



**SACCHAROMYCES CEREVISIAE'DA ÇEŞİTLİ METAL
İYONLARININ *HXT2* GENİ TRANSKRİPSİYONUNA VE
ÇOĞALMA ÖZELLİKLERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Sinem ANGIN



T.C
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***SACCHAROMYCES CEREVISIAE*'DA ÇEŞİTLİ METAL İYONLARININ *HXT2*
GENİ TRANSKRİPSİYONUNA VE ÇOĞALMA ÖZELLİKLERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Sinem ANGIN

Prof. Dr. Sezai TÜRKEL
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA-2017
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Sinem Angın tarafından hazırlanan “*Saccharomyces cerevisiae*’da çeşitli metal iyonlarının *HXT2* geni transkripsiyonuna ve çoğalma özelliklerine etkilerinin incelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Sezai Türkel

Başkan: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL
U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza.


Üye: Yrd.Doç.Dr. Figen ERSOY
U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza.


Üye: Yrd.Doç.Dr. Hülya KARACA GENÇER
Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İmza.


Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali BAYRAM
Enstitü Müdürü

09 / 03 / 2017



Bilimsel Etik Bildirim Sayfası

U. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- 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.

09 / 03 / 2017

Sinem ANGIN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SACCHAROMYCES CEREVISIAE'DA ÇEŞİTLİ METAL İYONLARININ *HXT2* GENİ TRANSKRİPSİYONUNA VE ÇOĞALMA ÖZELLİKLERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Sinem ANGIN

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Çeşitli metal iyonları hücrel faaliyetlerin gerçekleştirilebilmesi için gereklidir. Bununla birlikte, metal iyonlarının hücrelere fazla alınması veya toksik metal iyonlarının hücreye taşınması çok çeşitli hücrel faaliyetleri engelleyebilir, sitotoksik ve genotoksik etkiler de gösterebilir. Hücrelere glukoz taşınması glukoz taşıyıcı membran proteinleri ile yapılır. Glukoz transportunun engellenmesi de hücreler için gerekli olan ATP, enerji ve çeşitli metabolitlerin üretimini de azaltmakta veya tamamen engellemektedir. Bu araştırmada bakır, demir, nikel, çinko, magnezyum, lityum ve kadmiyumun *S. cerevisiae* hücrelerinde üreme özelliklerine ve *HXT2* geni transkripsiyonuna etkileri incelendi. Metal iyonları çözünür bileşikler olarak letal seviyenin çok altında olan konsantrasyonlarda, logaritmik aşamadaki maya kültürlerinin üreme ortamına eklendi. Bu araştırmada elde edilen sonuçlar nikel ve lityum iyonlarının *HXT2* geni transkripsiyonunu baskıladığını göstermektedir. Bu metal iyonlarının glukoz repres şartlarda *HXT2* transkripsiyonunda yaklaşık %30 kadar azalmaya neden olduğu tayin edildi. Buna karşın, magnezyum ve demir iyonlarının ise *HXT2* transkripsiyonunu düşük seviyede aktive ettiği belirlendi. *HXT2* geni transkripsiyonunun metal iyonları ile kontrolünde stres ile aktive edilen transkripsiyon faktörleri olan Msn2p ve Yap1p'nin herhangi bir işlevi olmadığı da gösterildi. Msn2p'nin *HXT2* transkripsiyonu için normal şartlarda gerekli olduğu, stres yanıtı için ise gerekli olmadığı tayin edildi. *HXT2*'nin metal stresi ile kontrolü için çok fonksiyonlu ve genel bir protein kinaz olan Snf1p'nin gerekli olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *S. cerevisiae*, Glukoz taşınımı, *HXT* genleri, Metal iyon stresi, Glukoz sinyali.

2017, XII + 35 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF VARIOUS METAL IONS ON THE GROWTH FEATURES AND TRANSCRIPTION OF *HXT2* GENE IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Sinem ANGIN

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

Supervisor: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Metal ions are required for the various cellular and metabolic activities. Nonetheless, over accumulation of metal ions or transport of toxic metal ions to the cell can inhibit numerous cellular functions, and also can have a cytotoxic and genotoxic effects. Transport of glucose to the cell is carried out by glucose transporter proteins, localized within the cell membrane. Inhibition of glucose transport prevents the biosynthesis of ATP and various cellular metabolites required for the cell metabolism. In this study, the effects of copper, iron, nickel, zinc, magnesium, lithium and cadmium on the transcription of *HXT2* gene and on the growth features of *S. cerevisiae* were investigated. Metal ions were added to the growth medium of logarithmically growing yeast cell cultures as soluble compounds at sub-lethal levels. Results of this research indicates that nickel and lithium repress the transcription of *HXT2* gene. These metal ions repressed the transcription of *HXT2* approximately at 30% under glucose repressed growth conditions. On the contrary, magnesium and iron ions activated the transcription of *HXT2* at low levels. Results of this study indicated that stress activated transcription factors Msn2p and Yap1p is not involved in the stress dependent regulation of *HXT2* gene. Nonetheless, it was found that the transcriptional regulator Msn2p is required for the basal level expression of *HXT2* gene. It was clearly shown that multi-functional protein kinase Snf1p is involved in the metal ion stress dependent regulation of *HXT2* gene in *S. cerevisiae*.

Keywords: *S. cerevisiae*, Glucose transport, *HXT* genes, Metal ion stress, Glucose signaling.

2017, XII + 35 pages

TEŐEKKÖR

Uludağ Üniversitesinde bulunduğum süre boyunca akademik anlamda bana her daim destek olan ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Sezai Türkel'e, akademik hayatım boyunca maddi ve manevi olarak desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme, tez deneylerim sırasında bana hep destek olan laboratuvar arkadaşlarım, Aylin Kahraman ve Tuğçe Karaduman'a çok teşekkürler ederim.

Sinem ANGIN
09. 03. 2017



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLERİN DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	2
2.1. Metal Stresinin Moleküler Etkileri.....	2
2.2. Metal Stresinin <i>S. cerevisiae</i> 'da Etkileri.....	3
2.3. <i>S.cerevisiae</i> 'da Glukoz Transportu ve <i>HXT</i> Genleri.....	7
2.4. <i>HXT2</i> Geninin Yapısal Özellikleri.....	8
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	11
3.1. Araştırmada Kullanılan <i>S. cerevisiae</i> Suşları ve Üreme Koşulları.....	11
3.2. <i>HXT2-LacZ</i> Gen Füzyonunun Yapısı ve Transformasyonu.....	12
3.3. Metal İyon Stresinin Uygulanması.....	13
3.4. Beta-Galaktozidaz Aktivitelerinin Tayini.....	13
3.5. <i>S.cerevisiae</i> 'da Metal İyonlarının Üremeye Etkisi.....	14
4. BULGULAR.....	15
4.1. Farklı Metal İyonlarının <i>HXT2</i> Transkripsiyonuna Etkileri.....	15
4.2. Metal İyon Stresinde <i>Msn2p</i> , <i>Yap1p</i> ve <i>Snf1p</i> 'in Etkileri.....	17
4.3. Metal İyonlarının Üremeye Etkisi.....	19
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	22
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	25
EKLER.....	28
Ek 1: Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması.....	28
Ek 2: β - Galaktozidaz aktivitesi hesaplanması.....	31
Ek 3: Araştırmada Kullanılan Metal İyonlarının Hazırlanması.....	32
ÖZGEÇMİŞ.....	36

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µm	: Mikron
g	: Gravity (santrifuj birimi)
α	: Alfa
β	: Beta
Δ	: Delta, delesyon
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre

