

***S. CEREVISIAE*'DA ABİYOTİK STRES KOŞULLARININ
HXT4 GENİ TRANSKRİPSİYONUNA
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Saniye BAHAR



**T.C
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***S. CEREVISIAE*'DA ABİYOTİK STRES KOŞULLARININ *HXT4* GENİ
TRANSKRİPSİYONUNA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Saniye BAHAR

Prof. Dr. Sezai TÜRKEKEL
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2011
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Saniye Bahar tarafından hazırlanan “*S. cerevisiae*’da Abiyotik Stres Koşullarının *HXT4* Geni Transkripsiyonuna Etkilerinin İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Sezai Türkel

Başkan: Prof. Dr. Sezai Türkel
U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı
İmza.

Üye: Doç. Dr. Mihriban Korukluoğlu
U.Ü. Ziraat Fakültesi
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
İmza.

Üye: Yrd. Doç. Dr. Figen Ersoy
U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı
İmza.

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Kadri Arslan
Enstitü Müdürü

23 / 09 / 2011

Bilimsel Etik Bildirim Sayfası

U. Ü. 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 kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

23 / 09 / 2011.

Saniye Bahar

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

S. CEREVISIAE'DA ABİYOTİK STRES KOŞULLARININ *HXT4* GENİ TRANSKRİPSİYONUNA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Saniye BAHAR

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

S. cerevisiae'da glukoz tercih edilen bir karbon ve enerji kaynağıdır. *S. cerevisiae*'da glukozun hücre içine taşınması hücre membranında bulunan Hxt proteinleri tarafından yapılır. *HXT4* geni transkripsiyonu glukoz sinyali ile kontrol edilir ve glukoz taşınmasında önemli işlevi vardır. Hücre içine taşınan glukoz ise hücrenin fizyolojik durumuna göre metabolize edilir. Abiyotik stres koşullarında *S. cerevisiae*'da stres koruyucu metabolitler olarak glikolitik yola bağlı olarak trehaloz ve gliserol sentezlenmektedir. Bu araştırmada *HXT4* transkripsiyonuna abiyotik stres koşullarının etkileri incelendi. Ozmotik stresin *HXT4* geni transkripsiyonunu baskıladığı görüldü. Oksidatif stresin ise *HXT4* geni transkripsiyonunu aktive ettiği belirlendi. Diğer taraftan, sıcaklık stresinin ise belirli koşullarda *HXT4* geni transkripsiyonunu aktive ettiği bulundu. Bu sonuçlara ek olarak stres koşullarında aktive edilen transkripsiyon faktörleri Hot1p ve Yap1p'nin *HXT4* geni transkripsiyonuna etkilerinin olmadığı bulundu.

Anahtar Kelimeler: Abiyotik stres, Trehaloz, Glukoz sinyali, Hekzos taşınımı, *S. cerevisiae*.

2011, VIII + 41 sayfa

ABSTRACT
M.Sc Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ABIOTIC STRESS CONDITIONS ON
THE TRANSCRIPTION OF *HXT4* GENE IN *S. CEREVISIAE*

Saniye BAHAR

Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Sezai TÜRKEKEL

Glucose is the preferred carbon and energy resource in *S. cerevisiae*. Glucose transport into the cell is carried out by the Hxt proteins localized in the cell membrane. Transcription of the *HXT4* gene is regulated by glucose signaling and it has a significant function in glucose transport. Once transported into the cell, glucose is metabolized depending on the physiological status of the yeast cell. Under abiotic stress conditions, trehalose and glycerol are synthesized from glycolytic intermediates as stress protectant metabolites in *S. cerevisiae*. In this research, effects of abiotic stress conditions on the transcription of *HXT4* were investigated. It was found that while osmotic stress represses the transcription of *HXT4*, oxidative stress activates its transcription. On the other hand, it was shown that the temperature stress also activates the transcription of *HXT4* gene in certain conditions. In addition to these results, it was found that the stress activated transcription factors Hot1p and Yap1p have no effect on the transcription of *HXT4* gene.

Key Words: Abiotic stres, Trehalose, Glucose signaling, Hexose transport, *S. cerevisiae*.

2011, VIII + 41 pages

TEŞEKKÜR

Öncelikle, tez konumun belirlenmesinde ve alıőmalarımın her aőamasında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve değerli önerileri ile çalıőmalarımı yönlendiren danıőmanım Sayın Prof. Dr. Sezai TÜRKEK'e ve yüksek lisans eğitimim sırasında maddi manevi desteğini esirgemeyen aileme sonsuz teőekkürler ederim. Araőtırmalarım süresince deneylerimde bana yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Saniye BAHAR
23. 09. 2011

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLERİN DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. <i>S. cerevisiae</i> 'da Glukoz Sinyal İletimi.....	3
2.2. <i>S. cerevisiae</i> 'da Glukoz Taşınması ve <i>HXT</i> Genleri.....	5
2.3. <i>HXT4</i> Geninin Yapısı ve İşlevi	10
2.4. <i>S. cerevisiae</i> Abiyotik Stres Yanıtı	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.1. Araştırmada Kullanılan <i>S. cerevisiae</i> Suşları ve Üreme Koşulları	15
3.2. Araştırmada Kullanılan <i>HXT4</i> Gen Füzyonunun Yapısı ve Transformasyonu.....	16
3.3. <i>Hxt4-lacZ</i> Transformantlarının Farklı Koşullarda Üretilmesi	17
3.4. β -Galaktozidaz Aktivitelerinin Ölçülmesi	18
4. BULGULAR.....	20
4.1. <i>HXT4</i> Transkripsiyonuna Ozmotik Stresin Etkileri	20
4.2. Oksidatif Stresin <i>HXT4</i> Geni Transkripsiyonuna Etkileri	21
4.3. Sıcaklık Stresinin <i>HXT4</i> Geni Transkripsiyonuna Etkileri	22
4.4. <i>HXT4</i> Geni Transkripsiyonuna Hot1p ve Yap1p Faktörlerinin Etkileri	24
4.5. <i>HXT4</i> Geni Promotor Bölgesinin Analizi	27
5. TARTIŞMA	31
KAYNAKLAR	34
EKLER	38
Ek 1: Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması.....	38
Ek 2: β -gal aktivitesi hesaplanması.....	40
ÖZGEÇMİŞ	41

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

α :	Alfa
β :	Beta
$^{\circ}\text{C}$:	Santigrat derece
g:	Gravity (santrifuj birimi)
μm :	Mikron
μg :	Mikrogram
μl :	Mikrolitre
Δ :	Delta, delesyon
%:	Yüzde

Açıklama

Kısaltmalar

ATP:	Adenozin Trifosfat
cAMP:	siklikAMP (Halkasal Adenozin MonoFosfat)
AMP:	Adenosin monofosfat
Bp-Bç:	Base pair, Baz çifti
dk:	Dakika
DNA:	Deoksiribonükleik asit
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
GPR:	G-Proteine bağlı reseptör
gr:	Gram
Gly/lakt:	Gliserol-Laktat
<i>GRR</i> :	Glucose repression restored geni
<i>HOG1</i> :	Yüksek ozmolaritede aktif olan gen 1
Hog1p:	Yüksek ozmolaritede aktif olan protein kinaz 1
<i>HOT1</i> :	Yüksek ozmolarite transkripsiyon faktörü 1 geni
Hot1p:	Yüksek ozmolarite transkripsiyon faktörü 1 proteini
<i>HXK2</i> :	Hekzokinaz 2 enzimi geni
<i>HXT4</i> :	Heksoz taşıyıcı gen 4
Hxt4p:	Hekzos taşıyıcı protein
Kbç:	Kilobaz çifti uzunluk
kDA:	Kilodalton
lac-Z:	β -Galaktozidaz geni, LacZ
LB:	Luria Bertani sıvı besiyeri
LiOAc:	Lityum Asetat
M:	Molar
MAT:	Mating tipi
mg:	Miligram
<i>MIG1</i> :	Multicopy Inhibitors of Gal Genes
ml:	Mililitre
mM:	Milimolar

mRNA:	Messenger Ribonükleik asit
nmol:	Nanomole
OD:	Optical Density (optik yoğunluk)
ONPG:	O-Nitro-Phenyl- β -D- Galaktosidase
pH:	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PEG:	Polyetilen Glikol
PKA:	Protein Kinaz-A
RGT:	Restoration of Glukoz Transport Geni
<i>S. cerevisiae</i> :	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC- Ura:	Syntethic Complete minus Uracil
SNF:	Sucrose Non-fermenting
STRE:	Stress Response Element
SUC2:	Sukroz 2 geni
TE:	Tris-EDTA
TPS:	Trehaloz Fosfat Sentaz enzim kompleksi
TPS1:	Trehaloz Fosfat Sentaz Geni-1
Tps1p:	Trehaloz fosfat sentez enzimi altbirimi-1
URA:	Uracil
YAP1:	Yeast Aktivatör Protein 1 Geni
Yap1p:	Yeast aktivatör protein 1
YEpl:	Yeast Episomal Plasmid
YNB:	Yeast Nitrogen Base
YPD:	Yeast extract Pepton Dextrose

ŞEKİLLERİN DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. <i>S. cerevisiae</i> 'da glukoz sinyal iletim yolu ana bileşenleri.	5
Şekil 2.2. <i>HXT</i> genleri transkripsiyonuna glukoz konsantrasyonunun etkisi.	7
Şekil 2.3. Glukoz sinyalinin <i>HXT1-HXT3</i> mRNA seviyelerine etkileri.	8
Şekil 2.4. <i>HXT1-HXT4</i> transkripsiyonunun aktivasyonu ve baskılanması.	9
Şekil 2.5. Hog sinyal iletim yolu bileşenleri.	13

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşları ve özellikleri.	15
Çizelge 4.1. <i>HXT4</i> geni transkripsiyonuna ozmotik stresin etkisi.	21
Çizelge 4.2. <i>HXT4</i> geni transkripsiyonuna oksidatif stresin etkisi.	22
Çizelge 4.3. Sıcaklık stresinin <i>HXT4</i> geni transkripsiyonuna etkisi.	23
Çizelge 4.4.1. Hot1p'nin <i>HXT4</i> geni transkripsiyonuna etkisi.	25
Çizelge 4.4.2. Yap1p'nin <i>HXT4</i> geni transkripsiyonuna etkisi.	27
Çizelge 4.5.1. <i>HXT4</i> geni promotor bölgesi.	29
Çizelge 4.5.2. <i>HXT4</i> geni promotoruna bağlanan transkripsiyon faktörleri.	30

1. GİRİŞ

Hücreler biyolojik aktiviteleri sırasında hem hücre içinde oluşan bazı reaktif moleküller ve hem de hücre dışında bulunan çeşitli koşullar dolayısıyla abiyotik stres olarak adlandırılan olumsuz koşullarla karşılaşır. Canlı organizmalar yaşama ortamlarında oluşan bu tür streslere karşı hayatsal faaliyetlerini devam ettirebilmek için çeşitli korunma stratejileri geliştirmişlerdir. Bunlardan birisi de hücre içinde hücreyi abiyotik stres şartlarından koruyacak moleküller sentezlemektir. Bitkilerde stres metaboliti olarak betain sentezi, mayalarda ve birçok tek hücreli canlıda trehaloz sentezi iyi bilinen stres metabolitlerindedir.

Mayalar basit hücresel organizasyonları, genetik analizlerinin kolay ve çabuk yapılabilmesi ve üreme ortamlarının kolay oluşturulması gibi teknik ve biyolojik avantajları dolayısıyla stres koşullarının hücresel etkilerini araştırmak için iyi bir model sistemdir. *S. cerevisia*'nın özellikle genom yapısının bilinmesi bu organizmada çeşitli metabolik yollara etki eden genlerin ve etki mekanizmalarının çok iyi aydınlatılmasını sağlamıştır. *S. cerevisiae*'da abiyotik stres koşullarına yanıt olarak hızlı bir şekilde trehaloz sentezlenir ve sentezlenen trehaloz maya hücrelerini dehidratasyondan koruduğu gibi hücre içinde proteinlerin yanlış katlanmasını da önler (Singer ve Lindquist 1998, Benaroudy ve ark. 2001, Francois ve Parrou 2001). Gliserol *S. cerevisiae*'da sürekli olarak belirli bir seviyede sentezlenen diğer bir metabolit olup tuzlu ortamlarda sentezi artmaktadır (Blomberg 1995; Hohmann 2002). Hem trehaloz ve hem de gliserol *S. cerevisiae*'da glikolitik yola bağlı olarak sentezlenirler. Glukoz metabolizmasının ilk basamağı da glukozun hücre zarında bulunan taşıyıcı proteinler ile hücre içine taşınmasıdır. *S. cerevisiae*'da glukozun hücre içine taşınması *HXT* genlerince kodlanan taşıyıcı proteinler ile yapılmaktadır (Boles ve Hollenberg 1997).

