for analysis of human germline mutations: an update.," *Human Molecular Genetics*, vol. 5 Spec No, pp. 1505–1514, **1996**.
- [63] Kondrashov A. S., "Direct estimates of human per nucleotide mutation rates at 20 loci causing mendelian diseases," *Human Mutation*, vol. 21, pp. 12–27, **2003**.
- [64] Schrag S. J., Rota P. A., and Bellini W. J., "Spontaneous mutation rate of measles virus: direct estimation based on mutations conferring monoclonal antibody resistance.," *Journal of Virology*, vol. 73, pp. 51–54, **1999**.
- [65] Yang H. P., Tanikawa A. Y., and Kondrashov A. S., "Molecular nature of 11 spontaneous de novo mutations in *Drosophila melanogaster*," *Genetics*, vol. 157, pp. 1285–1292, **2001**.
- [66] Mukai T., Chigusa S. I., Mettler L. E., and Crow J. F., "Mutation rate and dominance of genes affecting viability in *Drosophila melanogaster*," *Genetics*, vol. 72, pp. 335–355, **1972**.
- [67] Fernández J. and López-Fanjul C., "Spontaneous mutational variances and covariances for fitness-related traits in *Drosophila melanogaster*," *Genetics*, vol. 143, pp. 829–837, **1996**.
- [68] Kibota T. T. and Lynch M., "Estimate of the genomic mutation rate deleterious to overall fitness in *E. coli*," *Nature*, vol. 381, pp. 694–696, **1996**.
- [69] Keightley P. D. and Caballero A., "Genomic mutation rates for lifetime reproductive output and lifespan in *Caenorhabditis elegans*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.*, vol. 94, pp. 3823–3827, **1997**.
- [70] Schultz S. T., Lynch M., and Willis J. H., "Spontaneous deleterious mutation in *Arabidopsis thaliana*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.*, vol. 96, pp. 11393–11398, **1999**.

- [71] Roles A. J. and Conner J. K., "Fitness effects of mutation accumulation in a natural outbred population of wild radish (*Raphanus raphanistrum*): comparison of field and greenhouse environments.," *Evolution*, vol. 62, no. 5, pp. 1066–75, **2008**.
- [72] Shabalina S. A., Yampolsky L.Y., and Kondrashov A. S., "Rapid decline of fitness in panmictic populations of *Drosophila melanogaster* maintained under relaxed natural selection.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.*, vol. 94, pp. 13034–13039, **1997**.
- [73] Nachman M. W. and Crowell S. L., "Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans," *Genetics*, vol. 156, pp. 297–304, **2000**.
- [74] Kumar S. and Subramanian S., "Mutation rates in mammalian genomes.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.*, vol. 99, pp. 803–808, **2002**.
- [75] Mitchell A. and Graur D., "Inferring the pattern of spontaneous mutation from the pattern of substitution in unitary pseudogenes of *Mycobacterium leprae* and a comparison of mutation patterns among distantly related organisms.," *Journal of Molecular Evolution*, vol. 61, no. 6, pp. 795–803, **2005**.
- [76] Eyre-Walker A. and Keightley P. D., "High genomic deleterious mutation rates in hominids.," *Nature*, vol. 397, pp. 344–347, **1999**.
- [77] Keightley P. D. and Eyre-Walker A., "Deleterious mutations and the evolution of sex.," *Science*, vol. 290, pp. 331–333, **2000**.
- [78] Cutter A. D. and Payseur B. A., "Rates of deleterious mutation and the evolution of sex in *Caenorhabditis*.," *Journal of Evolutionary Biology*, vol. 16, pp. 812–822, **2003**.
- [79] Kondrashov A. S., "Sex and U," *Trends in Genetics*, vol. 17, pp. 75–77, **2001**.
- [80] Deng H. W. and Lynch M., "Estimation of deleterious-mutation parameters in natural populations," *Genetics*, vol. 144, pp. 349–360, **1996**.
- [81] Li J. and Deng H.-W., "Estimation of the rate and effects of deleterious genomic mutations in finite populations with linkage disequilibrium.," *Heredity (Edinb)*, vol. 95, pp. 59–68, **2005**.
- [82] Messer P. W., "Measuring the rates of spontaneous mutation from deep and large-scale polymorphism data," *Genetics*, vol. 182, pp. 1219–1232, **2009**.

- [83] Caballero A., “Estimation of the upper limit of the mutation rate and mean heterozygous effect of deleterious mutations.,” *Genetic Research*, vol. 88, pp. 137–141, **2006**.
- [84] Charlesworth B., Charlesworth D., and Morgan M. T., “Genetic loads and estimates of mutation rates in highly inbred plant populations,” *Nature*, vol. 347, no. 6291, pp. 380–382, **1990**.
- [85] Ohnishi O., “Spontaneous and ethyl methanesulfonate-induced mutations controlling viability in *Drosophila melanogaster*. III. Heterozygous effect of polygenic mutations,” *Genetics*, vol. 87, pp. 547–556, **1977**.
- [86] Keightley P. D. and Ohnishi O., “EMS-induced polygenic mutation rates for nine quantitative characters in *Drosophila melanogaster*,” *Genetics*, vol. 148, pp. 753–766, **1998**.
- [87] Yang H. P., Tanikawa A. Y., Van Voorhies W. A., Silva J. C., and Kondrashov A. S., “Whole-genome effects of ethyl methanesulfonate-induced mutation on nine quantitative traits in outbred *Drosophila melanogaster*,” *Genetics*, vol. 157, pp. 1257–1265, **2001**.
- [88] Lynch M., Sung W., Morris K., Coffey N., Landry C. R., Dopman E. B., Dickinson W. J., Okamoto K., Kulkarni S., Hartl D. L., and Thomas W. K., “A genome-wide view of the spectrum of spontaneous mutations in yeast,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.*, vol. 105, pp. 9272–9277, **2008**.
- [89] Sung W., Ackerman M. S., Miller S. F., Doak T. G., and Lynch M., “Drift-barrier hypothesis and mutation-rate evolution,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.*, vol. 109, pp. 18488–18492, **2012**.
- [90] Otto S. P. and Lenormand T., “Resolving the paradox of sex and recombination.,” *Nature Reviews of Genetics*, vol. 3, pp. 252–261, **2002**.
- [91] Kondrashov A. S. and Crow J. F., “Haploidy or diploidy: which is better?,” *Nature*, vol. 351, pp. 314–315, **1991**.
- [92] Gerstein A. C. and Otto S. P., “Ploidy and the causes of genomic evolution,” *Journal of Heredity*, vol. 100, pp. 571–581, **2009**.
- [93] Lynch M., Conery J., and Burger R., “Mutation Accumulation and the Extinction of Small Populations,” *The American Naturalist*, vol. 146, p. 489, **1995**.