Kısaltmalar

Açıklama

ATP	: Adenosin tri fosfat
cAMP	: Halkasal Adenosin Mono Fosfat
HXT	: Hexose Transporters
MFS	: Major Facilitator Superfamily
MSN2	: Multicopy suppressor of SNF1 mutation
CTR	: Copper TRansport
MAC	: Metal bağlayıcı aktivatör
CHIP assay	: Immunoprecipitation assay
SOD	: Süperoksit dismutaz
CcO	: Sitokrom c oksidaz
YPK	: Yeast Protein Kinase
ROS	: Reactive oxygen species
RGT	: Restores Glucose Transport
GPR	: G-Protein coupled Receptor
YEp	: Yeast Epizomal plazmit
Kbp	: Kilo base pair
Dk	: Dakika
Sn	: Saniye
RPM	: Rotation per minute
ONPG	: Ortho Nitro Phenyl Galactoside
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DR	: Glukoz baskısı altında olmayan, (Derepressed)
GAL	: Galactose metabolism
HXK	: Hekzokinaz

LacZ	: β –Galaktozidaz geni
Leu	: Lösin
M	: Molar
MAT	: Mating type, <i>S. cerevisiae</i> 'da eşleşme tipi
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
OD	: Optical Density
PEG	: Polyetilen glikol
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PKA	: Protein Kinaz A
R	: Glukoz baskılaması (Repressed)
<i>S. cerevisiae</i>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC- Ura	: Urasil içermeyen sentetik tam üreme ortamı
SGD	: Saccharomyces Genome Database
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SNF	: Sucrose non-fermenting
YAP	: Yeast Aktivatör Protein
URA	: Uracil
YNB	: Yeast Nitrogen Base
YPD	: Yeast extract Pepton Dextrose

ŞEKİLLERİN DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Farklı metal iyonlarının <i>S. cerevisiae</i> hücrelerine transportu	4
Şekil 4.1. Araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşlarının normal ortamda üreme durumları	20
Şekil 4.2. Araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşlarının nikel iyonları içeren ortamda üreme durumları	20
Şekil 4.3. Araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşlarının lityum iyonları içeren ortamda üreme durumları	21



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Farklı metal iyonlarının <i>S. cerevisiae</i> 'da transkripsiyonel etkisi.....	5
Çizelge 2.2. <i>HXT2</i> geni transkripsiyonunu stres şartlarında kontrol ettiği rapor edilen transkripsiyon faktörleri.....	10
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşları ve özellikleri.....	11
Çizelge 4.1. Repres şartlarda <i>HXT2</i> geni transkripsiyonuna çeşitli metal iyonlarının etkisi	15
Çizelge 4.2. Derepres şartlarda <i>HXT2</i> geni transkripsiyonuna nikel ve lityum iyonlarının etkisi.....	16
Çizelge 4.3. Repres şartlarda Msn2p, Yap1p, ve Snf1p'nin <i>HXT2</i> geni transkripsiyonuna etkileri.....	17

1. GİRİŞ

Bazı metal iyonları bütün organizmaların metabolizmaları için gereklidir. Canlılarda metal iyonları elektron taşınımı, ko faktör, veya yapısal bileşen olarak kullanılmaktadır. Metal iyonlarının belirli dozlardan fazlası hücreler için toksiktir. Normal seviyeden az alınmaları da hücrede ve organizmalarda önemli hasarlara neden olmaktadır. Demir, kalsiyum ve magnezyum gibi metal iyonlarının eksikliklerinin insan üzerine etkileri oldukça iyi bilinmektedir. Bu nedenle metal iyonlarının hücre içine taşınımı da oldukça kontrollü olarak yapılmaktadır. Canlılar metal iyonlarının toksik dozlarına direnç için farklı mekanizmalar geliştirmiştir. Bu mekanizmalardan bazıları; metal iyonlarının transportunu kısıtlamak ve metal iyonlarını kimyasal olarak inaktif şekilde depolamaktır.

Çeşitli metal iyonlarının sub-letal seviyede olduklarında *S. cerevisiae*'da üreme hızına önemli ölçüde etki ettikleri bilinmektedir. Farklı metal iyonlarının *S. cerevisiae*'da gen anlatımına etkileri oldukça kapsamlı olarak incelenmiştir. Metal iyonlarına karşı *S. cerevisiae*'da enzimatik ve genetik düzeyde yanıt olduğu gösterilmiştir. Metal iyonlarının belirli dozlarında uygulanması ile *S. cerevisiae*'da enzimatik yanıt olarak süper oksit dismutaz, katalaz, glutation sentaz gibi enzimlerin aktive edildiği bilinmektedir. Metal iyonlarına yanıt olarak genel stres yanıt faktörü olarak da transkripsiyon faktörleri Msn2/4p ve Yap faktörleri ve bunlara bağlı olarak da çeşitli genlerin transkripsiyon seviyelerinde önemli değişiklikler olduğu gösterilmiştir. *S. cerevisiae*'da üreme hızını kontrol eden önemli faktörlerden birisi de glukoz transportu ve metabolizmasıdır. Bazı iyonların, örneğin kalsiyumun, glukoz transportunu ve üreme hızını aktive ettiği şeklinde araştırma sonuçları bulunmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada bazı metal iyonlarının glukoz transporter genlerinden *HXT2*'nin transkripsiyonuna ve *S. cerevisiae* hücrelerinin üreme özelliklerine etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar nikel ve lityum iyonlarının *HXT2* transkripsiyonunu baskıladığını magnezyum ve demir iyonlarının ise düşük miktarda olmakla birlikte *HXT2* transkripsiyonunu aktive ettiğini göstermektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Metal Stresinin Moleküler Etkileri

Toksik metaller ekosisteme farklı kaynaklardan sürekli olarak salınmaktadır. Endüstriyel atıklar, çevresel kirleticiler, tarımsal faaliyetler sonucu farklı metal iyonları ekosistemde kontrolsüz olarak birikmektedir ve bu metaller bir süre sonra da besin zinciri aracılığı ile çeşitli canlılara ve insana da taşınmaktadır. Bazı metal iyonları, örneğin demir, çinko ve magnezyum biyolojik sistemlerde metabolik regülasyon ve canlılık faaliyetlerinin devamı için gereklidir. Bazı metal iyonları ise hücre faaliyetleri için inhibe edici özellikleri dolayısıyla oldukça toksiktir. Bazı durumlarda ise biyolojik sistemler için gerekli olan metal iyonlarının ortamda ve hücrede fazla bulunması toksik etki meydana getirebilir (Eide 2001). Metal iyonlarına karşı hücrede moleküler seviyede farklı yanıtlar meydana gelmektedir.

Toksik metal iyonlarının detoksifye edilmesi için farklı mikroorganizmalarda farklı mekanizmalar gelişmiştir. Hücreler metal toksisitesini durdurmak ve yaşamsal faaliyetlerine devam edebilmek için önce metallerin hücreye girişini engellemeye yönelik mekanizmalar kullanır. Bu mekanizmanın yeterli olmaması durumunda ise hücre zarından başlayıp genetik yanıt kadar ulaşabilen tepki mekanizmaları geliştirmişlerdir. Metal stresine yanıt mekanizmaları hücrelerde meydana geliş sırasına göre aşağıda özetlendiği şekildedir (Pocsi 2011).