Bu tez araştırmasında abiyotik stres koşulları olarak ozmotik stres, oksidatif stres ve sıcaklık stresinin *S. cerevisiae*'da *HXT4* geni transkripsiyonuna etkileri incelendi. Transkripsiyonu glukoz konsantrasyonuna göre de kontrol edilen *HXT4* geni *S.*

cerevisiae'da yüksek seviyede ekspres edilen ve glukoz taşıyıcı proteinlerden birini kodlayan bir gen dir. Bu özelliklerinden dolayı araştırmamızda abiyotik stres koşullarının *HXT4* geni transkripsiyonuna olan etkileri incelendi. *HXT4* geni transkripsiyonunun stres aktive edici koşullardan önemli derecede etkilediği bulundu. Bazı stres koşullarının *HXT4* geninin transkripsiyonunda baskılamaya, bazılarının ise aynı gen de transkripsiyonel aktivasyona neden olduğu belirlendi. Mutant *S. cerevisiae* suşları ile yapılan çalışmada ise *HXT4* geni transkripsiyonunun Hot1p ve Yap1p'den bağımsız olarak kontrol edildiği bulundu.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *S. cerevisiae*'da Glukoz Sinyal İletimi

S. cerevisiae ve diğer çok sayıda maya türü çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilirler ancak glukoz ve fruktoz en tercih edilen kaynaklardır (Roland ve ark. 2001). Glukoz ortamda bulunduğu alternatif karbon kaynaklarının kullanımı için gerekli olan enzimler ya çok düşük seviyede sentezlenir ya da hiç sentezlenmezler. Bu olgu karbon katabolit baskılanması olarak veya kısaca glukoz baskılanması olarak tanımlanır (Ronne 1995, Gancedo 1998, 2008). Gliserol laktat gibi fermente edilmeyen karbon kaynaklarında üretilmekte olan *S. cerevisiae* kültürlerine konsantrasyonu %2 olacak şekilde glukoz eklenmesi ile *S. cerevisiae*'daki genlerin en az %30'unda transkripsiyon seviyesinde artış veya azalma olduğu gösterilmiştir (De Risi ve ark. 1997). Bu da glukozun *S. cerevisiae* metabolizması için ne kadar etkin bir sinyal olduğunu göstermektedir.

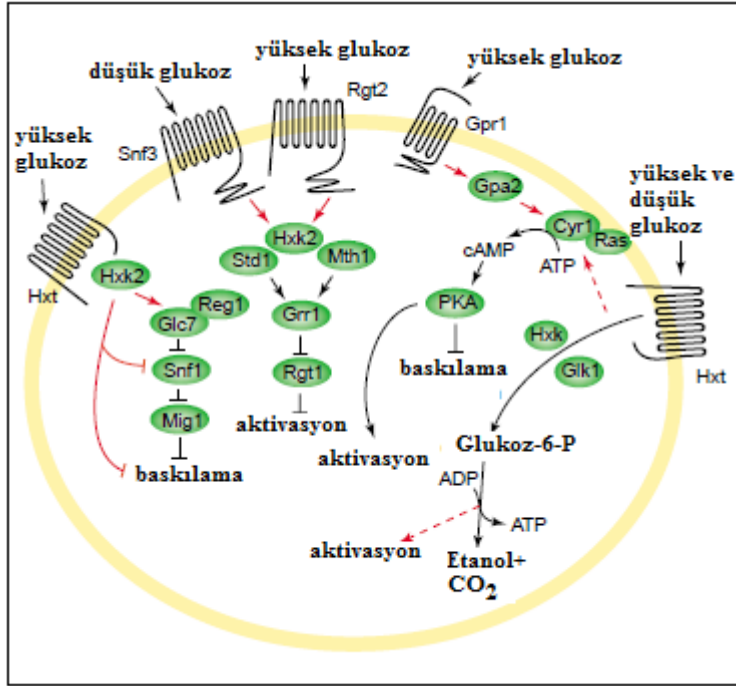
S. cerevisiae'da ortamdaki glukozun algılanması, glukoz sinyalinin membrandan hücre içine aktarılması ve daha sonra da hedef enzimlerin veya genlerin aktivitelerinin glukoz sinyaline göre kontrolü oldukça iyi bir şekilde aydınlatılmıştır (Santangelo 2006, Busti ve ark. 2010). *S. cerevisiae* membranında glukoz sinyalini algılayan sensör proteinler Rgt2, Snf3 ve Gpr1p'dir. Bu membran sensörlerinden Snf3p düşük glukozda aktiftir. Rgt2 ve Gpr1p ise yüksek glukoz konsantrasyonlarında aktiftir. Bu sensör proteinlerin glukoz ile uyarılması sonucu glukoz sinyali sitoplazmaya aktarılır. Sitoplazmada bu sensörler ile etkileşen çeşitli faktörler bulunmaktadır. Bunlarda birisi de ATP'den cAMP oluşturan adenilat siklaz enzimidir. Glukoz sinyaline yanıt olarak sentezlenen cAMP sitoplazmik Protein Kinaz A'yı (PKA) aktive eder. Aktif PKA da hedef faktörleri fosforlayıp onların aktivitelerini kontrol eder (Şekil 2.1). PKA tarafından aktiviteleri kontrol edilen faktörlerin bir bölümü metabolik enzimler ve çeşitli transkripsiyon faktörleridir (Santangelo 2006, Busti ve ark. 2010).

Özellikle düşük glukoz sinyali ile aktive edilen protein kinazlardan birisi de Snf1p'dir (Hedbacker ve Carlson 2009). Snf1p üreme ortamında alternatif karbon

kaynakları bulunduğunda veya düşük glukoz (%0.1 veya daha az) bulunduğunda aktive edilip PKA gibi çeşitli faktörleri fosforlayan bir protein kinazdır (Busti ve ark. 2010). Snf1p'nin homoloğu olarak insanda bulunan protein kinaz ise AMP ile aktive edilen PKA'dır (AMPK) ve insanda glukoz metabolizmasının kontrolünde önemli işlevleri vardır (Hardie 2007).

Eukaryotik hücreler tarafından çok hızlı bir şekilde kullanılan glukoz çok sayıda metabolik yolu etkiler. Bunlar; glikolizis, fermentasyon, krebs döngüsü, pentoz fosfat yolu ve oksijenli solunumdur. Özellikle *S. cerevisiae*'da glukoz ayrıca stres koşullarına yanıt olarak oluşan trehaloz ve gliserolün üretildiği metabolik yollar için de önemlidir. Bölüm 2.4'de açıklandığı şekilde hücre içine glukoz taşıyıcılar ile alınan glukoz hızlı bir şekilde glukokinaz veya heksokinazlarca glukoz 6-fosfata dönüştürülür. Trehaloz ve gliserol sentezi de glikolitik yola bağlı olarak kontrol edilen metabolik yollardır. *S. cerevisiae*'da glikolitik yola bağlı olarak sentezlenen bir diğer önemli metabolit de glikojendir. Hem glikojen ve hem de trehaloz hidroliz edilerek glukoz 6 fosfat üzerinden tekrar glikolitik yola bağlanabilirler (Francois ve Parrou 2001, Parrou ve ark. 1997).

S. cerevisiae'da serbest glukozun üreme ortamından hücreye taşınması *HXT* genlerinin kodladığı ve hücre zarında bulunan heksos taşıyıcı proteinler (Hexose transporters) ile yapılır. Glukozun *S. cerevisiae*'ya alınması kolaylaştırılmış difüzyon mekanizması ile olmaktadır. *HXT* genlerinin transkripsiyonları da üreme ortamı koşulları, glukoz konsantrasyonu ve üreme aşamalarına göre kontrol edilmektedir (Boles ve Hollenberg 1997). Bazı Hxt proteinleri ile insanda karaciğer hücrelerine glukoz girişini sağlayan membran proteinleri arasında (örneğin GLUT1) yüksek homoloji olduğu belirlenmiştir (Boles ve Hollenberg 1997). *HXT* genleri ile ilgili bilgiler aşağıdaki bölümde (Bölüm 2.2 ve 2.3) açıklanmaktadır.



Şekil 2.1. *S. cerevisiae*'da glukoz sinyal iletim yolu ana bileşenleri (Rolland ve ark. 2001)

2.2. *S. cerevisiae*'da Glukoz Taşınması ve *HXT* Genleri

Mayaların büyük bir kısmı karbon kaynağı olarak glukoz, fruktoz ve mannoz gibi heksozları kullanır. Glukoz ana besin kaynağı olmanın yanı sıra büyüme faktörü olarak, metabolizma ve gelişmenin düzenlenmesi sırasında görev alır. Özellikle glukoz, bir çok canlıda olduğu gibi *S. cerevisiae* tarafından da karbon ve enerji kaynağı olarak tercih edilen bir karbonhidrattır (Thevelein ve Hohmann 1995, Rolland ve ark. 2001).

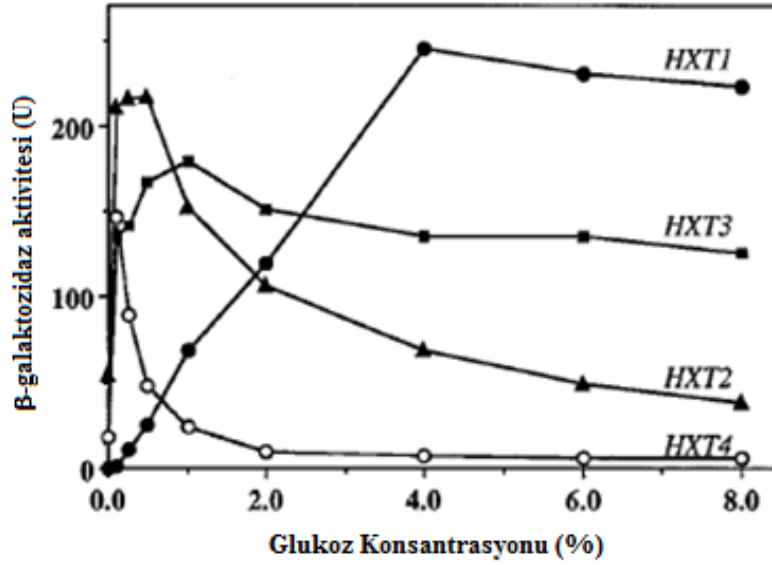
S. cerevisiae'da glukozun hücre içine taşınması kolaylaştırılmış difüzyon olarak adlandırılan bir mekanizma ile sağlanır (Boles ve Hollenberg 1997). Glukoz, mannoz, fruktoz ve galaktoz gibi monosakkaritlerin hücre içine taşınması hücre membranında bulunan Hxt (heksoz taşıyıcı proteinler) proteinleri tarafından gerçekleştirilir. *S. cerevisiae*'de heksoz taşıyıcılara benzeyen proteinleri kodlayan 20

gen bulunmaktadır. Bu heksoz taşıyıcı proteinlerin yapıları analiz edildiğinde genel olarak major facilitator süper ailesinde (MFS) bulunan taşıyıcı (transporter) proteinlere çok benzediği belirlenmiştir (Boles ve Hollenberg 1997). MFS proteinleri substratlarını glukoz konsantrasyon farkı ile pasif olarak, enerjiye bağlı kalmadan kolaylaştırılmış difüzyonla taşırlar. *S. cerevisiae*'da heksoz taşıyıcı proteinlere benzer özellikte 20 farklı gen belirlenmiştir. Bunlar *HXT1-HXT17*, *GAL2*, *SNF3*, ve *RGT2*'dir (Kruckeberg 1996, Boles ve Hollenberg 1997). *HXT* genlerinin birbirine benzerlikleri de oldukça yüksek olup sekans homolojileri %46.9-%99.7 aralığındadır. Bu genlerden *HXT1-HXT17* heksoz taşıyıcı protein kodlarken, *GAL2* galaktoz taşıyıcı membrane proteini kodlar. *SNF3* düşük glukoz sensörü, *RGT2* ise yüksek glukoz sensörü kodlamaktadır. *HXT* gen ailesinin 20 üyesi olmasına rağmen bunlardan sadece 7 tanesi normal şartlarda fonksiyonel olan glukoz taşıyıcıları kodlar. Bu genler *HXT1-HXT7* genleridir. Bu 7 *HXT* geni delesyon ile yok edildiğinde mutant *S. cerevisiae* suşunun (hxt null mutant denilir) glukoz, mannoz veya fruktoz içeren ortamda üremediği bulunmuştur. Diğer glukoz taşıyıcılarının farklı fizyolojik koşullarda aktif olduğu düşünülmektedir (Reifenberger ve ark. 1995, 1997).