- [94] Clarke D. K., Duarte E. A., Moya A., Elena S. F., Domingo E., and Holland J., “Genetic bottlenecks and population passages cause profound fitness differences in RNA viruses.,” *Journal of Virology*, vol. 67, pp. 222–228, **1993**.
- [95] Dillon M. M., Sung W., Lynch M., and Cooper V. S., “The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the GC-rich multi-chromosome genome of *Burkholderia cenocepacia*,” *Cold Spring Harbor Labs Journals*, **2014**.
- [96] Roach J. C., Glusman G., Smit A. F. A., Huff C. D., Hubley R., Shannon P. T., Rowen L., Pant K. P., Goodman N., Bamshad M., Shendure J., Drmanac R., Jorde L. B., Hood L., and Galas D. J., “Analysis of genetic inheritance in a family quartet by whole-genome sequencing.,” *Science*, vol. 328, pp. 636–639, **2010**.
- [97] Xu S., Schaack S., Seyfert A., Choi E., Lynch M., and Cristescu M. E., “High mutation rates in the mitochondrial genomes of *Daphnia pulex*.,” *Molecular Biology and Evolution*, vol. 29, no. 2, pp. 763–9, **2012**.
- [98] Kessin R. H., *Dictyostelium: Evolution, Cell Biology, and the Development of Multicellularity*, First edition, Cambridge University Press, **2001**.
- [99] Fiore-Donno A. M., Nikolaev S. I., Nelson M., Pawlowski J., Cavalier-Smith T., and Baldauf S. L., “Deep phylogeny and evolution of slime moulds (mycetozoa).,” *Protist*, vol. 161, no. 1, pp. 55–70, **2010**.
- [100] Fiore-Donno A.-M., Berney C., Pawlowski J., and Baldauf S. L., “Higher-order phylogeny of plasmodial slime molds (Myxogastria) based on elongation factor 1-A and small subunit rRNA gene sequences.,” *Journal of Eukaryotic Microbiology*, vol. 52, no. 3, pp. 201–10, **2005**.
- [101] Eichinger L., Pachebat J. A., Glöckner G., Rajandream M.-A., Sucgang R., Berriman M., Song J., Olsen R., Szafranski K., Xu Q., et al., “The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*.,” *Nature*, vol. 435, pp. 43–57, **2005**.
- [102] Konijn T. M., Van De Meene J. G., Bonner J. T., and Barkley D. S., “The acrasin activity of adenosine-3',5'-cyclic phosphate.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.*, vol. 58, no. 3, pp. 1152–4, **1967**.
- [103] Smith S. S. and Ratner D. I., “Lack of 5-methylcytosine in *Dictyostelium discoideum* DNA.,” *Biochemistry Journal*, vol. 277, pp. 273–5, **1991**.
- [104] Kuhlmann M., Borisova B. E., Kaller M., Larsson P., Stach D., Na J., Eichinger L., Lyko F., Ambros V., Söderbom F., Hammann C., and Nellen

- W., "Silencing of retrotransposons in Dictyostelium by DNA methylation and RNAi.," *Nucleic Acids Research*, vol. 33, no. 19, pp. 6405–17, **2005**.
- [105] Katoh M., Curk T., Xu Q., Zupan B., Kuspa A., and Shaulsky G., "Developmentally regulated DNA methylation in Dictyostelium discoideum.," *Eukaryotic Cell*, vol. 5, no. 1, pp. 18–25, **2006**.
- [106] Schlötterer C., "Evolutionary dynamics of microsatellite DNA.," *Chromosoma*, vol. 109, no. 6, pp. 365–71, **2000**.
- [107] Karlin S. and Burge C., "Trinucleotide repeats and long homopeptides in genes and proteins associated with nervous system disease and development.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.*, vol. 93, no. 4, pp. 1560–5, **1996**.
- [108] Suggang R., Kuo A., Tian X., Salerno W., Parikh A., Feasley C. L., Dalin E., Tu H., Huang E., Barry K. et al., "Comparative genomics of the social amoebae Dictyostelium discoideum and Dictyostelium purpureum.," *Genome Biology*, vol. 12, no. 2, p. R20, **2011**.
- [109] Li Y.-C., Korol A. B., Fahima T., and Nevo E., "Microsatellites within genes: structure, function, and evolution.," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 21, no. 6, pp. 991–1007, **2004**.
- [110] Glöckner G., Szafranski K., Winckler T., Dingermann T., Quail M. A., Cox E., Eichinger L., Noegel A. A., and Rosenthal A., "The complex repeats of Dictyostelium discoideum.," *Genome Research*, vol. 11, no. 4, pp. 585–94, **2001**.
- [111] Glöckner G., Eichinger L., Szafranski K., Pachebat J. A., Bankier A. T., Dear P. H., Lehmann R., Baumgart C., G. Parra, J. F. Abril, R. Guigó, K. Kumpf, B. Tunggal, E. Cox, M. A. Quail, M. Platzer, A. Rosenthal, and A. A. Noegel, "Sequence and analysis of chromosome 2 of Dictyostelium discoideum.," *Nature*, vol. 418, no. 6893, pp. 79–85, **2002**.
- [112] Burger G., Plante I., Lonergan K. M., and Gray M. W., "The mitochondrial DNA of the amoeboid protozoon, Acanthamoeba castellanii: complete sequence, gene content and genome organization.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 245, no. 5, pp. 522–37, **1995**.
- [113] Ogawa S., Yoshino R., Angata K., Iwamoto M., Pi M., Kuroe K., Matsuo K., Morio T., Urushihara H., Yanagisawa K., and Tanaka Y., "The mitochondrial DNA of Dictyostelium discoideum: complete sequence, gene content and genome organization.," *Molecular and General Genetics*, vol. 263, no. 3, pp. 514–9, **2000**.

- [114] Sucgang R., Chen G., Liu W., Lindsay R., Lu J., Muzny D., Shaulsky G., Loomis W., Gibbs R., and Kuspa A., "Sequence and structure of the extrachromosomal palindrome encoding the ribosomal RNA genes in *Dictyostelium*," *Nucleic Acids Research*, vol. 31, no. 9, pp. 2361–8, **2003**.
- [115] Szafranski K., Dingermann T., Glöckner G., and Winckler T., "Template jumping by a LINE reverse transcriptase has created a SINE-like 5S rRNA retroseudogene in *Dictyostelium*," *Molecular Genetics and Genomics*, vol. 271, no. 1, pp. 98–102, **2004**.
- [116] Eichler E. E. and Sankoff D., "Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution," *Science*, vol. 301, no. 5634, pp. 793–7, **2003**.
- [117] Cappello J., Handelsman K., and Lodish H. F., "Sequence of *Dictyostelium* DIRS-1: an apparent retrotransposon with inverted terminal repeats and an internal circle junction sequence," *Cell*, vol. 43, no. 1, pp. 105–15, **1985**.
- [118] Loomis W. F., Welker D., Hughes J., Maghakian D., and Kuspa A., "Integrated maps of the chromosomes in *Dictyostelium discoideum*," *Genetics*, vol. 141, no. 1, pp. 147–57, **1995**.
- [119] Goodwin T. J. and Poulter R. T., "Multiple LTR-retrotransposon families in the asexual yeast *Candida albicans*," *Genome Research*, vol. 10, no. 2, pp. 174–91, **2000**.
- [120] Anonim, *Dictyostelium discoideum* AX4 (ID 56) - Genome - NCBI, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/56?genome\\_assembly\\_id=22720](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/56?genome_assembly_id=22720) (Haziran, **2015**).
- [121] Anonim, dictyBase Home, <http://dictybase.org> (Haziran **2015**).
- [122] Thomason P. A., "An intersection of the cAMP/PKA and two-component signal transduction systems in *Dictyostelium*," *EMBO J.*, vol. 17, no. 10, pp. 2838–2845, **1998**.
- [123] Maeda M., Lu S., Shaulsky G., Miyazaki Y., Kuwayama H., Tanaka Y., Kuspa A., and Loomis W. F., "Periodic signaling controlled by an oscillatory circuit that includes protein kinases ERK2 and PKA," *Science*, vol. 304, no. 5672, pp. 875–8, **2004**.
- [124] Soler-Lopez M., Petosa C., Fukuzawa M., Ravelli R., Williams J. G., and Müller C. W., "Structure of an activated *Dictyostelium* STAT in its DNA-unbound form," *Molecular Cell*, vol. 13, no. 6, pp. 791–804, **2004**.
- [125] Anonim, Genome List, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/> (Haziran, **2015**).