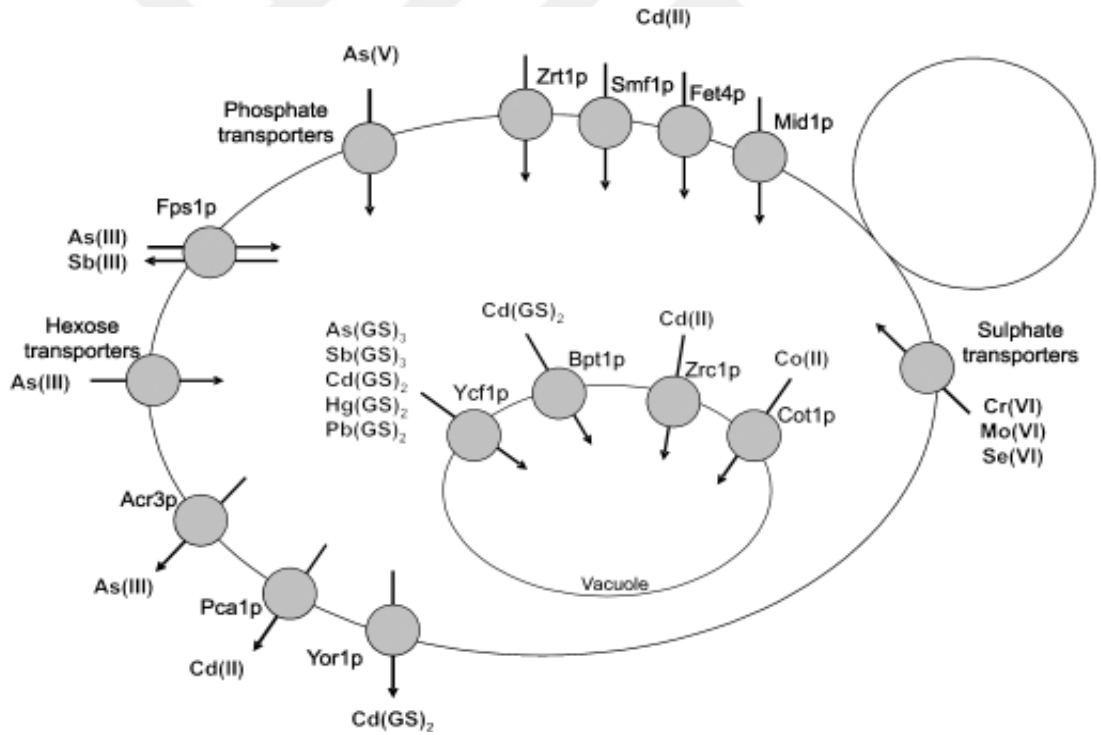
- 1- Metal şelatlayıcı bileşenlerin biyosentezi ve hücre dışına salgılanması
- 2- Hücre zarındaki metal transporterlarının inaktive edilmesi
- 3- Metalleri hücre dışına ve vakuol dışına taşıyan iyon/metal taşıyıcılarının fazla sentezi
- 4- Hücre içi metal şelatlayıcı bileşiklerin fazla sentezi
- 5- Hücre içi antioksidan savunma sisteminin aktivasyonu ve anti-oksidatif enzim sisteminin çalışması
- 6- Stres yanıt transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ve metal stresine genetik yanıt olarak belirli genlerin aktive edilmesi ve belirli genlerde transkripsiyonun baskılanması
- 7- Metal stresine bağlı olarak oluşacak apoptozun ve apoptoz sinyalinin engellenmesi olarak sıralanabilir.

Metal şelatlayıcı bileşikler olarak mikroorganizmalar tarafından ortama salgılanan maddeler oksalat ve glutasyon içeren bileşiklerdir (Wysocki ve Tamas 2010). Ayrıca biyofilm oluşumunda da kullanılan ve kompleks yapılı EPS (Extracellular Polimorphic Substances) benzeri polimorfik maddeler veya musilaj denilen kompleks bileşikler de toksik metal iyonlarının hücre dışında tutulmasını sağlar (Paraszkiewicz ve Dlugonski 2009). Metal stresinden korunma için ikinci savunma mekanizması da *S. cerevisiae*'da iyi şekilde tanımlanmış olan metal transporterları biyosentezinin durdurulmasıdır (Wysocki ve Tamas 2010). Hücre içine alınan veya geçen metal iyonları ise detoksifikasyon veya vakuolde depolama şeklinde inaktive edilebilirler. Detoksifikasyon sistemi antioksidan savunma sistemi olarak da adlandırılır. Metal iyonlarının meydana getirdiği reaktif oksijen türleri glutasyon bağımlı ve glutasyon bağımsız antioksidan savunma sistemleri ile nötralize edilebilir. Metal iyon stresine genetik yanıt olarak da stres yanıt transkripsiyon faktörleri olan Msn2/4 ve Yap grubu transkripsiyon faktörleri aktive edilir.

Metal iyonlarına ne tür hücrel yanıt oluşacağı mikroorganizmanın türüne, metal iyonunun çeşidine ve konsantrasyonuna bağlıdır (Wysocki ve Tamas 2010). Metal iyonlarının hücre içine taşınımı da hücre zarında bulunan farklı membran transporterları ile yapılmaktadır (Şekil 2.1) (Wysocki ve Tamas 2010). Bazı metal ve metalloid iyonlarının hücre içine taşınımında normal işlevleri glukoz transportu olan heksos transpoter proteinlerinin (Hxtp) yer aldığı çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir. *HXT9* ve *HXT11*'in ilaç dirençliliğinde yer aldığı, bu genlerin transkripsiyonlarının Pdr (Pleotropik Drug Resistance) grubu transkripsiyon faktörlerince kontrol edildiği tayin edilmiştir. *HXT9* ve *HXT11* genlerinin delesyonu ile *S. cerevisiae* hücrelerinin belirli ilaçlara karşı daha dirençli olduğu tayin edilmiştir (Nourani ve ark. 1997). Oldukça toksik ve insan için aynı zamanda önemli bir kanserojen metalloid olan arsenik'in de arsenik trioksit [$As(OH)_3$] olarak *S. cerevisiae* hücrelerine Hxt1p, Hxt3p, Hxt4p, Hxt5p, Hxt7p ve Hxt9p tarafından taşındığı bulunmuştur (Liu ve ark. 2004). Bazı metal iyonları ise *S. cerevisiae* vakuolünde depolandığından farklı vakuol membranında bulunan farklı metal taşıyıcıları ile sitozolden vakuole taşınmaktadırlar (Şekil 2.1).

2.2. Metal Stresinin *S. cerevisiae*'da Etkileri

S. cerevisiae moleküler araştırmalar için üstün bir ökaryotik model organizmadır. Sağladığı genetik ve biyokimyasal avantajlar dolayısıyla metal stresine ökaryotlarda oluşan biyokimyasal ve genetik yanıtın incelenmesinde de çok yaygın olarak kullanılmıştır. Metal stresine yanıt olarak *S. cerevisiae*'da genom düzeyinde yapılan çalışmada farklı metal iyonlarına karşı genomdaki genlerin % 22'sinin en az bir metal iyonuna karşı transkripsiyon seviyesinde artış veya azalma olduğu yapılan çalışmada ortaya konulmuştur. Metal stresine yanıtın metal türüne ve metal konsantrasyonuna göre de farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Jin ve ark. 2008). Bu çalışmadan elde edilen sonuç Çizelge 2.1'de özet olarak verilmiştir.



Şekil 2.1. Farklı metal iyonlarının *S. cerevisiae* hücrelerine transportu (Wysocki ve Tamas 2010).

Çizelge 2.1. Farklı metal iyonlarının *S. cerevisiae*'da transkripsiyonel etkisi.¹

Metal İyonu	Metal Konsantrasyonu (µM)	Transkript seviyesi değişen genlerin sayısı
Ag	10	232
	20	319
Cu	5 000	247
	7 000	
	9 000	469
Cd	5	180
	25	174
Hg	19	302
	47	233
Zn	1 000	329
	2 000	404
Cr	400	279
	900	
	17 000	227
As	400	381
	1 250	762

¹ Metal iyon konsantrasyonları %50 üreme inhibe edici konsantrasyonlar olarak uygulanmıştır (Jin ve ark. 2008). Sayılar ilgili metal iyonu konsantrasyonunda transkripsiyonu değişen gen sayılarıdır.