S. cerevisiae'da glukozun hücre içine kolaylaştırılmış difüzyon ile alınması kinetik olarak birbirinden farklı iki sistem ile yapılmaktadır (Reifenberger ve ark. 1995, 1997, Boles ve Hollenberg 1997). Bu sistemler düşük affinite sistemi ve yüksek affinite glukoz taşıma sistemleridir. Düşük afiniteli Hxtp'ler üreme ortamındaki glukoz konsantrasyonu %1 veya daha yüksek olduğu zaman aktiftir. Yüksek afiniteli Hxtp'ler ise üreme ortamındaki glukoz konsantrasyonu %0.1 veya daha düşük olduğunda aktiftir. Hxt proteinlerinin afiniteleri incelendiğinde Hxt2p, Hxt6p, Hxt7p'nin yüksek afiniteli glukoz transporterler olduğu, Hxt1p ve Hxt3p'nin ise düşük afiniteli transporterler olduğu belirlenmiştir (Reifenberger ve ark. 1995, 1997). Bu tez araştırmasında incelenen ve *HXT4* geni tarafından kodlanan Hxt4p'nin ise orta afiniteli bir transporter olduğu belirlenmiştir (Theodoris ve ark 1994).

S. cerevisiae'da fizyolojik olarak en önemli glukoz taşıyıcılar *HXT1-HXT4* genlerinin kodladığı taşıyıcılardır. Bu genlerin transkripsiyonları glukoz konsantrasyonuna göre farklılık gösterir. Araştırmamızda da bir çeşidi kullanılan Hxt-

lacZ gen füzyonları kullanılarak yapılan bir çalışmada *HXT1-HXT4* genleri transkripsiyonlarının glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak önemli değişiklikler gösterdiği belirlenmiştir. *HXT1*'in transkripsiyonu yüksek glukoz konsantrasyonu ile aktive edilir. *HXT2* ve *HXT4* genleri transkripsiyonu ise yüksek glukozda baskılanır (Şekil 2.2) (Özcan ve Johnston 1994).

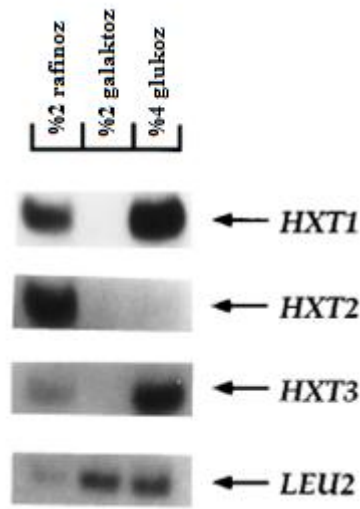


Şekil 2.2. *HXT* genleri transkripsiyonuna glukoz konsantrasyonunun etkisi (Özcan ve Johnston 1994).

HXT3 geni transkripsiyonun ise glukoz konsantrasyonundan çok fazla etkilenmediği görülmektedir. Düşük glukoz ile transkripsiyonu aktive edilmektedir. Fakat yüksek glukoz ortamında da oldukça fazla miktarda transkripsiyonu yapılmaktadır. *HXT2* ve *HXT4* genleri transkripsiyonu düşük glukoz ile aktive edilirken özellikle *HXT4* transkripsiyonu yüksek glukoz ortamında önemli derecede baskılanmaktadır (Özcan ve Johnston 1994).

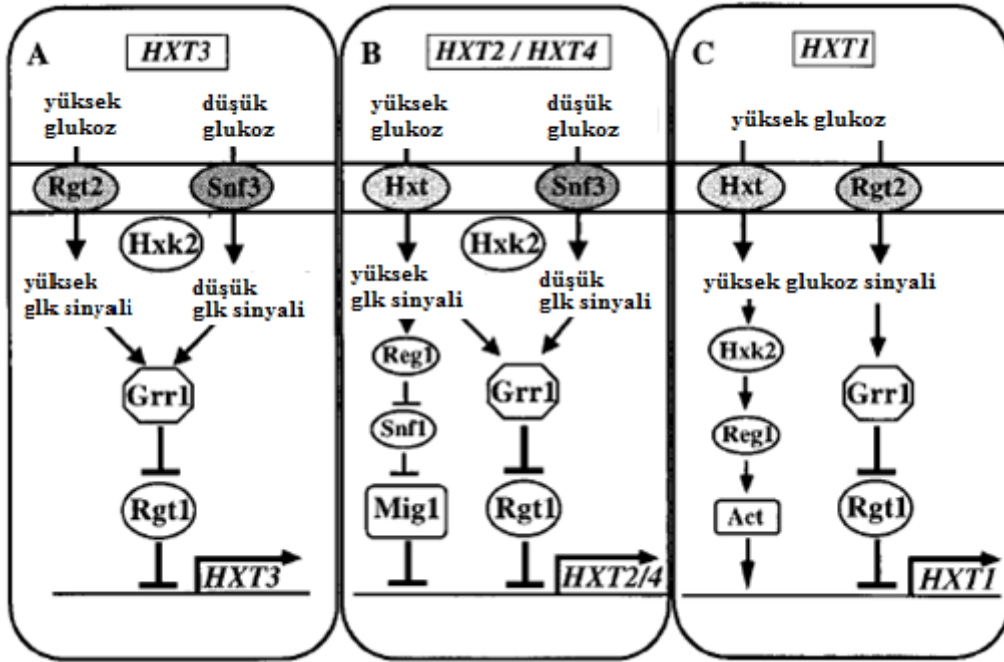
HXT1-HXT4 genleri transkripsiyonuna glukoz konsantrasyonunun etkileri Northern blot analizi ile mRNA seviyesinde de incelenmiştir (Şekil 2.3). *HXT1* ve

HXT3 genlerinin mRNA seviyeleri yüksek glukozda artış göstermektedir. *HXT2* geni transkripsiyonu %2 rafinoz ortamında gerçekleşirken %4 glukoz ortamında bu genin mRNA seviyesinin Northern blot ile görüntülenemeyecek kadar az olduğu bulunmuştur. Rafinoz bir çeşit trisakkarit olduğundan glukoz baskılaması oluşturmaz. Bu nedenle glukoz baskılaması ile kontrol edilen *HXT2* gibi genler bu karbon kaynağında da transkribe edilir (Şekil 2.3) (Özcan ve Johnston 1994). Bu sonuç aynı zamanda lacZ gen füzyonları ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçların hücredeki mRNA seviyeleri ile de doğru orantılı olduğunu göstermektedir.



Şekil 2.3. Glukoz sinyalinin *HXT1-HXT3* mRNA seviyelerine etkileri. *LEU2* geni transkripti kontrol olarak kullanılmıştır (Özcan ve Johnston 1994).

S. cerevisiae'da *HXT1-HXT4* genlerinin glukozla bağılı olarak transkripsiyonel kontrol mekanizması ayrıntılı olarak incelenmiştir (Özcan ve Johnston 1994). Bu genlerin transkripsiyonel kontrolünde asıl düzenleyici faktör Rgt1p'dir. Rgt1p glukoz konsantrasyonuna göre represör veya aktivatör olabilir. Yüksek glukoz konsantrasyonunda *HXT4*'ün transkripsiyonu represör protein olan Mig1p'nin direkt olarak *HXT4* geni promotor bölgesinde belirli dizilere bağlanması ile baskılanmaktadır. Yüksek glukoz konsantrasyonunda Rgt1p'de *HXT4* promoturunda baskılanma işlemine katılır (Özcan ve Johnston 1994). Düşük glukoz konsantrasyonunda ise aktif hale geçen Snf1p, Mig1p'yi fosforlayıp *HXT4* promotorundan ayrılmasını sağlar. Düşük glukoz ortamında aynı zamanda Rgt1p de aktivatör özelliği kazanarak *HXT4*'ün transkripsiyonunun aktivasyonu sağlar. Rgt1p'nin *HXT1*, *HXT2* ve *HXT3*'e olan etkileri şekil 2.4'de göstermiştir.



Şekil 2.4. *HXT1-HXT4* transkripsiyonunun aktivasyonu ve baskılanması (Özcan ve Johnston, 1994)

2.3. *HXT4* Geninin Yapısı ve İşlevi

HXT4 geni *S. cerevisiae* genomunda tek kopya gen olarak 8. Kromozom üzerinde Crick zincirinde ve kodlama bölgesi bu kromozomda 288811 bç'den 287081 bç'ne kadar olan bölgede yer alan bir genidir. *S. cerevisiae*'da sistematik gen adlandırma sistemine göre *HXT4* genine YHR092C kod numarası verilmiştir. *HXT4*'ün kodlama bölgesinde intron belirlenmemiştir ve 576 amino asit uzunlukta bir membran proteini kodlar. *HXT4* proteininde (Hxt4p) 11 potansiyel transmembran domain bölgesi belirlenmiştir (URL1: Yeast Genome Database). Hxt4p'nin kolaylaştırılmış difüzyon ile (pasif transport) *S. cerevisiae*'da heksoz taşıyıcı proteinlerden (transporter) olduğu bulunmuştur (Wendel ve Bisson 1994).

HXT4 geni transkripsiyonunun kontrol mekanizması da bu genin klonlanmasından hemen sonra ayrıntılı olarak incelenmiştir. *HXT4* geni promotor bölgesi araştırmamızda da kullanılan YEp vektörüne klonlanarak transkripsiyonda önemli bölgeleri hem genetik (delesyon ve mutants suş kullanılarak) ve hem de biyokimyasal olarak (jel mobility shift, foot print) belirlenmiştir (Wendel ve Bisson 1994, Theodoris ve ark. 1994, Özcan ve Johnston 1994, 1996). Yapılan bu çalışmalarda *HXT4* geninin yüksek afiniteli glukoz taşıyıcı membran proteini kodladığı ve genin transkripsiyonunun glukoz baskılması ile kontrol edildiği belirlenmiştir.

HXT4 geni transkripsiyonunun üreme ortamında yüksek konsantrasyonda glukoz bulunması durumunda (%1 veya daha fazla) baskılandığı ve basal seviyede transkripsiyonunun yapıldığı, düşük glukoz konsantrasyonunda (%0.1 veya daha az) ise transkripsiyonunun aktive edildiği açıkça gösterilmiştir. *HXT4* geni transkripsiyonunun baskılanmasında glukoz sinyal iletimi ile aktivitesi kontrol edilen Mig1p ve Rgt1p'nin işlevi olduğu bulunmuştur (Özcan ve Johnston 1994; Özcan ve ark. 1996, 1998). Rgt1p'nin aktivitesi glukoz konsantrasyonu ile kontrol edilmektedir. Bu transkripsiyon faktörü yüksek glukoz içeren ortamda represör, düşük glukoz içeren ortamda ise aktivatör olarak *HXT4* geni transkripsiyonunu kontrol etmektedir (Özcan ve ark. 1996, 1998, Kim ve ark. 2003). Rgt1p aktivitesinin fosforilasyona bağlı olarak modifiye edildiği de gösterilmiştir. Daha sonra yapılan başka bir genetik ve

biyokimyasal çalışmada ise *HXT4* geni transkripsiyonunun Gcr1p ve Gcr2p ile de aktive edildiği gösterilmiştir (Türkel ve Bisson 1999). Gcr1p glikolitik genlerin transkripsiyonunu aktive eden bir transkripsiyon faktörüdür (Baker ve ark 1986, 1991). Bu şekilde *HXT4* geni transkripsiyonunun glikolitik genler ile bağlantılı bir şekilde kontrol edildiği düşünülmektedir. Gcr1p'nin *S. cerevisiae*'da aktive edilebilen bir promotordan fazla üretiminin ise üreme şartlarına da bağlı olarak *HXT4* transkripsiyonunda %15-64 kadar artış görülmüştür (Türkel ve Bisson 1999).

HXT genleri ekspresyonunun transkripsiyon sonrası proteoliz ile de kontrol edildiği bulunmuştur. Ayrıca, hücre zarında bulunan Hxt proteinlerinin afinitelerinin fosforilasyon ile kontrol edilebildiğine ilişkin sonuçlar da yayımlanmıştır (Wendel ve Bisson 1994, Busturia ve Lagunas 1986, Walsh ve ark. 1994). Daha önce yayımlanan bir başka araştırmada da *HXT2* ve *HXT4* genlerinin ozmotik stres koşullarında transkripsiyonlarının baskılandığı bulunmuştur (Türkel 1999).