- [126] Margulies M., Egholm M., Altman W. E., Attiya S., Bader J. S., Bemben L. A., Berka J., Braverman M. S., Chen Y.-J., Chen Z. et al., "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors.," *Nature*, vol. 437, pp. 376–380, **2005**.
- [127] Bentley D. R., Balasubramanian S., Swerdlow H. P., Smith G. P., Milton J., Brown C. G., Hall K. P., Evers D. J., Barnes C. L., Bignell H. R., Boutell J. M. et al., "Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry.," *Nature*, vol. 456, pp. 53–59, **2008**.
- [128] Scheibye-Asing K., Hoffmann S., Frankel A., Jensen P., Stadler P. F., Mang Y., Tommerup N., Gilchrist M. J., Nygård A.-B., Cirera S., Jørgensen C. B., Fredholm M., and Gorodkin J., "Sequence assembly.," *Computational Biology and Chemistry*, vol. 33, no. 2, pp. 121–36, **2009**.
- [129] Galardini M., Biondi E. G., Bazzicalupo M., and Mengoni A., "CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes.," *Biological Medicine*, vol. 6, no. 1, p. 11, **2011**.
- [130] Dias Z., Dias U., and Setubal J. C., "SIS: a program to generate draft genome sequence scaffolds for prokaryotes.," *BMC Bioinformatics*, vol. 13, no. 1, p. 96, **2012**.
- [131] Gordon D., Abajian C., and Green P., "Consed: a graphical tool for sequence finishing.," *Genome Research*, vol. 8, no. 3, pp. 195–202, **1998**.
- [132] Bartels D., Kespohl S., Albaum S., Drücke T., Goesmann A., Herold J., Kaiser O., Pühler A., Pfeiffer F., Raddatz G., Stoye J., Meyer F., and Schuster S. C., "BACCardl - A tool for the validation of genomic assemblies, assisting genome finishing and intergenome comparison," *Bioinformatics*, vol. 21, pp. 853–859, **2005**.
- [133] Li H. and Durbin R., "Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform.," *Bioinformatics*, vol. 25, no. 14, pp. 1754–60, Jul. **2009**.
- [134] Anonim, NovoAlign-Novocraft <http://www.novocraft.com/products/novoalign/> (Haziran, **2015**).
- [135] Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., and Durbin R., "The Sequence Alignment/Map format and SAMtools.," *Bioinformatics*, vol. 25, no. 16, pp. 2078–9, **2009**.
- [136] Ye K., Schulz M. H., Long Q., Apweiler R., and Ning Z., "Pindel: a pattern growth approach to detect break points of large deletions and medium

sized insertions from paired-end short reads.," *Bioinformatics*, vol. 25, no. 21, pp. 2865–71, **2009**.

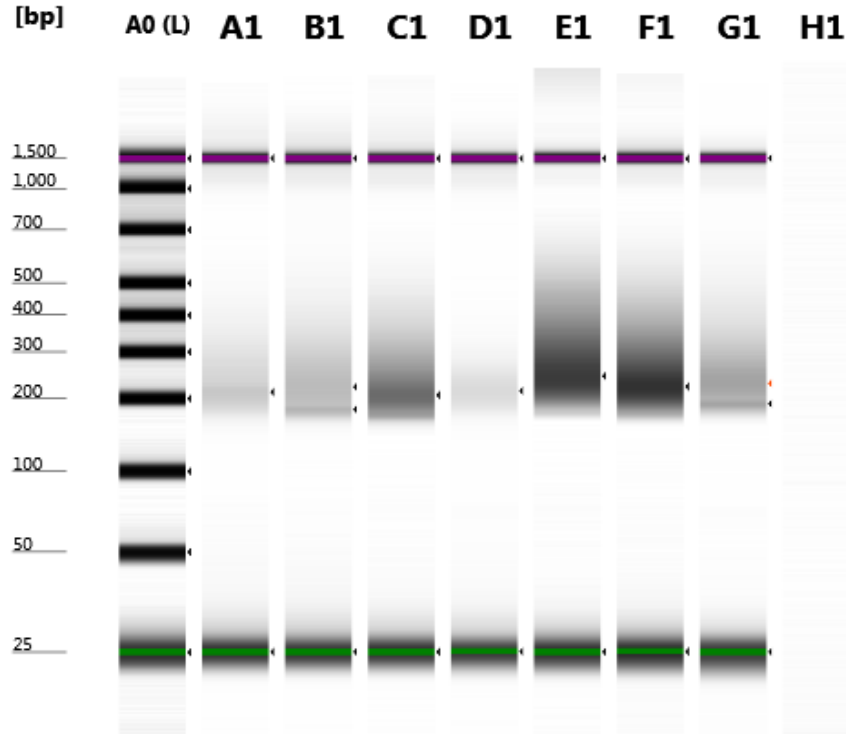
- [137] Flowers J. M., Li S. I., Stathos A., Saxer G., Ostrowski E. A., Queller D. C., Strassmann J. E., and Purugganan M. D., "Variation, sex, and social cooperation: molecular population genetics of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*," *PLoS Genetics*, vol. 6, no. 7, p. e1001013, **2010**.
- [138] Hall D. W., Fox S., Kuzdzal-Fick J. J., Strassmann J. E., and Queller D. C., "The rate and effects of spontaneous mutation on fitness traits in the social amoeba, *Dictyostelium discoideum*," *Genes, Genomes and Genetics*, vol. 3, pp. 1115–27, **2013**.
- [139] Hershberg R. and Petrov D. A., "Evidence that mutation is universally biased towards AT in bacteria," *PLoS Genetics*, vol. 6, **2010**.
- [140] Keller I., Bensasson D., and Nichols R. A., "Transition-transversion bias is not universal: a counter example from grasshopper pseudogenes," *PLoS Genetics*, vol. 3, no. 2, p. e22, **2007**.
- [141] Van Driessche N., Shaw C., Katoh M., Morio T., Sugang R., Ibarra M., Kuwayama H., Saito T., Urushihara H., Maeda M., Takeuchi I., Ochiai, Eaton H. W., Tollett J., Halter J., Kuspa A., Tanaka Y., and Shaulsky G., "A transcriptional profile of multicellular development in *Dictyostelium discoideum*," *Development*, vol. 129, no. 7, pp. 1543–1552, **2002**.
- [142] Kunkel T. A. and Erie D. A., "DNA mismatch repair.," *Annual Reviews of Biochemistry*, vol. 74, pp. 681–710, **2005**.
- [143] Sniegowski P. D., Gerrish P. J., Johnson T., and Shaver A., "The evolution of mutation rates: separating causes from consequences.," *Bioessays*, vol. 22, no. 12, pp. 1057–66, **2000**.
- [144] Kunkel T. A., "Evolving views of DNA replication (in)fidelity.," *Cold Spring Harb. Symp. Quantative Biology*, vol. 74, pp. 91–101, **2009**.
- [145] Pavlov Y. I., Shcherbakova P. V., and Kunkel T. A., "In vivo consequences of putative active site mutations in yeast DNA polymerases alpha, epsilon, delta, and zeta.," *Genetics*, vol. 159, no. 1, pp. 47–64, **2001**.
- [146] Hübscher U., Maga G., and Spadari S., "Eukaryotic DNA Polymerases," *Annual Reviews of Biochemistry*, vol 71, pp. 133-163, **2003**.
- [147] Shevelev I. V. and Hübscher U., "The 3' 5' exonucleases.," *Nature Reviews of Molecular Cell Biology*, vol. 3, no. 5, pp. 364–76, **2002**.