S. cerevisiae'da toksik metal iyonlarına karşı iki önemli yanıt meydana gelmektedir. Bunlar toksik metallerin hücreye girişinin engellenmesi ve hücre içine alınan toksik metallerin hücrede belirli kompartmanlarda veya sitoplazmada inaktif metal şelatları olarak biriktirilmesidir (Wysocki ve Tamas 2010).

Demir iyonları belirli dozda bütün organizmalarda metabolizma için gerekli olmakla birlikte hücre içine fazla alındığında toksik özellik göstermektedir (Wysocki ve Tamas 2010, Lin ve ark. 2011). Demir iyonlarının belirli konsantrasyonlarda uygulandığında *S. cerevisiae*'da üreme hızını arttırdığı da rapor edilmiştir (Du ve ark. 2012). Demir iyonları farklı hücrelerde heme proteinlerinin yapısında, sitokromlarda ve metallo enzimlerde yapısal bileşen ve elektron alıcı/verici metal iyonu olarak yer alır (Du ve ark. 2012). Demir ve bakır iyonlarının toksik düzeyde bulunması insanda nörodejeneratif hastalıklara yol açtığı da bilinmektedir (Rivera-Mancini ve ark. 2010). Redoks aktif metal iyonları olarak bilinen demir, bakır, krom ve kobalt gibi metal iyonlarının oksidatif etkisi dolayısıyla membran lipidlerinde peroksidasyon ile bozulmaya yol açıp hücrede sinyal iletim yollarında bozulmaya ve insanda da bundan dolayı çeşitli hastalıklara yol açtığı da bilinmektedir (Jomova ve Valko 2011).

Çinko'nun canlılarda yaklaşık 300 farklı proteinde yapısal bileşen olarak yer aldığı, özellikle transkripsiyon faktörlerinde çinko parmak (Zinc Finger) yapısı olarak bilinen protein katlanmasını sağladığı uzun süredir bilinmektedir. Diğer taraftan, kadmiyum, civa ve kurşun gibi metallerin ise canlılar için oldukça toksik olduğu ve hücre içinde bulunmamaları gerektiği de bilinmemktedir. Bu nedenle canlılarda metal iyon dengesinin çok iyi oluşturulması, gerekli metal iyonlarından hücresel faaliyetleri için yeterince alınması toksik metal iyonlarının ise detoksifiye edici hücresel mekanizmalar ile hücresel işlevlerden uzak tutulması gereklidir.

Bazı metal iyonlarının *S. cerevisiae*'da glukoz metabolizmasına etkileri daha önce yapılan bazı araştırmalar ile ortaya konulmuştur. Kalsiyum iyonlarının ortamı alkali yaparak Calcineurin tarafından aktive edilen transkripsiyon faktörü olan Crz1 (Calcineurin-Responsive Zinc finger) Calcineurin dependent response element olarak

adlandırılan 5'-GGGGCTG-3' dizisine spesifik olarak bağlanıp *HXT2* transkripsiyonunu aktive ettiği belirlenmiştir (Ruiz ve ark. 2008). *HXT2* geni transkripsiyonuna ek olarak *HXT7*'nin transkripsiyonunun da Crz1p'ye bağlı olarak kalsiyum tarafından aktive edildiği rapor edilmiştir. Bu aktivasyon ortam pH'sının metal iyonları ile artırılması sonucu protein kinaz Snf1 aracılığı ile gerçekleştiği de bulunmuştur (Hong ve Carlson 2007, Ruiz ve ark. 2008).

2.3. *S.cerevisiae*'da Glukoz Transportu ve *HXT* Genleri

S. cerevisiae'da glukoz kullanımı ve transportunun biyokimyasal özellikleri glukozun metabolik etkileri oldukça kapsamlı olarak incelenmiştir (Broach 2012). Glukoz glikolitik yolda metabolize edilen bir monosakkarit olmasına ek olarak hormon molekülü gibi de davranarak *S. cerevisiae*'da glukoz sinyal iletim yollarını aktive eder (Broach 2012). Mikro-dizin analizleri ile yapılan çalışmada *S. cerevisiae*'da genlerin yaklaşık %30'nun glukoz sinyali ile kontrol edildiği bulunmuştur (De Risi ve ark. 1997, Wang ve ark. 2004). Glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak *S. cerevisiae* genlerinin %30'unun (yaklaşık 1 800 gen) transkripsiyonunda en az iki kat kadar azalma veya artış görülür.

S. cerevisiae'da glukoz kolaylaştırılmış difüzyon mekanizmasıyla hücre içine alınmaktadır (Reifenberger ve ark. 1997). Glukoz transportu için ATP kullanılmaz. Glukoz transportu Hexose Transporter (*HXT*) genleri olarak adlandırılan genlerden kodlanan membran proteinleri tarafından yapılmaktadır. Glukoz transportunun hücre döngüsü aşamalarına, glikolitik yolağın işleyişine ve üreme aşamalarına göre de kontrol edildiği rapor edilmiştir (Türkel ve Bisson 1999, Santangelo 2006).

HXT genleri hem *S. cerevisiae*'da ve hem de diğer maya türlerinde çeşitlilik gösterir. Gen duplikasyonları ile çoğalmıştır. *S. cerevisiae*'da Heksoz Taşıyıcı Gen ailesi (Hexose Transporter Gene Family) olarak adlandırılan ve aralarında yüksek homoloji olduğu belirlenen 20 gen belirlenmiştir (Boles ve Hollenberg 1997). Bu genler *HXT1*-*HXT17*, *GAL2*, *SNF3* ve *RGT2* genleridir (Kruckeberg 1996, Reifenberger ve ark. 1995, 1997). *HXT* genleri glukoz, fruktoz ve mannoz transportunda işlevi olan transport proteinlerini kodlar. *GAL2* galaktoz transport için gerekli membran proteinini kodlar.

SNF3 ve *RGT2* ise ise *HXT* genlerine yüksek homoloji göstermekle birlikte *S. cerevisiae* hücre membranında bulunan glukoz sensörleridir (Boles ve Hollenberg 1997). *HXT* genleri arasında çok yüksek homoloji olduğu da belirlenmiştir. *HXT2* ve *HXT10* arasında DNA sekansı olarak karşılaştırıldığında homoloji %72, *HXT1* ve *HXT4* arasında homoloji %84'dür. *HXT6* ve *HXT7* arasındaki homoloji ise %99'dan daha yüksektir. *HXT6* ve *HXT7* amino asit sekansı karşılaştırıldığında sadece 2 amino asit'in farklı olduğu görülmektedir (Reifenberger ve ark. 1995).

HXT genleri arasında DNA seviyesinde bu kadar yüksek homoloji olmasına rağmen transkripsiyonel kontrol mekanizmaları oldukça farklıdır (Özcan ve Johnston 1999). *HXT* genlerinin transkripsiyonunu kontrol eden en önemli faktör glukoz konsantrasyonu ve buna bağlı olarak işleyen glukoz sinyal iletim mekanizmasıdır (Özcan ve Johnston 1999). Ortamdaki glukoz konsantrasyonuna göre *HXT* genleri high affinity ve low affinity transporterlar olarak sınıflandırılmaktadır. *HXT1* ve *HXT3* düşük afiniteli glukoz transporterlarını kodlamaktadır. Bu transporterların Km değeri 100mM'dır. Yüksek afiniteli glukoz transporterları ise Km değerleri 1-1.5 olan *HXT6*, *HXT7*'dir. *HXT2* ve *HXT4* ise glukoz için Km değeri 10 mM olarak belirlendiğinden orta afiniteli transporterlar olarak adlandırılır (Boles ve Hollenberg 1997). Bazı kaynaklarda *HXT2* ve *HXT4* yüksek afiniteli glukoz transporterları olarak da verilmektedir (Reifenberger ve ark. 1997, Özcan ve Johnston 1999).