2.4. *S. cerevisiae* Abiyotik Stres Yanıtı

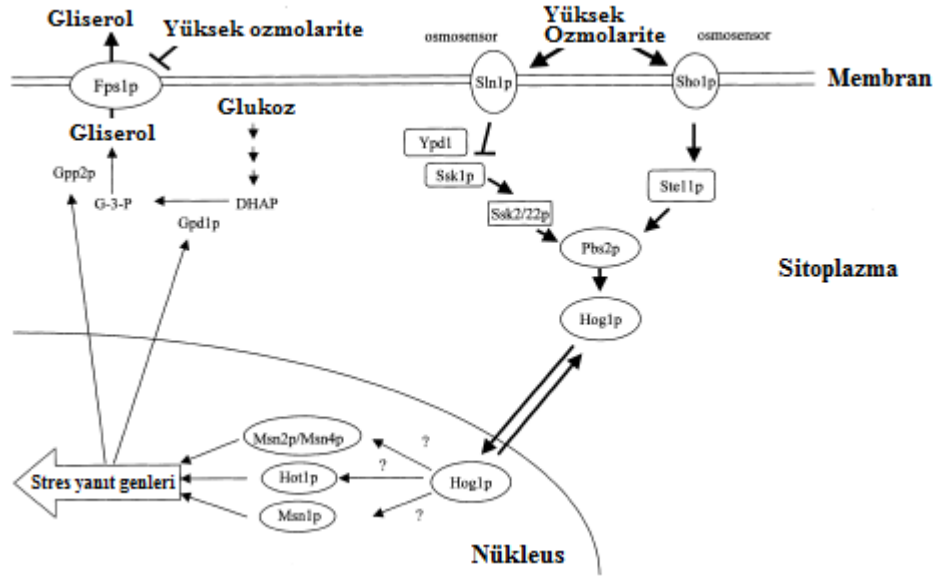
Yaşayan organizmalar doğal habitatlarında abiyotik stres koşulları altında da hayatsal faaliyetlerini devam ettirebilmek için çeşitli yanıt mekanizmaları geliştirmiştir. Bu stresler besinsel açlık, ısı şoku veya sıcaklık stresi, serbest oksijene maruz kalma, dehidrasyon, osmotik ortamlar ve ağır metaller gibi koşullar olabilir. Mayalar basit hücrel organizasyonları, genetik analizlerinin kolay ve çabuk yapılabilmesi ve üreme ortamlarının kolay oluşturulması gibi teknik ve biyolojik avantajları dolayısıyla stres koşullarının hücrel etkilerini araştırmak için iyi bir model sistemdir (Lindquist ve Craig 1988, Gonzalez ve ark 2008).

S. cerevisiae'da stres ile aktive edilen genlerin promotor bölgelerinin çoğunda STRE (stres response element) olarak adlandırılan ortak sekans dizisi belirlenmiştir. Bu diziye de Msn2/4p olarak adlandırılan transkripsiyon aktivatörü bağlanmaktadır (Estruch 2000).

S. cerevisiae'da abiyotik stres koşullarına yanıt olarak en hızlı ve en fazla sentez edilen bileşik ise trehalozdur. Trehaloz glukoz 6 fosfattan sentezlenen ve indirgen olmayan bir disakkarittir (Cabib ve Leloir 1958). Trehaloz biyosentezi sırasında ara bileşik olarak oluşan trehaloz-6-fosfat'ın *S. cerevisiae*'da glukozun hücreye alınması ve glikolitik yolun kontrolünde da önemli işlevi bulunmaktadır. Bu bileşiğin glukozun fosforilasyonu için gerekli olan heksokinaz enzimlerinin inhibitörü olduğu ve bu enzimlere etki ederek glukozun kontrollü bir şekilde glikolitik yola girişini sağladığı bulunmuştur (Thevelein ve Hohmann 1995). Bundan dolayı trehaloz biyosentezi normal koşullarda da belirli bir bazal seviyede yapılmaktadır. Trehaloz biyosentezi özellikle sıcaklık stresi ile aktive edilir. Trehaloz sentezi için gerekli olan enzim kompleksi TPS olup bu komplekste yer alan enzimlerin kodlandığı genlerden birisi olan *TPS1*'in transkripsiyonu *STRE* sekansına bağlanan *Msn2/4p* faktörlerince aktive edilmektedir (Francois ve Parrou 2001, Parrou ve ark. 1997).

S. cerevisiae'da ozmotik stres koşullarında ise sentezi özellikle aktive edilen metabolit gliseroldür. Ozmotik stres koşullarında önce dihidroksi asetondan *Gpd1p* etkisi ile gliserol 3-fosfat sentezlenir. Daha sonra farklı bir enzim ile (Gliserol fosfat fosfataz) gliserol 3-fosfat gliserole dönüştürülür (Blomberg 1995, Hohmann 2002).

S. cerevisiae'da ozmotik stres membranda bulunan iki farklı ozmosensör protein tarafından algılanır. Bu ozmosensörler *Sln1p* ve *Sho1p*'dir. Bu ozmosensörler yüksek tuzluluk ortamında sitoplazmik MAP kinaz sinyal iletim yolunu aktive etmektedir. MAP kinaz yolunda bulunan son protein kinaz *Hog1p*'dir. Bu Protein kinaz da çok farklı faktörlere etki ederek ozmotik strese yanıt oluşumunu sağlar. *Hog1p* ile aktive edilen transkripsiyon faktörlerinden birisi *Hot1p*'dir. *Hog1p* aynı zamanda genel stres yanıt faktörü olan *Msn2/4*'ü de aktive etmektedir (Rep ve ark. 1999, Hohmann 2002).



Şekil 2.5. Hog sinyal iletim yolu bileşenleri (Estruch 2000).

Sıcaklık stresinde trehaloz sentezine ek olarak ısı şoku proteinlerinin sentezi de aktive edilmektedir (Lindquist ve Craig 1988, Castells-Roca ve ark. 2011). Bu genlerin transkripsiyonları ise Hsf1 (heat shock factor) transkripsiyon faktörünce aktive edilmektedir. Hsf1'in de aktive ettiği genlerdeki bağlanma dizisi nGAAn olarak belirlenmiştir (Estruch 2000, Yamamoto ve ark. 2008). HSE (Heat Shock Element) olarak adlandırılan bu nükleotid dizisinin de ısı şoku ile aktive edilen bir çok genin promotor bölgesinde kısa aralıklarla tekrarlı olarak bulunmaktadır. HSE sekansına spesifik olarak Hsf1p bağlanmaktadır. Isı şoku ile aktive edilen genlerin aynı zamanda oksidatif stres ile de aktive edildikleri rapor edilmektedir (Estruch 2000)

S. cerevisia'nın üreme ortamında oksijen radikali üretebilen H_2O_2 ve menadion gibi belirli bileşiklerin bulunması da oksidatif sinyal iletim yolunu aktive eder (Estruch 2000). Bu tür reaktif oksijen türü (ROS) üreten bileşiklere yanıt olarak antioksidan özellikli glutatyon, süperoksit dismutaz, thioredoksin katalaz gibi faktörlerin

transkripsiyonları aktive edilir. Bu faktörlerin transkripsiyonları da Yap1p olarak bilinen aktivatör tarafından yapılmaktadır (Kuge ve Jones 1994). Oksidatif strese yanıt oluşumunda bazı ısı şoku proteinlerinin de işlevlerinin olduğu rapor edilmiştir (Yamamoto ve ark. 2007)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Araştırmada Kullanılan *S. cerevisiae* Suşları ve Üreme Koşulları

Bu tez araştırmasında kullanılan *S. cerevisiae* suşlarının genotipleri çizelge 3.1’de verildi. Bu *S. cerevisiae* suşları University of Frankfurt’da bulunan EUROSCARF koleksiyonundan sağlandı. Bu Suşlardan YST124 kodu ile gösterilen *S. cerevisiae* suşu standart yaban tip suş olarak kullanıldı. YST241 ve YST242 kodları ile verilen suşlar ise $\Delta hot1$ ve $\Delta yap1$ mutant suşları olarak kullanıldı. Bu mutant suşlar $\Delta hot1$ ve $\Delta yap1$ mutasyonları hariç YST124 suşu ile izogenik suşlardır.

S. cerevisiae suşları EUROSCARF koleksiyonundan zengin ortam olarak kullanılan YPD (%1 Yeast ekstrakt, %2 Pepton, %2 Dekstroz) besiyerinde sağlandı. *S. cerevisiae* suşları uzun süreli depolama için taze YPD petrilerinde üretildikten sonra steril 1 ml %20 gliserol içeren mikrofuj tüplerinde -70 °C’de depo edildi. Bu suşlar transformasyon amacı ile kullanılmak üzere YPD petrilerinde +4 °C’de saklandı. Bu tez araştırmasında kullanılan besiyerleri ve diğer çözeltilerin bileşimi ve hazırlanmaları tezin ekler bölümünde verildi.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşları ve özellikleri.

<i>S. cerevisiae</i> Suşu	Genotipi ve ilgili mutasyonlar
YST124	MATa, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0. (Haploid, Yaban tip)
YST241	ura3 Δ 0; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; YMR172w::kanMX4 (hot1 mutanı, YST124 ile izogenik)
YST242	ura3 Δ 0; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; YML007w::kanMX4 (yap1 mutanı, YST124 ile izogenik)

3.2. Araştırmada Kullanılan *HXT4* Gen Füzyonunun Yapısı ve Transformasyonu

Araştırmamızda kullanılan *Hxt4-lacZ* gen füzyonunu içeren plazmit daha önceki çalışmalar için Dr. L. Bisson'dan sağlandı (University of California-Davis). Bu plazmit Yeast Epizomal plazmit olarak adlandırılan (YE_p) plazmit çeşidi olup hem *E. coli*'de ve hem de *S. cerevisiae*'da stabil olarak kalabilen 2 μ m-*URA3* çeşidi bir plazmittir. Bu tür plazmitlerin *E. coli*'de çoğaltılıp saflaştırılması için ColE replikasyon orijini ve Ampisiline direnç sağlayan β -laktamaz geni (*bla*) bulunur. *S. cerevisiae* hücrelerinde çoğalmaları ve seleksiyon için de 2 μ m replikasyon orijini ve *URA3* geni bulunmaktadır (Rose ve ark. 1990). Araştırmamızda kullanılan *Hxt4-lacZ* gen füzyonunda *HXT4* geni promotor bölgesinin 1605 bç uzunluğundaki bölgesi (-1540'dan +65 bç'ne kadar olan bölge) bulunmaktadır (Theodoris ve ark. 1994). Bu promotor bölgesinin *Hxt4-lacZ* gen füzyonunda *HXT4* geninin normal kromozomda bulunan kopyasında olduğu gibi glukoz baskılaması ile kontrol edildiği daha önce yapılan araştırmalarda bulunmuştur (Özcan ve Johnston 1994, Teodoris ve ark. 1994). *S. cerevisiae* suşlarına transformasyonla aktarılan YE_p türü plazmitlerin seçici ortamda seleksiyon devam ettiği sürece hücrede kaybolmadan stabil olarak kaldıkları, *S. cerevisiae*'da hücre bölünmesine paralel olarak replikasyonlarının yapıldığı daha önce yapılan araştırmalar ile gösterilmiştir (Liao ve ark. 1987).

Araştırmalarımızda kullanılan *Hxt4-lacZ* plazmiti önce plazmit stoklarından alınarak *E. coli* DH5 α hücrelerine CaCl₂-MgCl₂ metodu ile transform edildi (Ausubel ve ark. 1993). *E. coli* transformantları LB-Ampisilin petrilerinde üretildi ve bu transformantlardan tek koloni seçilerek taze LB-Ampisilin petrilerine pasaj yapılarak 37 °C'de bir gece üretildi. Daha sonra bu *E. coli* transformantları 5 mL'lik LB-Ampisilin besiyerine ekilerek bir gece 37 °C'de üretildi. Ticari olarak sağlanan plazmit saflaştırma kiti kullanılarak *E. coli* kültürlerinden araştırmamızda kullanılan *Hxt4-lacZ* gen füzyonu plazmiti saflaştırıldı. Saflaştırılan plazmitler 100 μ L 1xTE çözeltilisinde -20 °C'deki derin dondurucuda saklandı.

Araştırmalarımızda kullanılan *Hxt4-lacZ* gen füzyonu yaban tip ve mutant *S. cerevisiae* suşlarına (YST124, YST241 ve YST242 suşları) daha önce tanımlanan lityum asetat-poli etilen glikol (PEG) yöntemi ile transform edildi (Rose ve ark. 1990). Transformasyon için önce maya suşları 5 mL'lik YPD besiyerinde gecelik kültürlerden alınarak logaritmik aşamaya kadar üretildi. Bu aşamada santrifüj ile 1000 g'de 5 dakika çöktürülen maya suşları steril 5 mL'lik saf su ile yıkandı ve daha sonra Rose ve ark. (1990) tarafından açıklandığı şekilde önce 1 saat süresince lityum asetat çözeltisinde inkübe edildi. Daha sonra PEG ve *Hxt4-lacZ* plasmiti eklenerek 30 °C'de 1 saat bekletildi. Bu period sonunda maya hücreleri ve plasmit karışımını içeren çözelti 42 °C'de 5 dakika ısı şokuna maruz bırakıldı. Bu aşamadan sonra maya hücreleri tekrar çöktürüldü ve 500 µL'lik saf suda süspansiyon edildi. Bu maya süspansiyonlarından 150 µL örnek alınarak Sc-Urasil+ %2 glukoz içeren petrilere yayma ekimi yöntemi ile ekildi. *S. cerevisiae* transformantlarının üremeleri için petrilere 30 °C'de 3-4 gün bekletildi. Transformant koloniler geliştiğinde bunlardan tek koloniler seçilerek yeni bir SC-Urasil %2 glukoz petrisine küçük pasajlar (1cm x 1cm ebatlarında) yapıldı. *S. cerevisiae* *Hxt4-lacZ* plasmitlerini içeren bu transformantlar üremeleri için tekrar 30 °C'de 3-4 gün inkübe edilerek *S. cerevisiae* transformantlarının petrilere üremeleri sağlandı. Araştırmamızda kullanılan farklı *S. cerevisiae* transformantlarını içeren petrilere araştırmalarımız süresince +4 °C'deki buzdolabında saklandı. Bu *S. cerevisiae* pasajları *Hxt4-lacZ* geni transkripsiyonuna abiyotik stres koşullarının etkilerini belirleneceği sıvı kültürlerle ekim için kullanıldı.