- [148] Lin Z., Nei M., and Ma H., "The origins and early evolution of DNA mismatch repair genes--multiple horizontal gene transfers and co-evolution.," *Nucleic Acids Research*, vol. 35, no. 22, pp. 7591–603, **2007**.
- [149] McConnell R., Middlemist S., Scala C., Strassmann J. E., and Queller D. C., "An unusually low microsatellite mutation rate in *Dictyostelium discoideum*, an organism with unusually abundant microsatellites.," *Genetics*, vol. 177, no. 3, pp. 1499–507, **2007**.

**EK1.** Bazı tek hücreli ökaryotlara ait genetik özellikler

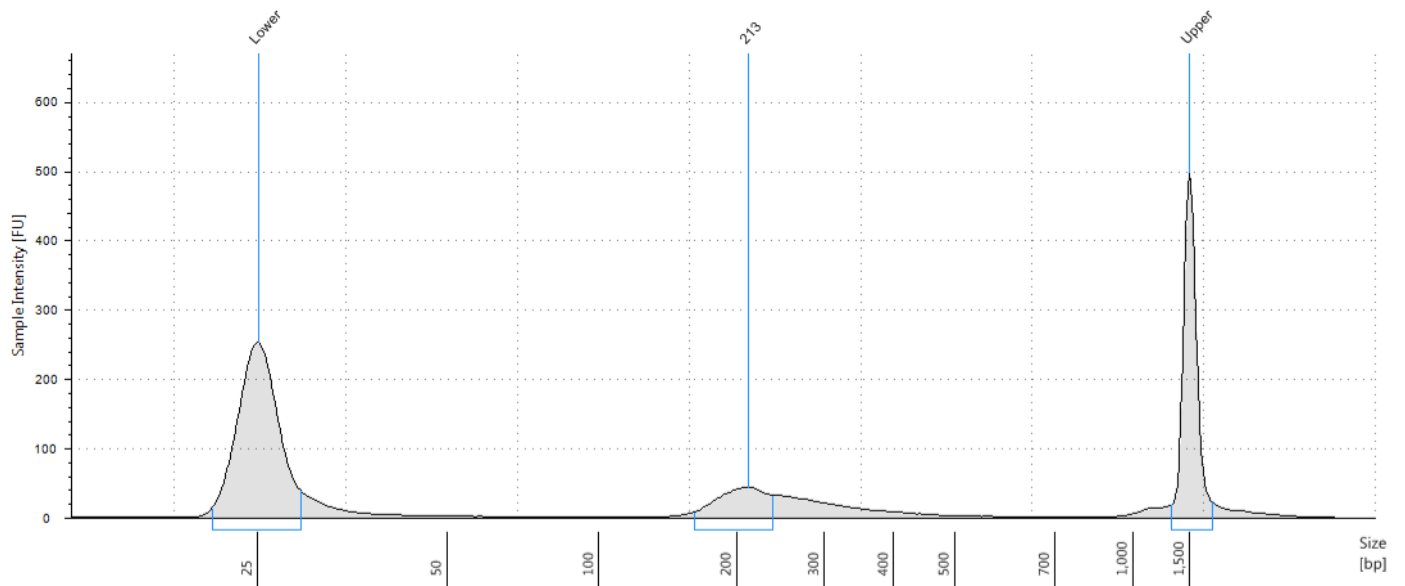
<b>Organizma</b>	<b>Kingdom/Phylum</b>	<b>Genom büyüklüğü, (Mbç)</b>	<b>Kromozom sayısı</b>	<b>GC içeriği (%)</b>
<i>D.discoideum</i>	Amoebozoa/Mycetozoa	34	6	28,4
<i>S.cerevisiae</i>	Fungi/Ascomycota	12	16	38,2
<i>T.pseudonana</i>	Chromalveolata/Heterokontophyta	30,5	24	46,9
<i>T.cruzi</i>	Excavata/Euglenozoa	32,4	41	50,5
<i>P.falciparum</i>	Chromalveolata/Apicomplexa	22	14	19,4
<i>T.gondii</i>	Chromalveolata/Apicomplexa	61,8	12	52,7
<i>P.tetraurelia</i>	Chromalveolata/Ciliophora	72	350	27,5
<i>T.thermophila</i>	Chromalveolata/Ciliophora	103	225	21,1

## EK-2 Agilent Technologies Tape Station sonuçları

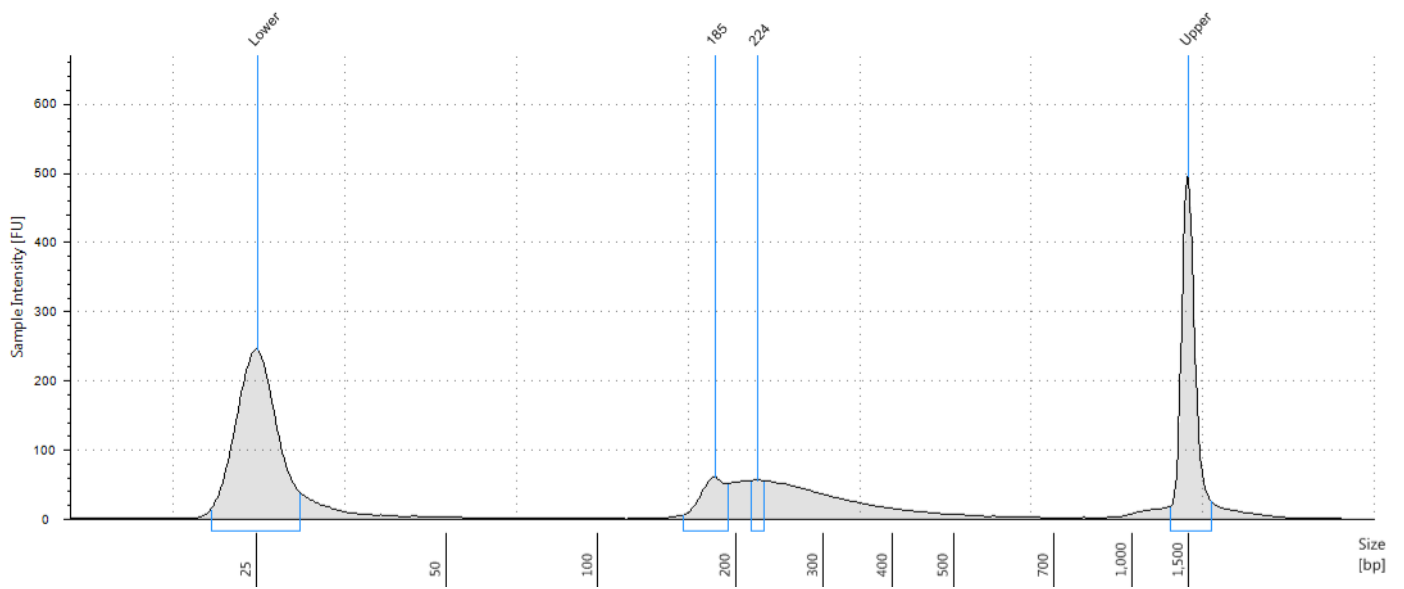


Örnek	Konsantrasyon [pg/ $\mu$ l]	DNA Fragmentinin büyüklüğü (bç)
Belirteç	2350	
A1 (D4)	81.2	213
B1 (D5)	78.3	185 ve 224
C1 (D7)	404	207
D1 (D8)	74.7	216
E1 (D14)	805	248
F1 (D15)	694	225
G1 (D18)	291	232