2.4. *HXT2* Geninin Yapısal Özellikleri

HXT2 geni tek kopya gen olarak *S. cerevisiae* genomunda 13. Kromozom üzerinde bulunur. Sistematik gen adı YMR011w olup gen kodu S000004613'dür. Kodlama bölgesi bu kromozomda 288 079 bp'den 289 704 bp'ne kadar olan bölgede yer alır. Kodlama bölgesi 1 626 bp'dir. *HXT2* geni 541 amino asit uzunluğunda bir membran proteini kodlar. Hxt2 proteinin (Hxt2p) molekül ağırlığı (Da): 59847,2 ve isoelektrik noktası: 8,42'dir. Hxt2p'nin biyolojik işlevi glukoz taşınmasıdır. Glukoz transporter proteini olarak Hxt2p, ökaryotlardaki transport proteinlerinden Major Facilitator Superfamily (MFS) grubunda bulunan transporter proteinlerine benzerlik gösteren yüksek veya orta afiniteli bir transporterdir (Kruckeberg ve Bisson 1990).

HXT2 geni transkripsiyonu glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak kontrol edilir. Üreme ortamında yüksek miktarda glukoz bulunduğunda (%1 veya daha fazla) *HXT2* transkripsiyonu baskılanmaktadır. Bu baskılamada *S. cerevisiae*'da glukoz baskılamasında yer alan Mig1p'nin yer aldığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ortamda glukoz konsantrasyonu düşük olduğunda (%0,1 veya daha az) ise transkripsiyonu Rgt1p ile aktive edilir (Özcan ve Johnston 1999, Özcan ve Johnston 1995). Rgt1'in çok fonksiyonlu bir transkripsiyon faktörü olduğu, *HXT2*'nin aktivasyonu için de gerekli olduğu rapor edilmiştir (Özcan ve Johnston 1995). Rgt1p'ye ek olarak *HXT2* geni transkripsiyonunun glikolitik genlerin transkripsiyonunu aktive eden Glycolysis Regulator-1 (*GCR1*) transkripsiyon faktörü tarafından da aktive edildiği gösterilmiştir (Türkel ve Bisson 1999). Gcr1p'nin kontrol ettiği genlerin promotor bölgelerinde 5'-CTTCC-3' nükleotid dizisine spesifik olarak bağlandığı bilinmektedir (Baker 1991). *HXT2* geni promotor ile yapılan çalışmalarda da Gcr1p'nin *HXT2* promotorunda bulunan 5'-CTTCC-3' dizisine bağlandığı jel mobility shift tekniği ile gösterilmiştir (Türkel ve Bisson 1999). Bu şekilde glukoz transportu ve glikolitik yolun işleyişi arasında transkripsiyon seviyesinde bir koordinasyon olduğu bulunmuştur (Türkel ve Bisson 1999).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda *HXT2* transkripsiyonunun çok sayıda transkripsiyon faktörü tarafından farklı fizyolojik sinyallere göre kontrol edildiği SGD ve YEASTRACT veri tabanlarında kayıtlıdır (URL1, URL2). YEASTRACT kayıtlarında listelenen ve *HXT2* geninin çevresel stres şartlarında transkripsiyonel kontrolünde yer alan transkripsiyon faktörleri izelge 2.1'de listelenmiştir. *HXT2* geni delesyonunun *S. cerevisiae*'da herhangi bir metabolik etkisi yoktur, esansiyel gen değildir. Bunun nedeni de *S. cerevisiae*'da bulunan çok sayıda *HXT* geni metabolizma için gerekli glukoz transportunu yapabilmektedir.

Çizelge 2.2. *HXT2* geni transkripsiyonunu stres şartlarında kontrol ettiği rapor edilen transkripsiyon faktörleri.²

Mig1p	Mig2p	Yap1p	Arr1p
Rap1p	Aft1p	Pdr1p	Pdr3p
Sko1p	Gts1p	Msn2p	Msn4p
Cin5p	Yap6p	Zap1p	Crz1

Stres şartlarında *HXT2* transkripsiyonunu kontrol eden (aktive eden veya baskılayan) transkripsiyon faktörleri YEASTRACT veri tabanından elde edilerek Çizelge 2.2’de verilmiştir (URL2). Bu transkripsiyon faktörlerinin işlevleri de kısaca SGD’den derlenerek özet olarak verilmiştir (URL1). Stres şartlarında *HXT2* geni transkripsiyonunu kontrol eden faktörlerden Mig proteinleri genel represör olarak promotorlara bağlanır ve Ssn6-Tup1 ile etkileşerek transkripsiyonu baskılar. Rap1p *S. cerevisiae*’da bol bulunan çok fonksiyonlu bir transkripsiyon faktörüdür, promotor yapısına göre aktivatör veya represör olarak etki eder. Sko1p ise ozmotik ve oksidatif stres şartlarında represör olarak hedef promotorları baskılar. Cin5p ve Yap1p aynı grupta yer alan transkripsiyon faktörleri olup özellikle oksidatif stres şartlarında aktif olarak represör işlevi görür. Aft1p demir iyonları ile aktive edilen transkripsiyonel aktivatördür. Gts1p’in ısı stresi ve sporulasyonla ilgili transkripsiyon faktörü olduğu bilinmektedir. Pdr grubu transkripsiyon faktörleri (Pleotropic Drug Resistance) ise çoklu ilaç dirençliliği ile ilgili genlerin aktivasyonu ve kontrolü ile ilgili faktördür. Arr1p, arsenik dirençliliği ile ilgili yanıt için gerekli genlerin aktivasyonunu sağlar. Zap1p çinko iyonlarına yanıt olarak transkripsiyonel kontrolde yer alan transkripsiyon faktörüdür. Msn2p ve Msn4p ise genel stres yanıt transkripsiyon faktörleridir, çeşitli streslere karşı bir çok genin transkripsiyonunu kontrol ederler. Msn2 ve Msn4p heterodimer olarak aktiftir.

² Kaynak: URL2

3. MATERYAL VE YÖNTEM

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

Bu tez araştırmasında kullanılan *S. cerevisiae* suşları EUROSCARF koleksiyonundan sağlandı. Bu *S. cerevisiae* suşlarının genotipleri ve stok merkezi kodları Çizelge 3.1’de verildi. Bu *S. cerevisiae* suşlarının genomları tamamen sekanslanmıştır ve Çizelge 3.1’de verilenlerin dışında mutasyon içermedikleri bilinmektedir (Brachmann ve ark. 1998). YPD tüplerinde stok merkezinden sağlanan *S. cerevisiae* suşları önce taze YPD petrilere çizgi ekimi yapılarak 30 °C’de tekrar üretildi. Bu petrilere 1,5 ml’lik mikrofij tüplerine steril %20’lik gliserol tüplerine örnek alınarak uzun süreli depolamak için -80 °C derin dondurucuda saklandı. Rutin kullanımlar için *S. cerevisiae* stok petrilere +4 °C’de buzdolabında saklandı.