3.3. *Hxt4-lacZ* Transformantlarının Farklı Koşullarda Üretilmesi

S. cerevisiae'da *HXT4* geni transkripsiyonu glukoz baskılanması ile kontrol edilmektedir. Bundan dolayı araştırmalarımızda abiyotik stres koşullarının *HXT4* geni transkripsiyonuna etkileri hem repres koşullarda ve hem de derepres koşullarda incelendi. Repres koşullar için *S. cerevisiae* suşları önce 5 mL'lik Sc-Urasil + % 2 glukoz içeren sıvı besiyerinde çalkalamalı inkübatörde (140 devir/dakika) 30 C'de (*S. cerevisiae* için standart koşullar) bir gece (18-20 saat) üretilerek ön kültürler elde edildi. Bu ön kültürlerden taze 10 mL'lik Sc-Urasil + % 2 glukoz besiyerine 50 mL'lik erlenlerde 200 µL ekim yapılarak *S. cerevisiae* kültürlerinin standart şartlarda tekrar

logaritmik faza (OD₆₀₀: 0.8-1.0) kadar üremeleri sağlandı. Bu aşamada *S. cerevisiae* kültürlerinin 5 mL'si alınarak enzimatik ölçüm için bölüm 3.4'de açıklandığı şekilde hazırlandı. *S. cerevisiae* kültürünün diğer 5 mL'lik bölümü ise santrifüjde çöktürüldü ve 5 ml steril su ile yıkandıktan sonra derepres üreme için 5 mL'lik Sc-Urasil + % 0.05 glukoz içeren besi yerine aktarıldı. Derepres koşullarda üreme için *S. cerevisiae* kültürleri tekrar standart koşullarda 4-5 saat süresince üremeye bırakıldı.

Repres ve derepres koşullarda üreyen *S. cerevisiae* suşlarına ozmotik stres uygulamak için logaritmik aşamada steril stok NaCl çözeltisinden (5M) son konsantrasyonu 1 M olacak şekilde NaCl eklendi (Blomberg 1995). Oksidatif stres oluşturmak için ise repres veya derepres olarak üretilen *S. cerevisiae* kültürlerine logaritmik aşamada son konsantrasyonu 40 µm olacak şekilde menadion eklendi. Menadion absolu etanolde stok çözelti olarak hazırlandı (Todorova ve ark. 2009). Sıcaklık stresi oluşturmak için ise *S. cerevisiae* kültürleri önce 26 °C'de logaritmik aşamaya kadar üretildi. Bu aşamada maya kültürleri 39 °C'deki inkübatöre aktarıldı ve 4 saat süresince çalkalamalı inkübatörde 140 devir/ dakika hızda inkünbe edildi.

İnkübasyon süreleri sonunda maya kültürleri santrifüjde 1000 g'de 5 dakika çöktürüldü. Çöken maya hücreleri 1 mL steril saf suda süspansiyon edilerek mikrofüj tüplerine alındı. Mikrosantrifüjde tekrar çöktürülen maya hücreleri 200 µL lizis tampon çözeltisinde (breaking buffer) süspansiyon edilerek -70 °C'deki derin dondurucuda β-galaktozidaz aktivitesi belirleninceye kadar saklandı.

3.4. β-Galaktozidaz Aktivitelerinin Ölçülmesi

Ependorf tüplerine alınan ve -70 °C'deki derin dondurucuda bekletilen *S. cerevisiae* hücreleri enzim aktivitelerinin ölçülebilmesi için oda sıcaklığında 5 dk bekletilerek çözümleri sağlandı. Daha sonra lizis tampon çözeltisi içindeki *S. cerevisiae* süspansiyonlarına 20 µL saf kloroform ve 20 µL % 0.1 SDS eklenerek 10-15 sn en üst hızda vorteks ile karıştırılarak *S. cerevisiae* hücrelerinden permeabilize olmuş hücre lizatları elde edildi. Bu hücre lizatlardan 20 µL alınarak 1x10 cm'lik deney tüplerinde önceden hazırlanmış 980 µL Z tampon çözeltisine ilave edildi ve hücre lizatı

tampon çözelti karışımları sıcak su banyosunda 30 °C’de 2 dk ön inkübasyona bırakıldı. Hücre lizatlarında *Hxt4-lacZ* gen füzyonundan ekspres edilen β -galaktozidaz aktivitelerini belirlemek için reaksiyon tüplerine β - galaktosidaz enziminin substratı olan ONPG (Orto Nitro Phenyl Galactoside) çözeltisinden 200 μ L ilave edildi ve kısa süre karıştırıldı. Reaksiyon ortamında sarı renk oluşuncaya kadar 30 C’de su banyosunda bekletildi. Reaksiyon karışımında spektrofotometrede ölçülebilecek tondaki sarı renk oluştuğunda reaksiyon süresi kaydedilerek ortama reaksiyonu durdurmak için 1 M Na₂CO₃ çözeltisinden 500 μ L eklendi (Guarente 1983).

Hxt4-lacZ gen füzyonundan sentezlenen β -galaktozidaz aktiviteleri daha önce açıklandığı şekilde hesaplandı (Ek-2) (Guarente 1983, Ausubel ve ark. 1993). Aktivite tayininde kullanılan permeabilize edilmiş *S. cerevisiae* lizatlarının protein konsantrasyonları Lowry yöntemi ile belirlendi (Guarente 1983). Deneyler üçlü takımlar olarak yapıldı ve en az iki kez tekrarlandı. Deneylerde standart sapmanın daha önce rapor edildiği gibi %10 - %15 aralığında olduğu bulundu. β -galaktozidaz aktiviteleri dakikada 1 mg toplam protein içeriği tarafından hidroliz edilen nmol ONPG (nmol ONPG/dk/ mg protein) olarak verildi. β -galaktozidaz aktivitesinin ölçümünde kullanılan çözeltilerin bileşimi ve hazırlanmaları tezin ekler bölümünde verildi.

4. BULGULAR

4.1. *HXT4* Transkripsiyonuna Ozmotik Stresin Etkileri

S. cerevisiae'da ozmotik stres hücre membranında bulunan Sln1p ve Sho1p ile algılanır ve ozmotik strese yanıt olarak da *S. cerevisiae* hücrelerinde glikolitik yola bağlı olarak gliserol sentezlenir (Hohmann 2002). *HXT4* geni de hücreye glukoz taşınmasında önemli işlevi olan Hxt4p glukoz taşıyıcısı proteini kodlamaktadır. *HXT4* geni transkripsiyonu, moleküler mekanizması bölüm 2.'de açıklandığı şekilde glukoz sinyal iletimine bağlı olarak glukoz baskılaması (repress koşullar) ve glukoz baskılamasının kaldırılması (derepress koşullar) ile kontrol edilmektedir. Bundan dolayı araştırmamızda bu genin transkripsiyonu hem repress ve hem de derepress koşullarda incelendi. Araştırmamızda önce *S. cerevisiae* suşları standart koşullarda logaritmik aşamaya kadar üretildi ve daha sonra ilgili abiyotik stres koşulu oluşturuldu. *S. cerevisiae* suşları stres koşullarında 4 saat inkübe edilerek bu koşulların *Hxt4-lacZ* transkripsiyonuna etkileri belirlendi.

Araştırmamızda *HXT4* geni transkripsiyonunun hem repress koşullarda ve hem de derepress koşullarda ozmotik stres tarafından baskılandığı bulundu (Çizelge 4.1). Repress koşullarda yaklaşık 1100 ünite olan *Hxt4-lacZ* transkripsiyonunun ozmotik stres oluşturan NaCl varlığında yaklaşık %20 oranında azalarak 800 ünite olduğu bulundu. Derepress koşullarda *HXT4* geni transkripsiyonunun beklendiği gibi 6-kat artarak 6633 ünite ye yükseldiği belirlendi. Fakat derepress koşullara ek olarak üreme ortamında 1M NaCl'nin bulunması *HXT4* geni transkripsiyonunun tam olarak aktive edilmesini engellediği görülmektedir. Glukoz baskılamasının olmadığı koşullarda 6633 ünite olan transkripsiyonun ortamda ozmotik stres oluştuğunda yaklaşık 3 kat daha az gerçekleştiği bulundu (Çizelge 4.1). Bu sonuçlar ozmotik stresin *S. cerevisiae*'da *HXT4* geni transkripsiyonunu baskıladığını fakat bu genin bazal seviyedeki yani repress koşullardaki transkripsiyona etkisinin düşük seviyede olduğunu göstermektedir.

Bununla birlikte *Hxt4-lacZ* gen füzyonunun ozmotik stres varlığında repress ve derepress koşullardaki transkripsiyonu kıyaslandığında derepress koşullarda yapılan *Hxt4-*

lacZ transkripsiyonunun repres koşullara göre yaklaşık 3 kat daha fazla yapılabildiği görülmektedir (çizelge 4.1). Bu sonuç ozmotik stresin *HXT4* geni transkripsiyonunun derepres koşullarda tam olarak baskılayamadığını da göstermektedir.

Çizelge 4.1. *HXT4* geni transkripsiyonuna ozmotik stresin etkisi.

Üreme Koşulları	<i>HXT4</i> Transkripsiyonu ¹	Değişim Oranı ²
Repres (R, %2 Glukoz)	1117 ± 83	
R+ Ozmotik Stres (1M NaCl 4 saat)	801 ± 22	- 0.27
Derepres (DR, %0.05 Glukoz)	6633 ± 422	
DR + Ozmotik Stres (1M NaCl 4 saat)	2436 ± 243	- 2.7

¹*HXT4* transkripsiyonu *Hxt4-lacZ* gen füzyonundan sentezlenen β -galaktozidaz aktiviteleri olarak verilmiştir (nmol ONPG/Dakika/mg protein).

²Değişim oranları R veya DR koşullara göre kat azalma (-) veya artış (+) olarak verilmiştir.

4.2. Oksidatif Stresin *HXT4* Geni Transkripsiyonuna Etkileri

Oksidatif stres metabolizma sırasında oluşan reaktif oksijen radikalleri gibi etmenlerce de normal hücrelerde oluşan bir abiyotik stres koşuludur. Menadion düşük konsantrasyonlarda üreme ortamında bulunduğu letal olmayıp oksijen radikalleri üreterek oksidatif stres koşullarının oluşmasını sağlar (Todorova ve ark. 2009).

Araştırmamızın bu bölümünde hem repres ve hem de derepres koşullarda oksidatif stresin *HXT4* genine etkileri *Hxt4-lacZ* gen füzyonunun transkript seviyesi ölçülerek belirlendi. Repres koşullarda *Hxt4-lacZ* gen füzyonunun aktivitesinin oksidatif stres etkisi ile yaklaşık 3 kat aktive edildiği belirlendi. Repres koşullarda 1117 ünite olan *Hxt4-lacZ* transkripsiyonunun oksidatif stresi uyaran menadion varlığında 3 kat

artarak 3055 üniteye yükseldiği bulundu. Derepres koşullarda oksidatif stresin *Hxt4-lacZ* transkripsiyonuna etkisinin ise daha az seviyede olduğu görülmektedir. Glukoz baskılamasının olmadığı derepres koşullarda 6633 ünite olan *Hxt4-lacZ* gen füzyonunun transkripsiyonu oksidatif stres etkisi ile 9083 üniteye yükselmektedir. Repres koşullarda 3 kat olan artışın derepres koşullarda 0.4 kat kadar düşük olduğu görülmektedir. Repres ve derepres koşullarda üretilen *S. cerevisiae* suşunda oksidatif stresin *Hxt4-lacZ* geni transkripsiyonuna etkileri karşılaştırıldığında ise derepres koşullarla birlikte oksidatif stresin *Hxt4-lacZ* transkripsiyonunda yaklaşık 9 kat bir artış olduğu da (1117 ünite den 9083 üniteye artış) görülmektedir.

Çizelge 4.2. *HXT4* geni transkripsiyonuna oksidatif stresin etkisi.

Üreme Koşulları	<i>HXT4</i> Transkripsiyonu ¹	Değişim Oranı ²
Repres (R, %2 Glukoz)	1117 ± 83	
R+ Oksidatif Stres (40µM Menadion 4 saat)	3055 ± 258	+ 2.74
Derepres (DR, %0.05 Glukoz)	6633 ± 422	
DR + Oksidatif Stres (40µM Menadion 4 saat)	9083 ± 872	+ 0.4

¹*HXT4* transkripsiyonu *Hxt4-lacZ* gen füzyonundan sentezlenen β-galaktozidaz aktiviteleri olarak verilmiştir (nmol ONPG/Dakika/mg protein).