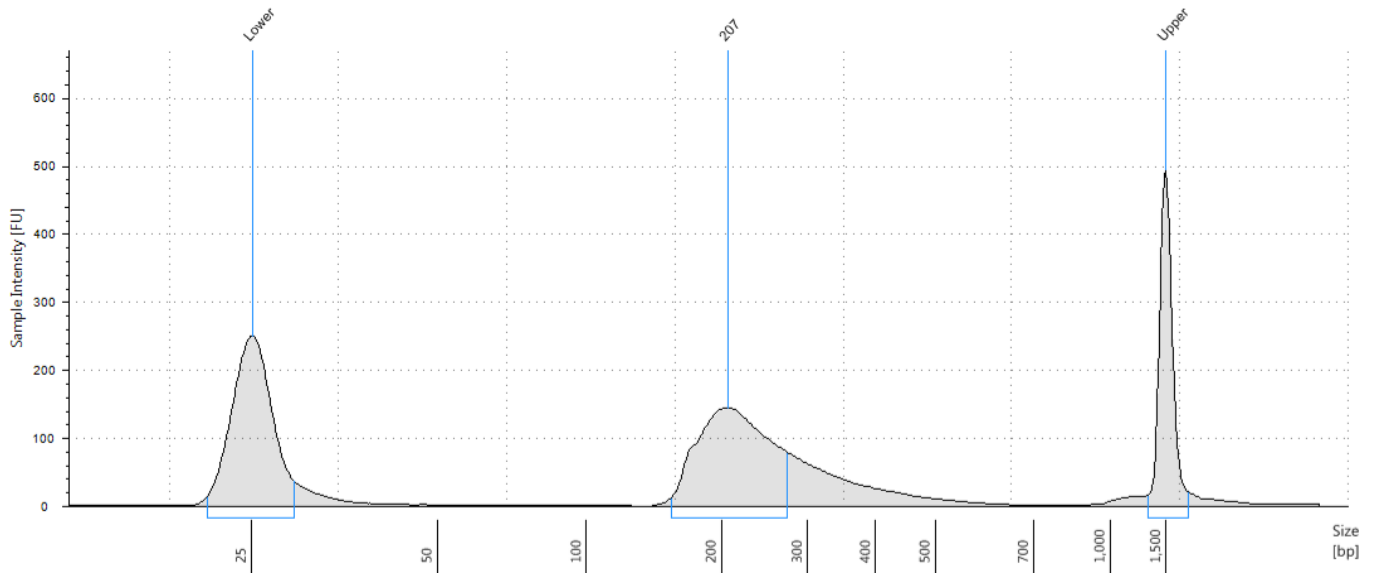
## A1 (ÖRNEK D4)



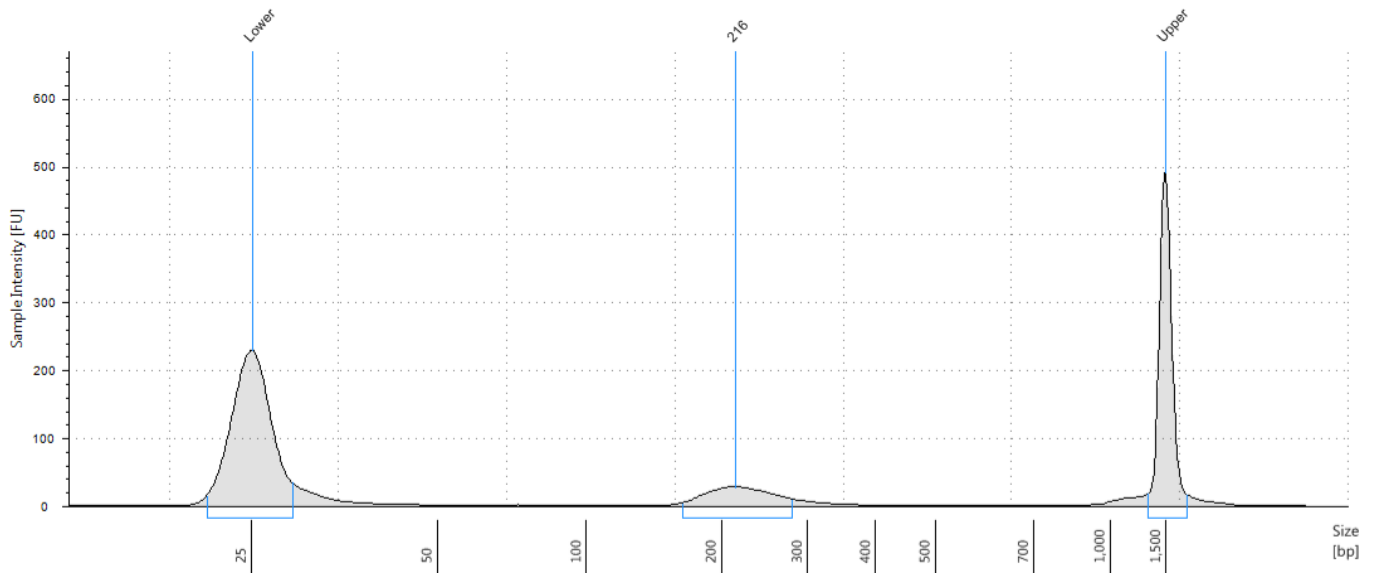
## B1 (ÖRNEK D5)



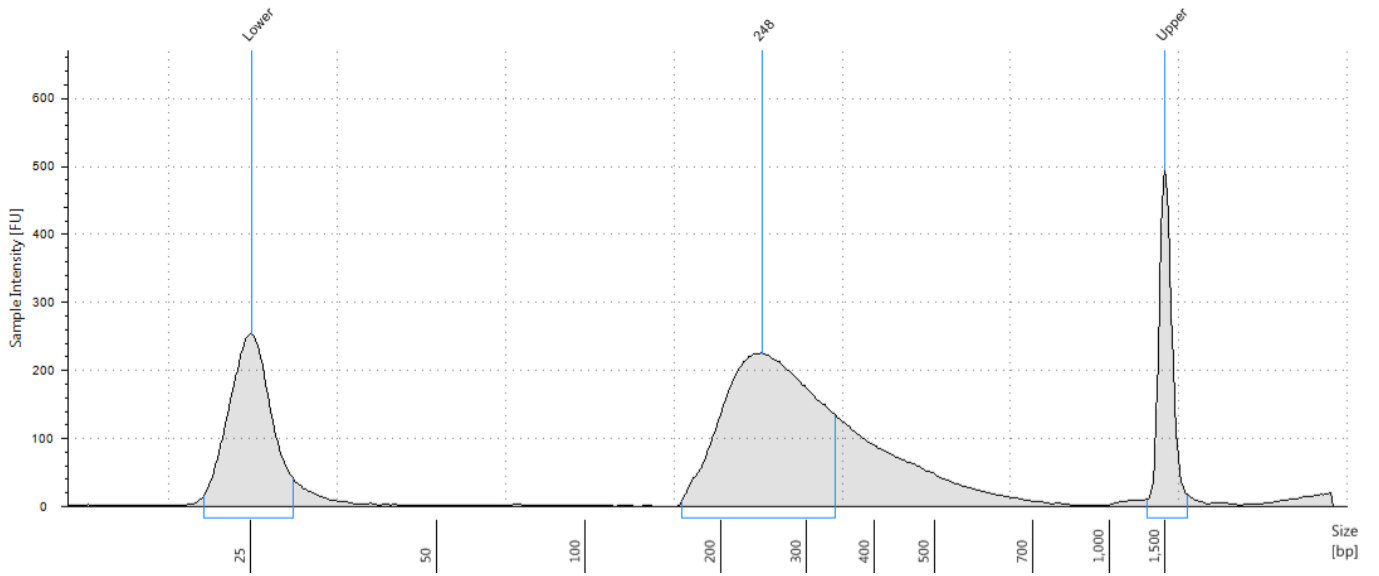
### C1 (ÖRNEK D7)