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

Euroscarf Kodu	ST Lab Kodu	Genotipi ve ilgili mutasyonlar
Y00000	YST124	MAT a, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0. (Haploid, Yaban tip)
Y14311	YST159	MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YDR477w::kanMX4 (Δsnf1 mutanı)
Y00569	YST242	MAT a, ura3 Δ 0; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; YML07w::kanMX4 (Δyap1 mutanı)
Y007117	YST299	MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YMR037c::kanMX4 (Δmsn2 mutanı)

S. cerevisiae suşlarının üretilmesi için kullanılan besiyerlerinin içerikleri ve hazırlanması EK.1’de verildi. *S. cerevisiae* suşları rutin üreme için zengin besiyeri olan YPD (Yeast Extract, Peptone, Dextrose) besiyerinde üretildi. Transformantlar ise seçici besiyeri olarak kullanılan urasil içermeyen minimal tam besiyerinde (Sc-Ura+%2 glukoz) üretildi (Rose ve ark. 1990). Sıvı besiyerlerinde üreme için standart üreme şartları olan 30 °C’de çalkalamalı inkübatörde 140 dönüş/dakika hızda istenilen hücre

yoğunluğuna (logaritmik faz veya durağan faz) kadar üretildi. Petrilerde üretim ise 30 °C inkübatörde yapıldı.

3.2. *HXT2-LacZ* Gen Füzyonunun Yapısı ve Transformasyonu

HXT2-lacZ gen füzyonu daha önceki araştırmalarda hazırlanmıştır. Bu ekspresyon vektörünün klonlanması ve genetik yapısı da daha önce yayımlanmıştır (Kruckeberg ve Bisson 1990, Türkel ve Bisson 1999). Bu ekspresyon vektörü 2µM-URA3 temelli çok kopyalı maya plazmiti olup, *HXT2* geni promotor bölgesinin 1. ATG kodonundan başlanarak 900 bç uzunluğundaki promotor kısmı *lacZ* genine eklenmiş olarak bulunur. *HXT2* promotorunun bu bölümü bu genin transkripsiyonel kontrolü için gerekli olan bölgeleri bulundurmaktadır (Kruckeberg ve Bisson 1990, Türkel ve Bisson 1999).

HXT2-lacZ gen füzyonunu içeren plazmit araştırmada kullanılan maya suşlarına lityum asetat-polietilen glikol yöntemi ile daha önce açıklandığı şekilde transformasyon ile aktarıldı. Transformasyon için önce maya suşları 5 ml YPD ortamında 1 gece standart şartlarda üretilerek ön kültürler elde edildi. Bu ön kültürlerden 0,5 ml alınıp taze 20 ml YPD besiyerine ekim yapılarak maya hücrelerinin standart şartlarda çalkalamalı inkübatörede logaritmik aşamaya kadar üremeleri sağlandı. Logaritmik aşama kültürleri santrifüjde çöktürülerek maya pelletleri elde edildi. Maya hücreleri 20 ml steril saf su ile yıkandı ve tekrar çöktürüldü. Çöktürülen maya hücreleri 0,1 M lityum asetat ile süspanse edilerek transformasyonda kullanılacak stok mayalar elde edildi. Bu stoklardan 50 µl alınarak daha önce açıklandığı şekilde 1-3 µg plazmit DNA'sı, Herring sperm DNA'sı, lityum asetat ve polietilen glikol kullanılarak transformasyon işlemi gerçekteştirildi (Rose ve ark. 1990). Transformantlar Sc-Ura+%2 glukoz petrilerinde 30 °C'de üç gün üretildi. Transformant kolonilerden 3-4 koloni seçilerek taze Sc-Ura +%2 glukoz petrilerine pasaj yapılarak sıvı kültürlerde kullanılacak transformantlar elde edildi. Maya transformantlarını içeren petriler deneyler süresince +4 °C'de saklandı.

3.3. Metal İyon Stresinin Uygulanması

HXT2-lacZ gen füzyonu transformantları ikiyeşerli olarak 5 ml Sc-Ura+%2 glukoz besiyerinde standart şartlarda bir gece üretilerek (yaklaşık 18 saat) ön kültürler elde edildi. Bu ön kültürler kullanılarak 5 ml'lik taze Sc-Ura+%2 glukoz besiyerine başlangıç OD₆₀₀ değerleri 0,1 olacak şekilde ekim yapıldı ve standart şartlarda çalkalamalı inkübatörde orta-logaritmik aşamaya (OD₆₀₀: 0,8-1) kadar üretildi. Bu aşamada üreme ortamına Ek.3'de verilen konsantrasyonlarda metal iyonları eklenerek (Cu²⁺, Fe³⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Li²⁺, Co²⁺) maya kültürlerini 4 saat daha üremeleri beklendi. Üreme süreleri sonunda maya kültürleri masa üstü santrifüjde 1 600 rpm'de 4 dk çöktürüldü. Maya peletleri 1 ml'lik steril saf suda süspansedilerek mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve bu kez 12 500 rpm'de 1 dk çöktürüldü. Çöken maya peletleri 200 µl lizis tampon çözeltisinde süspansedilerek maya hücreleri β-galaktozidaz aktiviteleri tayin edilinceye kadar -80 °C'de depo edildi.

3.4. Beta-Galaktozidaz Aktivitelerinin Tayini

Hem normal üreme ortamında hem de farklı metal iyonlarına maruz bırakılarak üretilip çöktürülen ve 200 µl lizis tampon çözeltisinde süspansedilen maya transformantlarına permeabilizasyon için stok çözeltilerden 20 µl saf kloroform ve %0,1'lik 20 µl SDS ilave edilip 30 sn kadar süre ile en üst hızda vorteks ile karıştırıldı ve hücre lizatları elde edildi. Hücre lizatlarındaki β-galaktozidaz aktivitesini tayin etmek için deney tüplerine 980 µl Z-buffer ve 20 µl hücre lizatı ilave edildi. Karışımı içeren deney tüpleri 2 dk ön inkübasyon için 30 °C'de su banyosuna bırakıldı. Daha sonra tüplere 200 µl ONPG ilave edilip başlangıç zamanı kronometrede kayıt edildi. Reaksiyon sarı renk meydana gelinceye kadar beklendi. Açık sarı renk görüldüğünde reaksiyon 500 µl 1 M sodyum karbonat ilave edilerek durduruldu ve geçen zaman kayıt edildi. Reaksiyon çözeltileri 2 mL'lik spektrofotometre küvetlerine aktarılıp absorbanları 420 nm dalga boyunda ölçülerek kayıt edildi. (Rose ve ark. 1990).

Maya transformantlarındaki β-galaktozidaz aktivitelerin lizatlardaki toplam çözünür protein miktarına göre normalize edildi. Transformantların hücre lizatlarının toplam protein konsantrasyonları da Lowry metodu ile daha önce açıklandığı şekilde belirlendi

(Lowry ve ark. 1951). β -galaktozidaz ve Lowry deneyleri için kullanılan çözeltilerin hazırlanması da Ek.1'de verildi. β -galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg çözümlü protein başına hidroliz edilen nmol ONPG olarak verildi (nmol ONPG/dakika/mg protein). β -galaktozidaz deneyleri üç tekrarlı olarak yapıldı. Maya transformantları da iki tekrarlı olarak üretildi. Bu nedenle sonuçlar bölümünde verilen aktivite değerleri en az altı bağımsız deneyin ortalamasıdır. Aktivite hesapları Ek.2'de verilen formüle göre Excell tabloları hazırlanarak yapıldı.