²Değişim oranları R veya DR koşullara göre kat azalma (-) veya artış (+) olarak verilmiştir.

4.3. Sıcaklık Stresinin *HXT4* Geni Transkripsiyonuna Etkileri

Sıcaklık stresinin *S. cerevisiae* metabolizmasına önemli etkileri bulunmaktadır. Sıcaklık stresinin olumsuz etkilerini önlemek için *S. cerevisiae*'da glikolitik yola bağlı olarak glukoz-6-fosfattan bir çeşit disakkarit olan trehaloz sentezlenmektedir (Parrou ve ark. 1997).

Sıcaklık stresinin *HXT4* geni transkripsiyonuna etkilerini belirlemek için de *Hxt4-lacZ* gen füzyonunu içeren *S. cerevisiae* hücreleri repres ve derepres koşullarda önce 26 °C’de logaritmik faza kadar üretildi, daha sonra 39 °C’deki inkübatöre aktarılıp 4 saat süresince sıcaklık stresine maruz bırakıldılar.

Repres koşullarda üretilen *S. cerevisiae* transformantlarına sıcaklık stresinin uygulanması *Hxt4-lacZ* geni transkripsiyonunda önemli derecede (5 kat) artışa neden olduğu görüldü. Repres koşullarda 1117 ünite olan *Hxt4-lacZ* transkripsiyonunun sıcaklık stresi etkisi ile 5580 üniteye çıktığı bulundu (Çizelge 4.3). Fakat beklenmedik bir şekilde derepres koşullara aktarılan ve sıcaklık stresi uygulanan *S. cerevisiae* transformantlarında *Hxt4-lacZ* gen füzyonunun derepres olmadığı ve transkripsiyonun bazal seviyede (repres seviye, 1117 ünite) kaldığı bulundu. Bu sonuçlar *HXT4* geni aktivasyonunun sıcaklık stresinde gerçekleşmediği göstermektedir. Aynı zamanda sıcaklık stresine yanıt oluşabilmesi için *S. cerevisiae*’nın yüksek glukoz içeren ortamda üremesi gerektiği de görülmektedir.

Çizelge 4.3. Sıcaklık stresinin *HXT4* geni transkripsiyonuna etkisi.

Üreme Koşulları	<i>HXT4</i> Transkripsiyonu ¹	Değişim Oranı ²
Repres (R, %2 Glukoz)	1117 ± 83	
R+ Isı Şoku (39 C 4 saat)	5580 ± 191	+ 5
Derepres (DR, %0.05 Glukoz)	6633 ± 422	
DR + Isı Şoku (39 C 4 saat)	1274 ± 81	- 5

¹*HXT4* traskripsiyonu *Hxt4-lacZ* gen füzyonundan sentezlenen β-galaktozidaz aktiviteleri olarak verilmiştir (nmol ONPG/Dakika/mg protein).

²Değişim oranları R veya DR koşullara göre kat azalma (-) veya artış (+) olarak verilmiştir.

4.4. *HXT4* Geni Transkripsiyonuna Hot1p ve Yap1p Faktörlerinin Etkileri

S. cerevisiae'da ozmotik stres hücre zarında bulunan Sln1p ve Shop1 sensör proteinleri tarafından algılanıp sitoplazmaya aktarılır (Hohmann 2002). Sitoplazmik sinyal iletim sisteminin aktivasyonu sonucu hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eden Hot1p de aktive edilir ve ozmotik strese yanıt olarak bazı genlerin transkripsiyonunu aktive eder. Hot1p transkripsiyon aktivatörü tarafından aktive edilen genler de *S. cerevisiae* hücrelerini ozmotik strese yanıt oluşturmalarını ve hücrelerin korunmasını sağlar.

Araştırmanın bu bölümünde *HXT4* geni transkripsiyonunun ozmotik stres koşullarında Hot1p tarafından kontrol edilip edilmediği test edildi. Bunun için *S. cerevisiae*'nın *HOT1* genini içermeyen ($\Delta hot1$) mutant suşu (YST241) kullanıldı. *S. cerevisiae* $\Delta hot1$ mutant suşu da hem repres ve hem de derepres koşullarda önce logaritmik faza kadar üretildi ve bu aşamada *S. cerevisiae* kültürleri ikiye bölünerek bir bölümüne ozmotik stresi uyarmak için 1 M NaCl ilave edildi. Üreme periodu sonunda *S. cerevisiae* kültürleri çöktürüldü ve bölüm 3'de açıklandığı şekilde *Hxt4-lacZ* gen füzyonundan yapılan transkript miktarları β -galaktozidaz aktiviteleri ölçülerek belirlendi.

S. cerevisiae $\Delta hot1$ mutant suşunda *Hxt4-lacZ* gen füzyonunun repres koşullardaki transkripsiyon seviyesinin normal yaban tip suşa göre daha fazla yapıldığı bulundu (Çizelge 4.4.1). Yaban tip suşa 1117 ünite olan *Hxt4-lacZ* transkripsiyonunun $\Delta hot1$ mutantında 1876 üniteye çıktığı bulundu. Bununla birlikte repres koşullarda üremekte olan $\Delta hot1$ mutant suşuna ozmotik stresin uygulanması yaban tip suşa olduğu gibi (Çizelge 4.1) bir miktar azalmaya neden olduğu ve transkripsiyonun 1876 üniteden 1662 üniteye azaldığı belirlendi (Çizelge 4.4.1). *S. cerevisiae* $\Delta hot1$ mutant suşunda derepres koşullarda *Hxt4-lacZ* gen füzyonundan yaban tip suşa göre %25 kadar daha fazla transkripsiyon yapıldığı bulundu. Yaban tip suşa derepres koşullarda 6633 ünite olan *Hxt4-lacZ* gen füzyonu transkripsiyonunun $\Delta hot1$ mutantında 9258 üniteye çıktığı

bulundu. Derepres koşullara ek olarak ozmotik stres uygulanmasının $\Delta hot1$ mutantında da yaban tip suşta olduğu gibi *Hxt4-lacZ* gen füzyonundan transkripsiyonun aktivasyonunu engellediği belirlendi. Normal olarak derepres koşullarda üretilen $\Delta hot1$ suşunda 9258 ünite olarak ölçülen *Hxt4-lacZ* gen füzyonu aktivitesinin ozmotik stres uygulandığında bazal seviyeye yakın oranlarda kaldığı görölmektedir (Çizelge 4.4.1).

Çizelge 4.4.1: Hot1p'nin *HXT4* geni transkripsiyonuna etkisi.

Üreme Koşulları	<i>HXT4</i> Transkripsiyonu ¹	Değişim Oranı ²
Repres (R, %2 Glukoz)	1876 ± 56	
R+ Ozmotik Stres (1M NaCl 4 saat)	1662 ± 105	--
Derepres (DR, %0.05 Glukoz)	9258 ± 851	
DR + Ozmotik Stres (1M NaCl 4 saat)	2238 ± 148	- 4.1

¹*HXT4* transkripsiyonu *Hxt4-lacZ* gen füzyonundan sentezlenen β -galaktozidaz aktiviteleri olarak verilmiştir (nmol ONPG/Dakika/mg protein).

²Deđişim oranları R veya DR koşullara göre kat azalma (-) veya artış (+) olarak verilmiştir.

S. cerevisiae'da oksidatif strese yanıt olarak aktive edilen transkripsiyon faktörlerinden birisi de Yap1p'dir. Yaban tip *S. cerevisiae* suşunda oksidatif strese yanıt olarak *Hxt4-lacZ* gen füzyonundan özellikle repres koşullarda transkripsiyonun 3 kat arttığı belirlendi (Çizelge 4.2). Bu artışın *S. cerevisiae*'da Yap1p'ye bağlı olup olmadığını test etmek için *YAP1* geni içermeyen ($\Delta yap1$) mutant suş (YST242) kullanılarak oksidatif stres deneyleri tekrarlandı. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.4.1'de verildi. *S. cerevisiae* $\Delta yap1$ mutant suşunda da repres koşullarda *Hxt4-lacZ* gen füzyonundan yapılan transkripsiyonun yaban tip suşa göre daha fazla olduğu

görülmektedir. Repres koşullarda üretilen *Δyap1* mutant suşuna oksidatif stres uygulandığında *Hxt4-lacZ* gen füzyonu transkripsiyonunda 1000 ünitelik bir artış olduğu bulundu. Bununla birlikte yaban tip suşta repres koşullarda ozmotik stres uygulandığında 3 kat olan artışın *Δyap1* mutant suşunda daha az gerçekleştiği belirlendi.

S. cerevisiae *Δyap1* mutant suşu derepres koşullarda üretilerek *Hxt4-lacZ* gen füzyonundan yapılan transkripsiyon da belirlendi. Repres koşullarda olduğu gibi derepres koşullarda üretilen *Δyap1* mutant suşunda da yaban tip *S. cerevisiae* suşuna göre *Hxt4-lacZ* transkripsiyonunun daha fazla yapıldığı belirlendi Yaban tip suşta 6633 ünite olan *Hxt4-lacZ* transkripsiyonunun *Δyap1* mutantında 10279 üniteye çıktığı bulundu. *Δyap1* mutant suşuna derepres koşullarda oksidatif stres uygulamasının da repres koşullarda olduğu gibi *Hxt4-lacZ* transkripsiyonunda yaklaşık %30 kadar artışa neden olduğu görüldü (Çizelge 4.4.2).

Çizelge 4.4.2. Yap1p'nin *HXT4* geni transkripsiyonuna etkisi.

Üreme Koşulları	<i>HXT4</i> Transkripsiyonu ¹	Değişim Oranı ²
Repres (R, %2 Glukoz)	1855 ± 154	
R+ Oksidatif Stres (40µM Menadion 4 saat)	2884 ± 433	+ 0.8
Derepres (DR, %0.05 Glukoz)	10279 ± 624	
DR + Oksidatif Stres (40µM Menadion 4 saat)	13143 ± 738	+ 0.4

¹*HXT4* transkripsiyonu *Hxt4-lacZ* gen füzyonundan sentezlenen β-galaktozidaz aktiviteleri olarak verilmiştir (nmol ONPG/Dakika/mg protein).

²Değişim oranları R veya DR koşullara göre kat azalma (-) veya artış (+) olarak verilmiştir.

4.5. *HXT4* Geni Promotor Bölgesinin Analizi

S. cerevisiae genomunun tamamının bilinmesi ve genom bilgisinin de biyoinformatik analizler için kolay ulaşılabilir olması genlerin kontrol mekanizmalarının incelenmesinde önemli bir kaynak oluşturmaktadır. *HXT4* geni *S. cerevisiae* genomunda 8 kromozom da tek kopya olarak bulunan bir gendir. Sistemik gen analizleri için bu genin kod numarası ise YHR092c'dir. *HXT4* geni promotoru bölgesinde glukoz sinyal iletim yoluna yanıt olarak bu genin transkripsiyonunu aktive eden ve baskılayan transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı sekanslar daha önce deneysel olarak belirlenmiştir (Özcan ve Johnston 1994, Özcan ve ark. 1996, 1998). Bu transkripsiyon faktörlerinden Rgt1p ve Gcr1p *HXT4* geni transkripsiyonunun aktivasyonu sağlayan aktivatör faktörlerdir (Çizelge 4.5.1 ve Çizelge 4.5.2).

Bu tez araştırmasının bu bölümünde *HXT4* geninin 1000 Kbç uzunluğundaki promotor bölgesinde stres koşulları ile aktive edilen transkripsiyon faktörleri bağlanma dizilerinin olup olmadığı incelendi (Gelade ve ark. 2003). Osmotik stres ile aktive edilen transkripsiyon faktörleri Hot1p ve Msn2/4p'dir. Bu faktörlerden Msn2/4p genel stres yanıt elementi olarak da bilinmektedir ve Çizelge 4.5.2'de verilen sekansa bağlandığı daha önce belirlenmiştir. Oksidatif strese yanıt olarak aktive edilen transkripsiyon faktörü de Yap1p'dir. Sıcaklık stresine yanıt olarak aktive edilen transkripsiyon faktörü Hsf1 olup bu faktörlerin hedef genlerin promotoru bölgelerinde bağlandıkları diziler çizelge 4.5.2'de verilmiştir.

Hot1p, Msn2/4p, Yap1p ve Hsf1p faktörlerinin bağlanma dizilerinin *HXT4* promotor bölgesinde bağlanma dizilerinin olup olmadığı incelendi. Transkripsiyon faktörü bağlanma dizilerinin belirlenmesinde ortak diziye (consensus sequence) uyan nükleotid dizileri seçildi. Ortak diziden 1 veya daha fazla sapmaların bulunduğu sekanslar dikkate alınmamıştır.