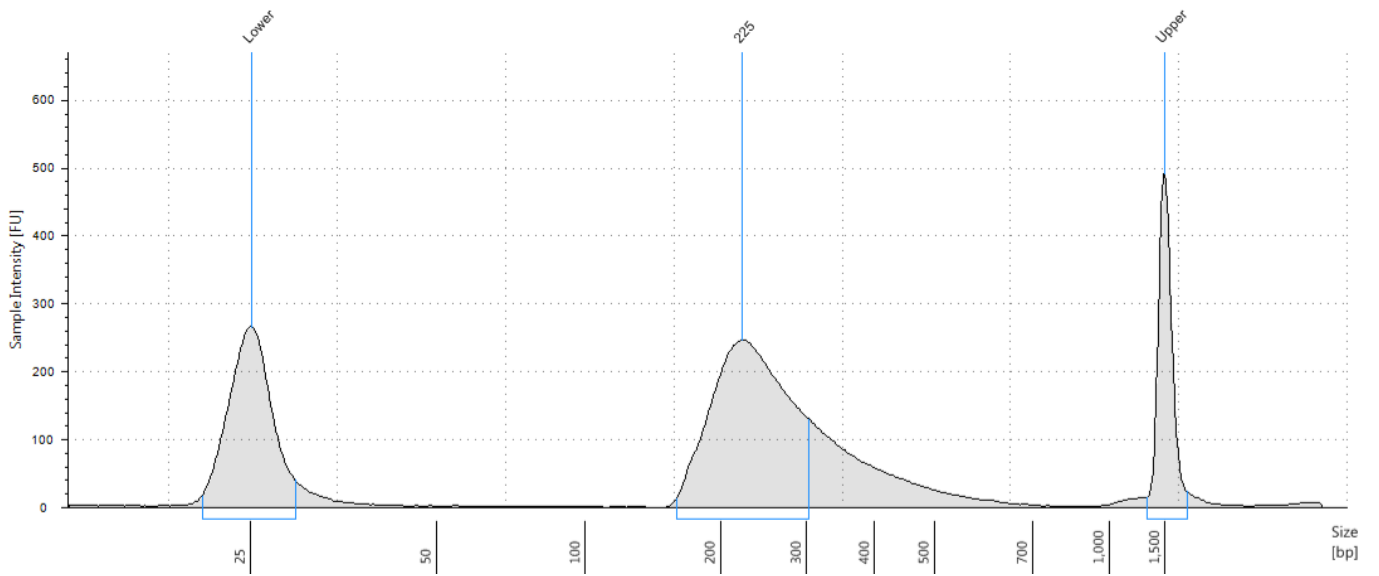
### D1 (ÖRNEK D8)



### E1 (ÖRNEK D14)

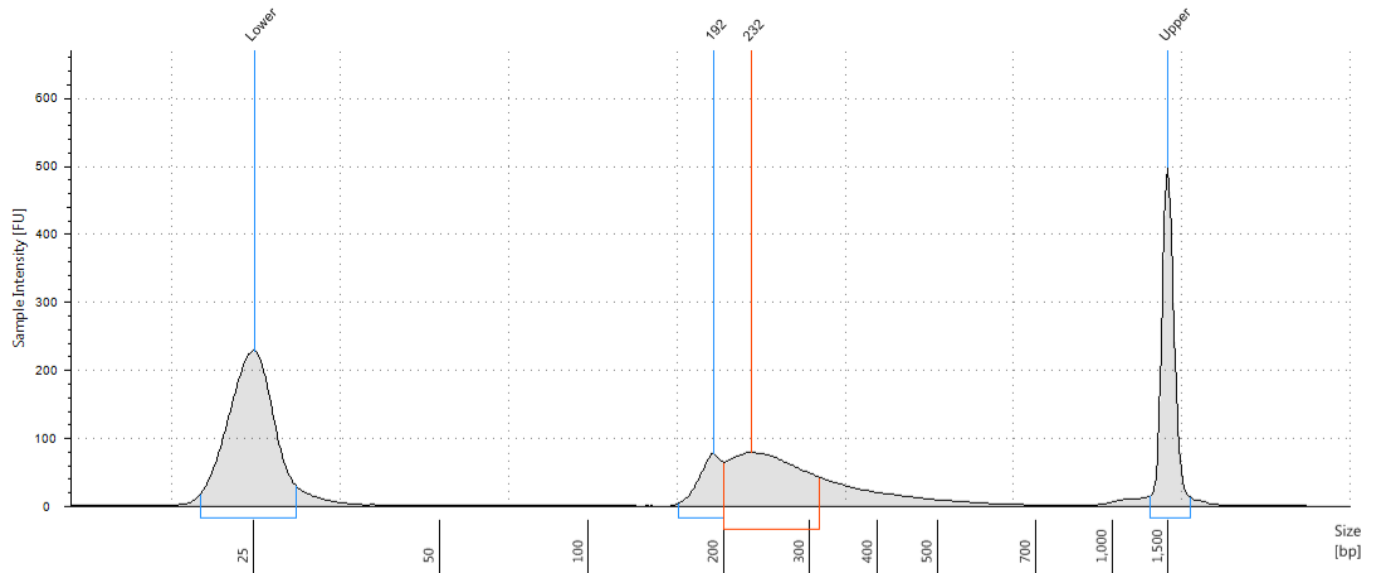


### F1 (ÖRNEK D15)





# G1 (ÖRNEK D18)



### EK-3. İnsersiyon ve delesyon olayları §

Örnek	Kromozom	Büyükük	Algoritma			EX/IG	Gen	mRNA	SSR
			novo	bwa	Pindel				
D2	1	-1c	*	*	*	EX	**	XM_642033	-
D2	5	+3acc	*	*	*	EX	criF <sup>††</sup>	XM_630775	6acc
D11	1	-3atc	*	*	*	EX	‡‡	XM_42493	-
D14	1	+1c	*	*	*	IG	§§	-	-
D14	1	+1c	*	*	*	IG	-	-	-
D14	2	-3tca	*	*	*	EX	***	XM_640063	-
D14	4	+3ttc	*	*	*	EX	†††	XM_633626	-
D15	5	+1t	*	*	*	EX	‡‡‡	XM_630843	4t