3.5. *S.cerevisiae*'da Metal İyonlarının Üremeye Etkisi

Araştırmada kullanılan metal iyonlarından lityum ve nikel iyonlarının *HXT2* geni transkripsiyonuna negatif etkileri belirlendiğinden bu metal iyonlarının ayrıca maya suşlarında üremeye etkileri kalitatif olarak petri testleri ile tayin edildi. Bunun için Ni^{2+} , ve Li^{2+} metal iyonlarını verilen konsantrasyonlarda içeren YPD petrileri hazırlandı. Bu metal iyon petrilerine logaritmik aşamada olan maya kültürlerinden 1 ml'lik steril saf su içeren mikrofuj tüplerine 10 kat seyreltme (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} seyreltme) ile seri dilüsyon tüpleri hazırlandı. Bu seyreltme serilerinden normal ve metal iyonu içeren YPD petrilerine sırasıyla 4 μl damlatma ekimi yapıldı. Petri yüzeylerinin kuruması beklendi ve maya petrileri 30°C 'de inkübatörede 24-48 saat üremeye bırakıldı. Bekleme süresi sonunda maya petrileri fotoğraflandı, sonuçlar bulgular bölümünde verildi.

4- BULGULAR

4.1. Farklı Metal İyonlarının *HXT2* Transkripsiyonuna Etkileri

HXT2 geni hücreye glukoz taşınmasında önemli işlevi olan Hxt2p glukoz taşıyıcısı proteini kodlamaktadır. *HXT2* 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 araştırmada bu genin transkripsiyonu hem repres ve hem de derepress koşullarda incelendi. Bu aşamada logaritmik aşamadaki *S. cerevisiae* transformantlarına Ni⁺², Cu⁺², Zn⁺², Fe⁺³, Co⁺², Mg⁺² ve Li⁺² iyonları Çizelgede verilen konsantrasyonlarda eklendi ve 4 saat inkübe edilerek bu koşulların *HXT2*-LacZ transkripsiyonuna etkileri belirlendi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Repres şartlarda *HXT2* geni transkripsiyonuna çeşitli metal iyonlarının etkisi

Metal İyonları ve uygulanan konsantrasyonları	Ekspresyon Seviyeleri*± SD
<i>Normal ortam</i>	<u>1 752 ± 86</u>
100 µM Cu ⁺²	1 789 ± 4
0,5 mM Fe ⁺³	<u>1 943 ± 49</u>
2,5 mM Ni ⁺²	1 239 ± 3
4,4 mM Zn ⁺²	1 840 ± 79
150 mM Mg ⁺²	<u>1 956 ± 6</u>
40 mM Li ⁺²	<u>1 152 ± 12</u>
1,2 mM Co ⁺²	1 722 ± 169

*Ekspresyon seviyesi yaban tip maya suşunda (Y00000) nmol ONPG/dakika/mg protein olarak verilmiştir. ± SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir.

Normal, metal iyonu içermeyen ve %2 glukoz içeren üreme ortamında (repress şartlar) standart üreme şartlarında *HXT2* gen ekspresyonunun 1 752 ünite olarak tayin edildi. Metal iyonlarının ise repress şartlarda *HXT2* transkripsiyonuna metal iyon türüne bağlı olarak etki ettikleri görüldü. Normal ekspresyon seviyesi ile karşılaştırıldığında Cu^{+2} , Zn^{+2} ve Co^{+2} iyonlarının *HXT2* transkripsiyona önemli bir etkilerinin olmadığı, Fe^{+3} ve Mg^{+2} iyonlarının ise düşük seviyede (yaklaşık %10 kadar) aktivasyona yol açtığı görüldü (Çizelge 4.1). Bu iyonlarının verilen konsantrasyonlarda üreme ortamında bulunması durumunda *HXT2* geninden ortalama olarak 1 750-1 950 ünitelik transkripsiyon yapıldığı görüldü (Çizelge 4.1). Nikel ve lityum iyonlarının ise *HXT2* geni transkripsiyonunu yaklaşık %35 kadar baskıladığı ve bu iyonların üreme ortamında varlığında *HXT2* geni transkripsiyonunun 1 150-1 200 ünite seviyelerinde yapılabildiği bulundu (Çizelge 4.1).

HXT2 geni transkripsiyonu glukoz baskılaması ile kontrol edilmektedir. Metal iyonlarının *HXT2* geni transkripsiyonuna derepress koşullardaki etkileri de incelendi. Bu durumda metal stresinin etkilerini incelemek için repress koşullarda etkisi görülen nikel ve lityum iyonları kullanıldı. Logaritmik aşamada derepress üreme koşullara aktarılan *S. cerevisiae* transformantlarına nikel ve lityum iyonları verilen konsantrasyonlarda ilave edilerek standart koşullarda 4 saat üretildi. Derepress şartlarda nikel iyonlarının *HXT2* transkripsiyonuna önemli etkileri olmadığı görüldü. Lityum iyonlarının ise *HXT2* transkripsiyonuna düşük seviyede baskılayıcı etkisi olduğu bulundu.

Çizelge 4.2. Derepress şartlarda *HXT2* geni transkripsiyonuna nikel ve lityum iyonlarının etkileri

Metal İyonları	Ekspresyon Seviyeleri*± SD
<i>Normal ortam</i>	<u>8 105 ± 24</u>
2,5 mM Ni^{+2}	8 172 ± 254
40 mM Li^{+2}	6 989± 556

*Ekspresyon seviyesi nmol ONPG/dakika/mg protein olarak verilmiştir. ± SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir.

4.2. Metal İyon Stresinde Msn2p, Yap1p ve Snf1p'in Etkileri

Araştırmamızda etkileri incelenen metal iyonlarından nikel ve lityum iyonlarının *HXT2* transkripsiyonuna repres şartlarda etki ettiği bulundu. *S. cerevisiae*'da stres ile aktive edilen transkripsiyon faktörleri Msn2p, Yap1p ve Snf1p'dir. Snf1p glukoz baskılamasının olmadığı şartlarda (Derepres şartlar) aktive olan bir protein kinazdır. Glukoz sinyaline ek olarak Snf1'in çeşitli stres faktörleri tarafından da aktive edildiği rapor edilmiştir (Hong ve Carlson, 2007). Bu nedenle nikel ve lityum iyonu tarafından *HXT2* geni transkripsiyonunun kısmen baskılanmasında Msn2p, Yap1p ve Snf1p'in etkileri olup olmadığı araştırıldı. Bunun için bu genlerin delesyonla yok edildiği $\Delta msn2$, $\Delta yap1$ ve $\Delta snf1$ mutant suşlarına *HXT2-lacZ* gen füzyonunu içeren ekspresyon vektörü transform edildi.

Transformantlar glukoz baskılamasının uygulandığı üreme ortamında üretilerek logaritmik aşamada nikel ve lityum iyonu stresinin *HXT2* geni ekspresyonuna etkileri incelendi (Çizelge 4.3). Sonuçlar yaban tip maya suşu ile karşılaştırıldı.

Çizelge 4.3. Repres şartlarda Msn2p, Yap1p ve Snf1p'in *HXT2* geni transkripsiyonuna etkileri

<i>S. cerevisiae</i> suşları (ilgili mutasyonlar)	Ekspresyon Seviyeleri* \pm SD		
	Normal ortam	2,5 mM Ni ⁺²	40 mM Li ⁺²
YST124 (Yaban tip)	<u>1 752 \pm 86</u>	1 239 \pm 3	1 152 \pm 12
YST159 ($\Delta snf1$)	1 260 \pm 8	1 032 \pm 30	715 \pm 38
YST242 ($\Delta yap1$)	1 714 \pm 148	1 234 \pm 63	1 047 \pm 95
YST299 ($\Delta msn2$)	1 161 \pm 20	1 051 \pm 72	979 \pm 14

*Ekspresyon seviyesi nmol ONPG/dakika/mg protein olarak verilmiştir. \pm SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir.