Bu faktörlerden Hot1p hariç diğerlerinin *HXT4* geni promotor bölgesinde bağlanma dizileri olduğu belirlendi. Bu faktörlerin *HXT4* promotor bölgesindeki bağlandığı sekansların konumları çizelge 4.5.2'de verildi. Hot1p'nin DNA'ya bağlanma bölgesi olduğu bilinmektedir. Buna rağmen henüz Hot1p ile kontrol edilen promotorlardaki bağlanma sekansı belirlenememiştir. Hot1p'nin amino asit sekansı ile transkripsiyon aktivatörü Gcr1p'nin amino asit sekansı arasında önemli derecede homoloji olduğu belirlenmiştir (Rep ve ark. 1999). Bundan dolayı Hot1p nin de Gcr1p'nin bağlandığı 5'-CTTCC-3' sekansına benzerlik gösteren nükleotid dizilerine bağlanması beklenebilir.

Çizelge 4.5.1. HXT4 geni promotörü bölgesi. Translasyon başlama kodonu ATG +1 ile gösterilmiştir. Transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgeleri altı çizgi ile gösterilmiştir.

TCAACGATGTTGCCAAATAGTCGTACCTGAAAAGCTTAGGTTTTCCATTTATGCGAATAT- 941
TGTTGCTACAACGGTTTTATCAGCATGGACTTTTTCGAATCCAAAAGGTAAATACGATTATA

CTCTATGCAAAATAAATTTTAAGTACCTCAAAATTTTTTGCACCGATCAAGATATAATA -861
GAGATACGTTTTTATTTAAAATTCATGGAGTTTTAAAAAACGTGGCTAGTTCATATTTAT

ATCAGATGAGAATGAATAAACAAGACGCAGATGAAGGCTGGGCCTCCAACGAAACCCAGT -801
TAGTCTACTCTTACTTATTTGTTCTGCGTCTACTTCCGACCCGGAGGTTGCTTTGGGTCA

ACACTGCAGTAATTTCCACCAAGAAACGCTTGGCCTTCGTAAAGTCACTTGCAGCAGCAT -741
TGTGACGTCATTAAGGTGGTTCTTTGCGAACCCGGAAGCATTCAGTGAACGTCGTCGTA

AGC**GGA**AACA**GGA**AGAAAAATATCCGAGTCAGCTGGTCCGGGATTTTTTTTTGCCCCA -681
TCGCCTTTGTT**CCTTC**TTTTTATAGGCTCAGTCGACCAAGGCCCTAAAAAAAACGGGTT

TA**GGA**AAAAACAATGCCCAAACC**GGA**ACCATTTCCCGTTTTTTCTTTTCGGTTTTATCCGCTT -621
ATCCTTTTTGTTACGGGTTTGGCCTTGGTAAAGGGCAAAAAAGAAAGCCA**AATAGGC**GAA

T**CCTCC**AAAAAATCCGTACAAAATGGAAAAACAATGTTTATATAATATTTCCACATTTTT -561
AGAAGGTTTTTTTTAGGCATGTTTTACCTTTTTGTTACAAATATATTATAAGGTGTAAAAA

CCTGGCCTGCGTCTCTTTCTGTGGAGAAGAAGATATTTCCCTGAGCAGTTTTTTTTTCTG -501
GGACCCGGACGCAGAGAAAGACACCTCTTATTCTATAAAGGGACTCGTCAAAAAAAAAGAC

A**CCCCT**TTTTTTTTTCCACCCCCCGGTTTTTTTTTCCA**TGGGG**CCCCATATTTCCCCCGC -441
TGGGGAAAAAAAAGGGTGGGGGGGGCCAAAAAAA**AGG**TACCCCGGGGTATA**AGG**GGGCG

CTGCAGGAAACT**TGGGG**AAAAGA**GGA**AAAACACTTC**GGA**TAAAAACGGTCAAGAAGCTCT -381
GACGTCTTTTTGAACCCCTTTCTCCTTTTTGTGAAGCCTATTTTTGCCAGTTCCTTCGAGA

TCGACGATTTAGTGCCACCTTCATGAAA**AATTCC**AGAGTTTTTTCCAGCTGCTTTGATTT -321
AGCTGCTAAATCACGGTGGAAAGTACTTTTTAAGGCTCAAAAAAGGTCGACGAAACTAAA

TACAGTCCATTATTCGGCGTCTAACGATTCTGATTAAGAAACAA**CGGAGGA**AAACTCAAA -261
ATGTCAGGTAATAAGCCGCAGATTGCTAAGACTAATTCCTTTGTTGCTCCTTTTGAGTTT

TTCTAATATAATATTTTTTAAGTTTATGAAGG**TGGGG**TGGTAAGAAAAGCAACTAAAATAA -201
AAGATTATATTATAAAAATCTTTTATCTTCCAGGGGACCATTCTTTTCGTTGATTTTAT

TCTTCAAGTC**AATTAG**TGGTGAAGGCTTCAACAC**TGGGG**AATGAATAATATGTCATCTA -161
AGAAGTTCAGTTAATCACCACTTTTCGAAGTTGTGACCCCTTACTTATTATACAGTAGAT

GAAAAAATTTTA**TATAAA**TACTCAGTGTTTTATTCAATTATCTCGATTCACTTCAA -101
CTTTTTTAAAATATATTTATGAGTCACAAAATAAGTAATAAGAGCTAAGTAAGTGAAGTT

TTCTCTTCATGAGTAATAGAAACCATAAAGAAAAGATATATTCAAAGCCTCTTATCAAG -41
AAGGAGAAGTACTCATTATCTTTGGTATTTCTTTTCTATATAAGTTTCGGAGAATAGTTC

GTTTGGTTTTGAAACACTTTTACAATAAAATCTGCCAAAA **ATG**
CAAACCAAACTTTGTGAAAATGTTATTTTAGACGGTTTTT +1

Çizelge 4.5.2. *HXT4* geni promotörü bölgesinde belirlenen bazı transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri. (DNA sekansları 5'-3' yönünde verilmektedir).

Transkripsiyon faktörü	DNA'da bağlanma sekansı	<i>HXT4</i> promotöründeki bağlandığı yer
Rgt1p	CGGAnnA	-624, -270
Mig1p	T(C/G)(C/T)GGGG	-255, -423, 457
Gcr1p	CTTCC	-615, -725
Hot1p	CTTCC?	??
Yap1p	AATTAC	- 348, -185
Msn2/4p (STRE)	CCCCT	-495
Hsf1p	GAAnn GAA	Birçok bölgede her iki zincirde tekrarlı olarak bulunmaktadır.

5. TARTIŞMA

Abiyotik stres koşulları bütün canlılarda metabolizmayı etkileyen çevresel bir etkendir. Bu stres koşullarından bazıları yüksek sıcaklık, yüksek ozmolarite, ve oksidatif streslerdir. Canlıların abiyotik koşullarda hayatsal faaliyetlerini yürütebilmek için çeşitli yanıtlar geliştirdikleri görülmektedir. Bu yanıtlardan bazıları da hücresele seviyede sitoplazmik bileşenleri korumaya yönelik proteinler ve metabolitler sentezlemektir. Özellikle sıcaklık stresine karşı sentezlenen ısı şoku proteinlerinden bazıları sitoplazmik proteinlerin yapılarındaki bozulmaları önleyebilir, yanlış katlanmaları düzeltebilir (Estruch 2000). Abiyotik stres koşullarında *S. cerevisiae*'da sentezlenen iki önemli metabolit bulunmaktadır. Bunlar trehaloz ve gliseroldur (Francois ve Parrou 2001; Hohmann 2002). Her iki metabolit de glikolitik yola bağlı olarak glukozdan sentezlenmektedir.

S. cerevisiae'da glukozun hücre içine taşınması kolaylaştırılmış difüzyon mekanizması ile ve Hxt (Hexose transporters) proteinleri ile yapılmaktadır (Boles ve Hollenberg 1997). *S. cerevisiae*'da glukozun hücreye alınmasında önemli işlevi olan Hxt4p de *HXT4* geni tarafından kodlanmaktadır (Theodoris ve ark. 1994). Bu çalışmanın amacı abiyotik stres koşullarına yanıt olarak *HXT4* geni transkripsiyonundaki değişiklikleri incelemektir. *HXT4* geni transkripsiyonu özellikle düşük glukoz ortamında aktivatör proteinler Rgt1p ve Gcr1p tarafından aktive edilmektedir (Özcan ve Johnston 1994, Türkel ve Bisson 1999). Yüksek glukoz ortamında ise represör protein olan Mig1 ve represör özelliği de olan Rgt1p ile baskılanmaktadır.

Stres koşullarına yanıt olarak hedef genlerin aktivasyonları bazı transkripsiyon faktörlerince sağlanmaktadır. Msn2/4p genel stres yanıt faktörü olarak bilinmektedir ve abiyotik koşullarda aktive edilen genlerin transkripsiyonunu sağlar. *HXT4* promotor bölgesinde yaptığımız incelemede Msn2/4p'nin de bağlanabileceği nükleotid dizileri bulunduğu belirlendi. Bundan dolayı oksidatif stres ve sıcaklık stresi koşullarında *HXT4* geni transkripsiyonun aktivasyonunda bu faktörün işlevi olduğu düşünülmektedir.

Msn2/4p ye ek olarak oksidatif stres koşullarında özellikle Yap1p ve sıcaklık stresi koşullarında ise Hsf1p aktive edilmektedir. *HXT4* promotor bölgesinde yaptığımız incelemede hem Yap1p ve hem de Hsf1p'nin bağlandığı DNA dizilerinin bulunduğu belirlendi. Bu nedenle abiyotik stres koşullarında *HXT4* geni transkripsiyonunun aktivasyonunda Msn2/4p'ye ek olarak bu faktörlerin de işlevi olabileceği ön görülebilir.

Oksidatif stres ve özellikle sıcaklık stresi koşullarında *HXT4* transkripsiyonunun yüksek glukozlu ortamda aktive edildiği görülmektedir. Bu etkinin nedeni de henüz tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte özellikle Yap1p ve Hsf1p'nin aktiviteleri de glukoz sinyaline bağlı olabilir. Yüksek glukoz ortamında aktif olan PKA'nın düşük glukoz ortamında aktif olmaması Yap1p ve Hsf1p'nin de inaktivasyonuna neden olabilir. PKA'nın düşük glukoz ortamında ve ozmotik stres koşullarında baskılanmış olması bu olasılığı güçlendirmektedir (Rep ve ark. 2000). Bütün bunların bir sonucu olarak da düşük glukoz ortamında abiyotik stres koşullarının uygulanması *HXT4* geni transkripsiyonunun bazal seviyede kalmasına yol açabilir.

Ozmotik stres koşullarında hem yüksek ve hem de düşük glukoz ortamında *HXT4* geni transkripsiyonunun baskılandığı bilinmektedir (Türkel 1999). Bu baskılanmanın moleküler mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. Ozmotik stres koşullarında hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eden Hot1p'nin *HXT4* geninde de bağlanma sekansları bulunmaktadır. Ozmotik stres koşullarında aktive edilen ve baskılanan genler Rep ve ark (2000) tarafından mikro-dizin analizi ile belirlenmiştir. Bu çalışmada *HXT1* ve *HXT5*'in transkripsiyonlarının ozmotik stres ile aktive edildikleri rapor edilmekle birlikte *HXT4* ve diğer *HXT* genleri ile ilgili herhangi bir sonuç rapor edilmemiştir (Rep ve ark. 2000). Ozmotik strese yanıt oluşumunun *S. cerevisiae* üreme ortamındaki karbon kaynaklarına göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Siderus ve ark. 1997). Bu araştırmada ozmotik stresin PKA aktivitesini azalttığı ve bundan dolayı etanol ve gliserol laktat gibi üreme ortamlarında bulunan *S. cerevisiae* suşlarında PKA'ya bağlı sinyal iletim yolunun tam olarak çalışmadığı öne sürülmüştür.

Araştırmalarımızda mutant *S. cerevisiae* suşları ile elde edilen sonuçlar *HXT4* geni transkripsiyonunun Yap1p ve Hot1p'den bağımsız olduğunu da göstermiştir. Fakat

bu mutant suşlarla yapılan çalışmada hem repres ve hem de derepres koşullarda *HXT4* geni transkripsiyonunda artış olduğu da görülmektedir. Her iki sinyal iletim yolunun da glukoz transportunu kısıtladığına ilişkin herhangi bir kayıt bulunmamaktadır. Bundan dolayı bu mutant suşlarda görülen beklenmedik artışın nedeninin pleotropik bir etki veya *Hxt4-lacZ* gen füzyonunu taşıyan plazmitin bu suşlardaki kopya sayısı ile ilgili değişimden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bazal seviyede $\Delta yap1$ 'de yaban tip suşa göre daha az artış olması oksidatif stres yanıtının kısmen Yap1p'ye bağlı olduğunu göstermektedir.