§ EX: ekzon, IG: intergenik bölge, SSR: Basit dizi tekrarları

\*\* SNF2-related domain containing protein

†† G-protein coupled receptor family protein

‡‡ Hipotetik protein

§§ Pseudogen

\*\*\* Hipotetik protein: DG17`ye benzer

††† Hipotetik protein

‡‡‡ EGF-like domain containing protein

#### EK-4. Baz değişimi tipindeki mutasyonların farklı organizmalardaki spektrumu

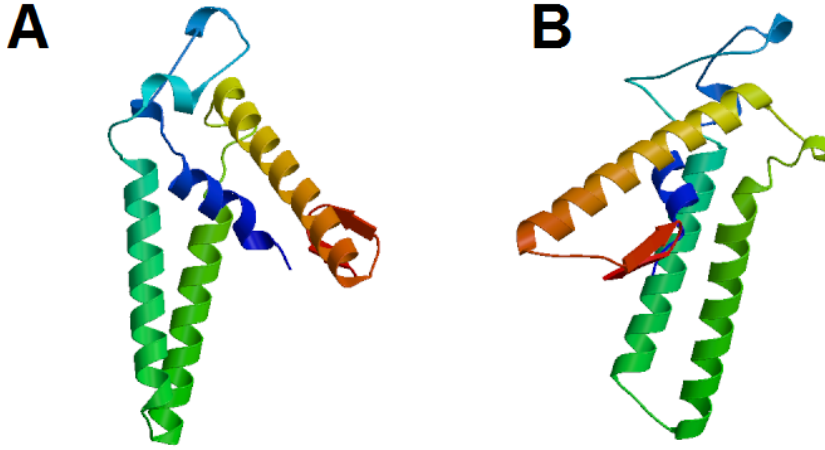
	<u>AT&gt;GC</u>	<u>GC&gt;AT</u>	<u>AT&gt;TA</u>	<u>GC&gt;TA</u>	<u>AT&gt;CG</u>	<u>GC&gt;CG</u>	<i>N</i>	<u>Ts/Tv</u>	<b>Kaynaklar</b>
<i>H. sapiens</i>	0.221	0.408	0.067	0.110	0.078	0.125	3336	1.697	[45]
<i>D. melanogaster</i>	0.190	0.305	0.121	0.155	0.115	0.115	174	0.977	[19]
<i>C. elegans</i>	0.105	0.205	0.220	0.281	0.113	0.077	391	0.448	[18]
<i>A. thaliana</i>	0.118	0.588	0.059	0.094	0.071	0.071	85	2.400	[8]
<i>S. cerevisiae</i>	0.103	0.286	0.060	0.312	0.057	0.182	1250	0.638	[88]
<i>C. reinhardtii</i>	0.25	1.5	0.5	0.75	1	1	4	0.65	[31]
<i>P. tetraurelia</i>	0	1.14	1.14	1	0.43	0.43	7	0.38	[9]
<i>E. coli</i>	0.21	0.35	0.07	0.13	0.16	0.07	1037	1.28	[41]

**EK-5.**

Örnek	Nesil	Toplam bölge	GC>AT	AT>GC	AT>TA	GC>TA	AT>CG	GC>CG	Mutasyon	Mutasyon hizi
M4	1000	31217739	0	0	0	0	0	0	0	0
M10	1000	30776306	0	0	0	0	0	0	0	0
M12	1000	31777165	0	0	0	0	0	0	0	0
M14	1000	31954245	1	0	1	1	0	0	3	9.38842E-11
M20	1000	30797225	0	0	2	0	0	0	2	6.49409E-11
M24	1000	32032690	1	0	1	1	0	0	3	9.36543E-11
M30	1000	32178250	0	0	0	0	0	1	1	3.10769E-11
M34	1000	781429	1	0	0	0	0	0	1	1.27971E-09
M36	1000	31717960	0	0	0	0	0	0	0	0
M40	1000	30468045	0	0	0	0	0	0	0	0
M44	1000	31417259	0	0	0	0	0	0	0	0
M50	1000	31481703	0	0	0	0	0	0	0	0
M54	1000	31515153	1	0	0	0	0	0	1	3.17308E-11
M60	1000	31831007	0	0	0	0	0	0	0	0
M64	1000	31914860	1	0	0	0	1	0	2	6.26667E-11
M68	1000	31415816	0	0	0	0	0	0	0	0
M70	1000	31889281	1	0	0	0	0	0	1	3.13585E-11
M74	1000	29146024	0	1	2	0	0	0	3	1.0293E-10
M84	1000	31674818	0	0	2	0	0	0	2	6.31416E-11
M89	1000	7136	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Toplam</b>			<b>6</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>19</b>	<b>3.35697E-11</b>

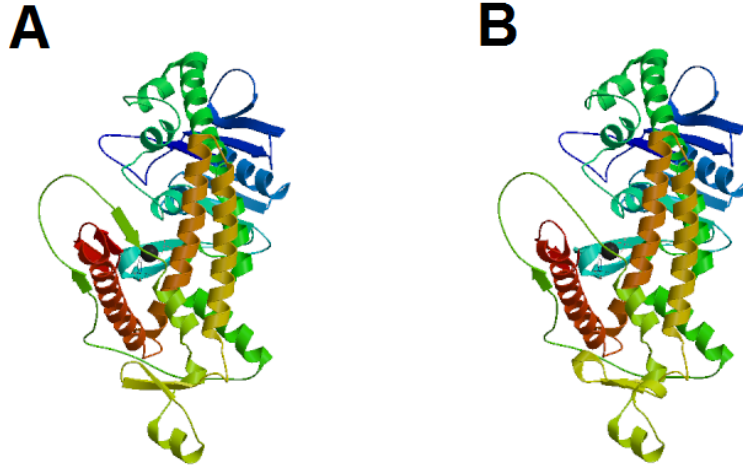
## EK-6. DNA polimeraz altbirimlerine ait BLAST sonuçları ve protein modelleri

Organizma	DNA polimeraz alfa katalitik bölgeler		
		*	
Dictyostelium discoideum	D F N S L Y P S I	K L I A N S M Y G C I	I Y G D T D S
Dictyostelium purpureum	.....	..V.....	V.....
Acanthamoeba castellanii	.....	..V.....	.....
Naegleria gruberi	.....	..T...T.....	.....
Paramecium tetraurelia	.....	..V...I.....	.....
Tetrahymena thermophila	.....	..V.....	.....
Oxytricha trifallax	.....	..T.....	V.....
Euplotes octocarinatus	.....	..T.....	V.....
Thalassiosira pseudonana	.....I	..T.....	.....
Toxoplasma gondii	.....	..T...I.....	V.....
Trypanosoma cruzi	.....L	..T.....	.....
Giardia lamblia	.....N.	..C..A...S.	.....
Saccharomyces cerevisiae	.....	..T.....	V.....
Caenorhabditis elegans	.....	..T.....	V.....
Arabidopsis thaliana	.....	..T.....	.....
Drosophila melanogaster	.....	..T.....	V.....
Mus musculus	.....	..T.....	.....
Homo sapiens	.....	..T.....	.....



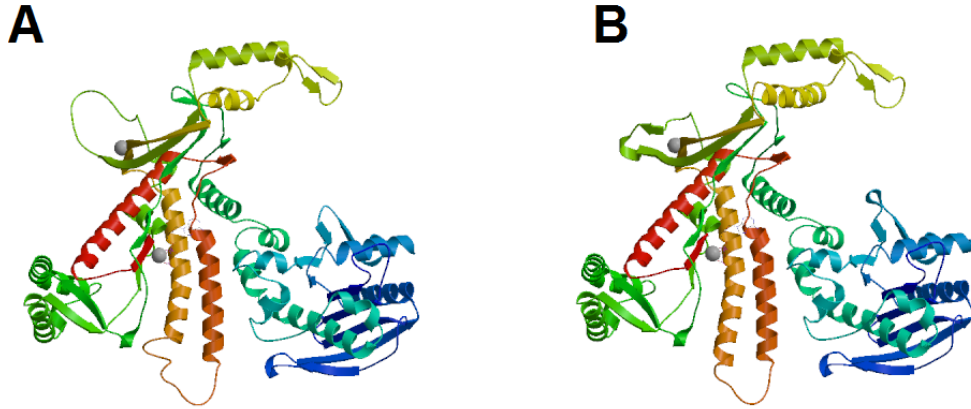
DNA polimeraz alfa altbirimi BLAST sonuçları. Model A *D. discoideum*, Model B *S. cerevisiae* DNA polimeraz alfa altbirimi katalitik bölgesine aittir.