HXT4 geni transkripsiyonu yüksek ve düşük glukoz konsantrasyonunda farklı transkripsiyon faktörlerince kontrol edilmektedir. Abiyotik stres koşullarında da *HXT4* promotor bölgesine hangi faktörlerin bağlandığı öncelikli olarak in-vivo DNase1 foot print analizi ile belirlenebilir. Bu metod ile herhangi bir genin promotorunda farklı koşullarda hangi promotor sekanslarına transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı veya bağlanmadığı belirlenmektedir. Yapılacak bu tür bir analiz ile repres ve derepres koşullarda üretilmekte olan *S. cerevisiae* suşlarına uygulanacak abiyotik stres koşullarında *HXT4* geni transkripsiyonu için gerekli olan promotor elementleri belirlenebilir.

KAYNAKLAR

Ausubel, S.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. 1993. Current protocols in Molecular Biology. (New York: Grene Publishing Associates and Willey-Interscience).

Baker, H.V. 1986. Glycolytic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*: Nucleotide sequence of GCR1, null mutants, and evidence for expression. *Mol. Cell. Biol.*, 6: 3774-3784.

Baker, H.V. 1991. GCR1 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a DNA binding protein whose binding is abolished by mutations in the CTTCC sequence motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88: 9443-9447.

Boles, E., Hollenberg, C.P. 1997. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1: 85-111.

Benaroudj, N., Lee, D.H., Goldberg, A.L. 2001. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.*, 276: 24261-24267.

Blomberg, A. 1995. Global changes in protein synthesis during adaptation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to 0.7M NaCl. *J. Bacteriol.*, 177: 3563-3572.

Busti, S., Cocchetti, P., Alberghina, L., Vanoni, M. 2010. Glucose-signaling mediated coordination of cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sensors*, 10: 6195-6240.

Busturia, A., Lagunas, R. 1986. Catabolite inactivation of the Glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, 132: 379-385.

Cabib, E., Leloir, L.F. 1958. The biosynthesis of trehalose phosphate. *J. Biol. Chem.*, 231: 259-275.

Castells-Roca, L., Garcia-Martinez, J., Moreno, J., Herrero, E., Belli, G., Perez-Ortin, J.E. 2011. Heat shock response in yeast involves changes in both transcription rates and mRNA stabilities. *Plos One* 6:e17272

De Risi, J.L., Lyer, V.R., Brown, P.O. 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 278: 680-686.

Estruch, F. 2000. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24: 469-486.

François, J., Parrou, J.L. 2001. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25: 125-145.

- Gancedo, J.M. 1998.** Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 334-361.
- Gancedo, J.M. 2008.** The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32: 673-704.
- Gelade, R., van de Velde, S., van Dijck, P., Thevelein, J.M. 2003.** Multi-level response of yeast genome to glucose. *Genome Biol.*, 4: 233.1-233.5.
- Gonzalez-Parraga, P., Sanchez-Fresneda, R., Martinez-Esparza, M., Argüelles, J.C. 2008.** Stress responses in yeasts: what rules apply? *Arch. Microbiol.*, 189:293-296.
- Guarente, L. 1983.** Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol.*, 101: 181-191.
- Hardie, D.G. 2007.** AMP-activated/SNF1 protein kinase: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 8: 774-785.
- Hedbacker, K., Carlson, M. 2009.** SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front. Biosci.*, 13: 2408-2420.
- Hohmann, S. 2002.** Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66: 300-372.
- Kim, J.H., Polish, J., Johnston, M. 2003.** Specificity and regulation of DNA binding by the yeast glucose transporter gene repressor Rgt1. *Mol. Cell. Biol.*, 23: 5208-5216.
- Kruckeberg, A.L. 1996.** The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, 166: 283-292.
- Kuge, S., Jones, N. 1994.** YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.*, 13: 655-664.
- Liao, X.-B., Clare, J.J. Farabaugh, P.J. 1987.** The upstream activation site of a Ty2 element of yeast is necessary but not sufficient to promote maximal transcription of the element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 8520-8524.
- Lindquist, S., Craig, E.A. 1988.** The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 22: 631-677.
- Özcan, S., Johnston, M. 1994.** Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (hxt) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.*, 15: 1564-1572.

Özcan, S., Leong T., Johnston M. 1996. Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose induced genes, is both an activator and a repressor of transcription. *Mol. Cell. Biol.*, 16: 6419-6426.

Özcan, S., Dover, J., Johnston, M. 1998. Glucose sensing and signaling by two Glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 17: 2566-2573.

Parrou, J.L., Teste, M.A., François, J. 1997. Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbonhydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: Genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology*, 143: 1891-1900.

Reifenberger, E., Freidel, K., Ciriacy, M. 1995. Identification of novel *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Mol. Microbiol.*, 16: 157-167.

Reifenberger, E., Boles, E., Ciriacy, M. 1997. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanism of glucose repression. *Eur. J. Biochem.*, 245: 324-333.

Rep, M., Reiser, V., Gartner, U., Thevelein, J.M., Hohmann, S., Ammerer, G., Ruis, H. 1999. Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 5474-5485.

Rep, M., Krantz, M., Thevelein J.M., Hohmann, S. 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. *J. Biol. Chem.*, 275: 8290-8300.

Rolland, F., Winston, F., Heiter, P. 2001. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.*, 26: 310-317

Ronne, H. 1995. Glucose repression in fungi. *Trends Genet.*, 11: 12-17.

Rose, M.D., Winston, F., Heiter, P. 1990. *Methods in Yeast Genetics. A Laboratory Course Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Santangelo, G.M. 2006. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70: 253-282.

Siderus, M., Rots, E., Mager, W.H. 1997. High-osmolarity signaling in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated in a carbon-source-dependent fashion. *Microbiology*, 143: 3241-3250.

Singer, M.A., Lindquist, S. 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotech.*, 16: 460-468.

Theodoris, G., Fong, N.M., Coons, D.M., Bisson, L.F. 1994. High-copy suppression of glucose transport defects by *HXT4* and regulatory elements in the promoters of the *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 137: 957-966.

Thevelein, J.M., Hohmann, S. 1995. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast. *Trends Biochem. Sci.*, 20: 3-10.

Todorova, T.T., Petrova, V.Y., Vuilleumier, S., Kujumdzieva, A.V. 2009. Response to different oxidants of *Saccharomyces cerevisiae ure2Δ* mutant. *Arch. Microbiol.*, 191: 837-845.

Türkel, S., Bisson, L.F. 1999. Transcription of the HXT4 gene is regulated by Gcr1p and Gcr2p in the yeast *S. cerevisiae*. *Yeast*, 15: 1045-1057.

Türkel, S. 1999. Hyperosmotic stress represses the transcription of HXT2 and HXT4 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol.*, 44: 372-376.

Yamamoto, A., Ueda, J., Yamamoto, N., Hashikawa, N., Sakurai, H. 2007. Role of heat shock transcription factor *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. *Euk. Cell.*, 6: 1373-1379.

Yamamoto, N., Maeda, Y., Ikeda, A., Sakurai, H. 2008. Regulation of thermotolerance by stress-induced transcription factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Euk. Cell.*, 783-790.

Yamamoto, N., Maeda, Y., Ikeda, A., Sakurai, H. 2008. Regulation of thermotolerance by stress-induced transcription factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Euk. Cell.*, 783-790.

Walsh, M.C., Smits, H.P., Scholte, M., van Dam, K. 1994. Affinity of Glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated during growth on Glucose. *J. Bacteriol.*, 176: 953-958.

Wendel, D.L., Bisson, L.F. 1994. High affinity Glucose transport protein Hxt2p of *Saccharomyces cerevisiae* is both repressed and induced by glucose and appears to be regulated posttranslationally. *J. Bacteriol.*, 176: 3730-3737.

EKLER

Ek 1: Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması

1: YPD (Yeast Ekstrakt, Pepton, Dekstroz)

YPD besiyeri araştırmalarımızda kullanılan *S. cerevisiae* suşlarının üretimi için zengin besiyeri olarak kullanıldı. YPD besi yeri içeriği:

Yeast Ekstrakt: 10 gram

Pepton: 20 gram

toplam 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlandı. Bu karışım 121°C’de 25 dakika otoklavda steril edildi.

YPD petrilerini hazırlamak için bu karışıma otoklavdan önce 20 gram/litre olacak şekilde agar agar ilave edildi. Glukoz %20’lik stok çözeltiler halinde hazırlandı ve petrilerin hazırlanmasında otoklav aşamasından sonra, sıvı besiyerlerinde ise kullanımdan hemen önce üreme ortamlarındaki son konsantrasyonu %2 (repres koşullar) veya %0.05 (derepres koşullar) olacak şekilde besiyerine ilave edildi.

2: Sentetik tam –urasil Üreme Ortamı (Sc-ura)

Bu üreme ortamı araştırmalarımızda kullanılan *S. cerevisiae* transformantları için seçici besiyer olarak hazırlandı. Sc-Ura besiyerini hazırlamak için 6.7 gram YNB (%0.5 amonyumlu, aminoasitsiz) 1 litre distile suda çözdürüldü. 121°C’de 25 dakika süreli olarak otoklavda steril edildi. Sc-Ura katı besiyerini hazırlarken 20 gram/litre olacak şekilde otoklavdan önce agar agar eklendi. Aminoasit kaynağı olarak urasil içermeyen aminoasit karışımı eklendi. Amino asit karışımı 1.92 gram/litre olacak şekilde kullanımdan hemen önce hazırlandı, filtre sterilizasyon yöntemiyle sterilize edilerek üreme ortamına ilave edildi.

3: Lityum Asetat-TE

Bu karışım *S. cerevisiae* hücrelerinin transformasyonu için kullanıldı. 3.5 ml 250 mM Lityum asetat; 10 mM Tris pH:8.0, 1 mM EDTA pH:8.0 ile çözümlenerek hazırlandı. Karışım 0.45 µm por çaplı membran disk filtre ile steril edildi.

4: %50 Polietilen Gilikol (PEG)

Katı Polietilen Glikol (Ma. 4000) distile suda %50'lik stok çözelti olarak hazırlandı, otoklavda steril edildi.

5: Lizis Tampon Çözeltisi (Breaking Buffer)

Bu tampon çözelti üreme periyotları sonunda *S. cerevisiae* transformantlarını süspanse etmek için kullanıldı. Lizis tampon çözeltisinin bileşimi:

100 mM tris HCl pH:8.0
1 mM DL-Dithiothretiol
%20 (V/V) Gliserol
4 mM Fenil Metil Sülfonil Fulorid.

Lizis tampon çözeltisi steril distile su ile hazırlandı ve sürekli olarak +4 C'de saklandı.

6: Z tampon çözeltisi (Z Buffer)

Bu çözelti *S. cerevisiae* transformantlarının β galaktosidaz aktivitesini belirlemek için kullanıldı. Bu çözeltinin bileşimi:

60 mM Na₂HPO₄.7H₂O
40 ml NaH₂PO₄.H₂O
10 mM KCl
1 mM MgSO₄.7H₂O
50 mM 2-Merkapto Ethanol.

Çözelti steril distile suda hazırlandı ve sürekli olarak + 4 C'de saklandı.

7: Lowry Çözeltisi

Hücre lizatlarındaki protein konsantrasyonunu belirlemek için kullanıldı. Bu çözeltinin bileşimi:

Lowry A: % 2'lik Na₂CO₃ (0.1 N NaOH'da çözdürülmüş)
Lowry B: % 0.5'lik CuSO₄ (% 1'lik NaK-tartarat'ta çözdürülmüş)

8: ONPG (O-Nitrofenil β -D-Galaktopiranozid)

Son konsantrasyonu 4 mg/ml olacak şekilde Z tampon çözeltisinde hazırlandı. Çalışmalar süresince +4 C'de saklandı.

Ek 2: β -gal aktivitesi hesaplanması

Hazırlanan *S. cerevisiae* transformantlarının transkripsiyonları sonucu Lac Z füzyonlarından sentezlenen β -galaktosidaz enzimlerini aktiviteleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

B-gal unitesi:

$[OD_{420} \times 1.7] / [0.0045 \times \text{Protein Konsantrasyonu} \times \text{Reaksiyondaki Lizat Hacmi} \times \text{Zaman}]$

OD₄₂₀: Sarı rengin absorbansı

1.7: Sarı rengin bulunduğu tüpün hacmi(980 μ l Z buffer, 20 μ l lizat, 200 μ l ONPG, 500 μ l NaCO₃)

0.0045: ONPG'nin molar absorpsiyon katsayısı

Protein konsantrasyonu: mg/ml

Lizat hacmi: Değişken (ml)

Zaman: Sarı rengin oluştuğu zaman (dk)

β -galaktosidaz unitesi dakikada hidroliz edilen nmol ONPG/mg toplam protein olarak verilmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Saniye BAHAR
Doğum Yeri ve Tarihi : Bursa, 02. 05. 1985
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
 Lise : Bursa, Nilüfer Milli Piyango Anadolu Lisesi/2003
 Lisans : Uludağ Üniversitesi/2008
 Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi/2011
Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : U.Ü. Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları
 ABD, 2008-2011.
İletişim (e-posta) : baharsaniye@yahoo.com
Yayımları : ---