Organizma	DNA polimeraz delta katalitik bölgeler			DNA polimeraz delta 3'-5' ekzonükleaz katalitik bölgeler			
Dictyostelium discoideum	DFTSLYPSI	KISANSVYGF	IYGD TDS	FDIEC	IGYNI VNF D	TSYSLN	AVYCIKD
Dictyostelium purpureum	.....	.....	.....	.....	.....A.....	S.....	.....
Acanthamoeba castellanii	.A.....	.V.....	.....	.....	T.....I.....	R..T..	.....
Entamoeba histolytica	.S.....	.V.....	V.....	.....	T.....M.....	R..T..	.....L..
Naegleria gruberi	.A.....	.....	.....	.....	T.....VI.....	S..T..	.S..L..
Paramecium tetraurelia	.A.....	.....	.....	.....	.....Q.....	S..F..	.....L..
Tetrahymena thermophila	.A.....	.....	.....	.....	L.....T.....	S.....	.....L..
Oxytricha trifallax	.A.....	.....	.....	.....	T.....	R..T..	.....L..
Thalassiosira pseudonana	.A.....	.V.....	V.....	.....	T.....VQ.....	S.....	.....L..
Toxoplasma gondii	.A.....	.....	Y.....	.....	S.....C.....	K.....	G.....L..
Trypanosoma cruzi	.A.....	.....	V.....	I.....	T.....S.....	R.....	.....L..
Giardia lamblia	.N.....T.....	.LI.....L.....	.....	.....S.....	T.....DG.....	R..T..	TL.....
Saccharomyces cerevisiae	.N.....	.....	V.....	.....	.....TT.....	R..T..	.....L..
Caenorhabditis elegans	.A.....	.....	.....	L.....	T.....L.....	R..T..	.Q..L..
Arabidopsis thaliana	.A.....	.....	.....	.....	.....CK.....	S.....	.....L..
Drosophila melanogaster	.A.....	.....	.....	.....	T.....N.....	R..T..	.M..L..
Mus musculus	.S.....	.V.....	V.....	.....	T.....Q.....	R..T..	.....L..
Homo sapiens	.S.....	.S-----	V.....	.....	T.....C.....	R..T..	.....L..



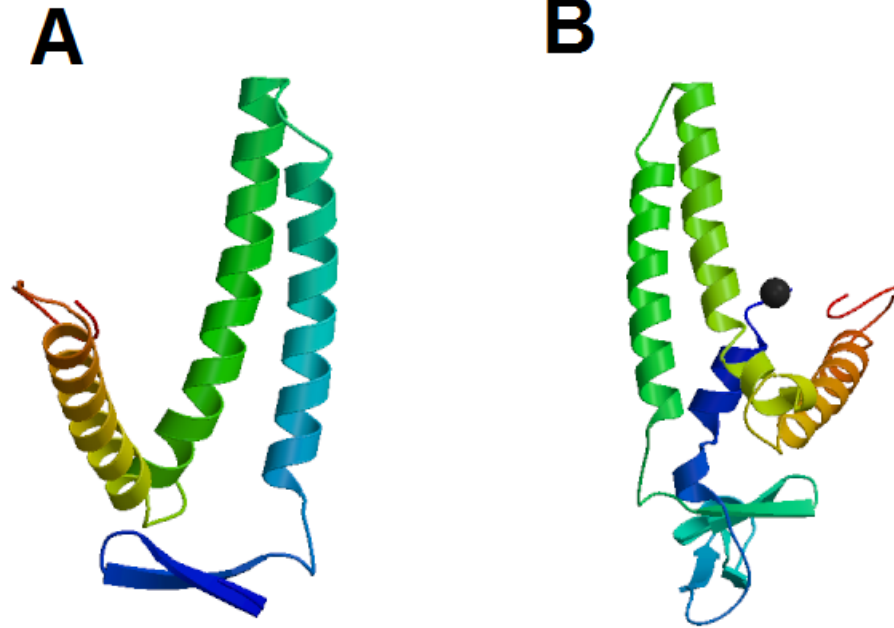
DNA polimeraz delta altibirimi BLAST sonuçları. Model A *D. discoideum*, Model B *S. cerevisiae* DNA polimeraz delta altibirimi katalitik bölgesine aittir.

Organizma	DNA polimeraz epsilon					
	DNA polimeraz epsilon katalitik bölgeler			3'-5' ekzonükleaz katalitik bölgeler		
Dictyostelium discoideum	DVSAMYPNI	KCILNSEFGY	DTDGI	YDIET	NGDMED	YSVSDA
Dictyostelium purpureum	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Acanthamoeba castellanii	.A.....	.....	.....	E.....	..Y..	ET.....
Naegleria gruberi	.G.....	.....	.....	E.....	..F..	.....
Paramecium tetraurelia	.A.....	.I.....	.....	E.....	..R..	..I..S
Tetrahymena thermophila	.A.....	.I.....	.....	E.....	..K..	.....
Oxytricha trifallax	.A.....	.I.....	.....	E.....	..F..	.....
Thalassiosira pseudonana	.G.....	.....	.....	E...C	..F..	.....
Giardia lamblia	.A.....	.....	.....	.....	..T..	.....
Toxoplasma gondii ME	.....	.....	.....	W...C	.....	.....
Trypanosoma cruzi	.G.....	.....	.....	E.....	..Y..	.....
Saccharomyces cerevisiae	.AS.....	.V.....	.....	F.....	..F..	.....
Caenorhabditis elegans	.G.....	.....	.....	F.....	..F..	.....
Arabidopsis thaliana	.A.....	.....	.....	E.....	..F..	.....
Drosophila melanogaster	.G.....	.....	.....	E.....	..F..	.....
Mus musculus	.G.....	.....	.....	E.....	..F..	.....
Homo sapiens	.G.....	.....	.....	E.....	..F..	.....



DNA polimeraz epsilon altibirimi BLAST sonuçları. Model A *D.discoideum*, Model B *S.cerevisiae* DNA polimeraz epsilon altibirimi katalitik bölgesine aittir.

Organizma	DNA polimeraz zeta katalitik bölgeler			
Dictyostelium discoideum	DFQSLYPSI	TRIMVK	KMMANVAFGY	DTDSL
Dictyostelium purpureum	.....	.....	..L.....	.....
Entamoeba histolytica	..L.M..TT	..QHI.	..LLC..VY..	.....
Paramecium tetraurelia	.....	....I.	..LFM..MY..	.....
Tetrahymena thermophila	.....V	....I.	..LFMC.VY..	....V
Oxytricha trifallax	.....V	.....	..LI...TY..	....T
Thalassiosira pseudonana	..TA....L	..A.L.	..YV...TY..	....V
Toxoplasma gondii	..R.....	....Q	..I...SY..	....M
Trypanosoma cruzi	..R.....	..LE.I	..L...TY..	.....
Saccharomyces cerevisiae	.....	V.V.I.	..LL...TY..	.....
Caenorhabditis elegans	.....M	A.....	..LV...SY..	....M
Arabidopsis thaliana	.....M	.....	..LI...TY..	....M
Drosophila melanogaster	.....H..M	..Q...	..L...TY..	....M
Mus musculus	.....	..L...	..LI...T...	....M
Homo sapiens	.....	..F...	..LI...T...	....M



DNA polimeraz zeta altbirimi BLAST sonuçları. Model A *D.discoideum*, Model B *S.cerevisiae* DNA polimeraz zeta altbirimi katalitik bölgesine aittir.



# ÖZGEÇMİŞ

## Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Sibel KÜÇÜKYILDIRIM ÇELİK

Doğum Yeri: Ankara

Medeni Hali: Evli

E-posta: sibel.kucukyildirim@gmail.com

Adresi: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Beytepe Çankaya  
06800 Ankara

## Eğitim

Lise: Ankara Bahçelievler Cumhuriyet Lisesi, 2000

Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2006

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim  
Dalı, 2010

Doktora: Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı,  
2015

## Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce, iyi derecede

## İş Deneyimi

Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü 2008-  
halen

## **Deneyim Alanları**

Genetik

## **Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi**

-

## **Tezden Üretilmiş Yayınlar**

-

## **Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar**

-