Mutant maya suşları ile yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar Yap1 transkripsiyon faktörünün Ni^{+2} veya Li^{+2} iyonlarına bağlı olarak meydana gelen baskılamada yer almadığını gösterdi. $\Delta yap1$ mutant suşunda metal iyonlarının varlığında *HXT2* gen füzyonundan yapılan transkripsiyonun büyük oranda yaban tip maya suşunda gözlenen değerlerde gerçekleştiği bulundu (Çizelge 4.3). $\Delta yap1$ mutant suşunda normal şartlarda 1 714 ünite olan *HXT2* transkripsiyonunun, Ni^{+2} veya Li^{+2} iyonları uygulanan ortamda 1 234 ve 1 047 birime azaldığı görüldü.

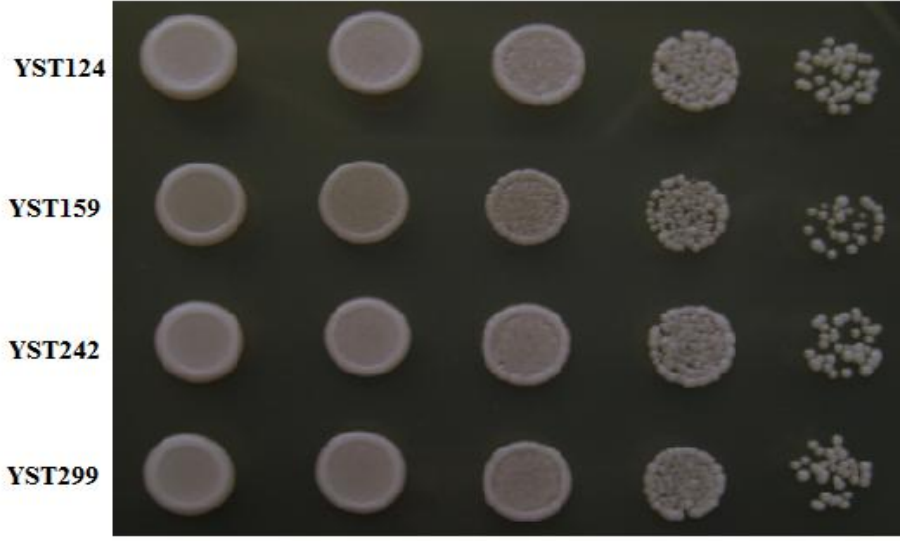
$\Delta snf1$ mutant suşunda ise metal iyonlarının etkisi ile *HXT2* transkripsiyonunda önemli miktarda baskılama olduğu bulundu. Yaban tip maya suşu ile karşılaştırıldığında $\Delta snf1$ mutant suşunda Ni^{+2} veya Li^{+2} iyonları etkisiyle *HXT2* transkripsiyonunun 1 260 üniteden sırasıyla, 1 032 ve 715 üniteye düştüğü bulundu. Bu sonuç $\Delta snf1$ mutant suşunda *HXT2* transkripsiyonunun Li^{+2} iyonları etkisiyle yaban tip suş ile karşılaştırıldığında yaklaşık % 38 kadar azaldığını göstermektedir. Elde edilen bu sonuç yaban tip maya suşunda Li^{+2} iyonları varlığında gerçekleşen 1 152 ünitelik aktivitenin önemli bir bölümünün Snf1 kinaz kompleksi tarafından gerçekleştiğini de göstermektedir. Ayrıca, Snf1 kinazın *HXT2* transkripsiyonunun bazal seviyede gerçekleşmesi içinde gerekli olduğu tayin edildi. Yaban tip maya suşunda normal şartlarda 1 752 ünite olarak gerçekleşen *HXT2* transkripsiyonunun $\Delta snf1$ mutantında normal şartlarda 500 ünitelik azalma ile 1 260 ünite olarak ölçülmesi normal şartlarda Snf1 protein kinazının *HXT2* transkripsiyonu için gerekli olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.3).

Msn2p stres ile aktive edilen bir protein kinazdır (Morano ve ark. 2012). Bu çalışmada *HXT2* geni transkripsiyonunun normal şartlarda transkripsiyonu için de Msn2'nin gerekli olduğu görülmektedir. Yaban tip maya suşunda normal şartlarda (metal iyon stresi olmayan şartlar) 1 752 ünite olarak ölçülen *HXT2* transkripsiyonunun $\Delta msn2$ mutant suşunda %34 azalma ile 1 161 ünite olarak gerçekleşmektedir (Çizelge 4.3). $\Delta msn2$ mutant suşunda üreme ortamına Ni^{+2} veya Li^{+2} stresinin uygulanması ile *HXT2* geni transkripsiyonunda önemli bir değişiklik olmadığı da görülmektedir ve *HXT2* transkripsiyonunun Ni^{+2} veya Li^{+2} iyonlarının varlığında da yaklaşık olarak aynı miktarda (yaklaşık 1 000 ünite) gerçekleştiği bulunmuştur (Çizelge 4.3).

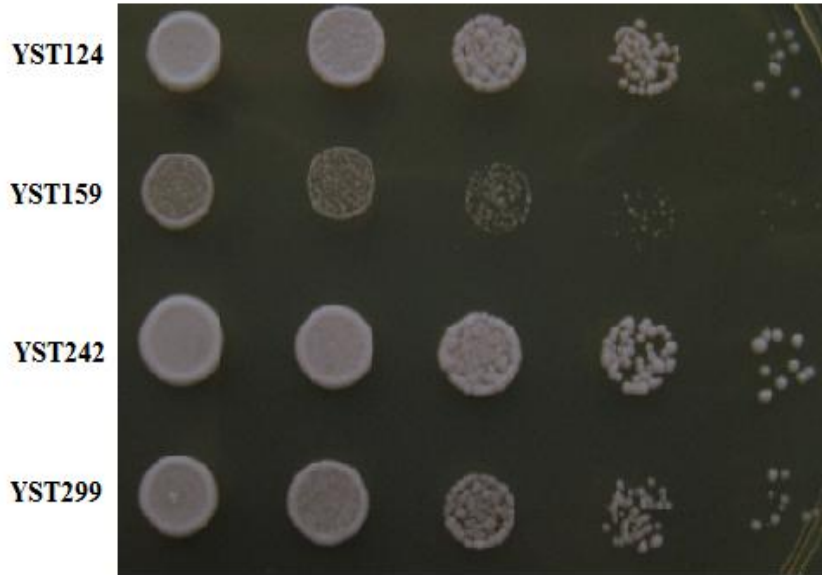
4.3. Metal İyonlarının Üremeye Etkisi

Yukarıdaki bölümlerde açıklandığı şekilde yapılan araştırmamızda lityum ve nikel iyonlarının *HXT2* transkripsiyonuna negatif yönde etki ettikleri gösterildi. Bu aşamada bu metal iyonlarının araştırmada kullanılan yaban tip ve mutant *S. cerevisiae* suşlarının üremesine etkileri kalitatif olarak petri testleri ile incelendi. Bunun için maya suşları sıvı YPD ortamında logaritmik aşamaya kadar standart şartlarda üretildi. Maya hücrelerinin steril distile suda 10^{-1} - 10^{-5} kat seyreltmeleri yapıldı. Seri seyreltmeler ile hazırlanan maya hücreleri süspansiyonlarından zengin besiyeri ortamı olan normal YPD petrilere ve nikel veya lityum iyonları içeren YPD petrilere 4 µl damla ekimi yapıldı. Ekim yapılan petriyerler 30 °C'de 2 gün bekletilerek sonuçlar fotoğraflandı. Normal üreme ortamında yaban tip ve mutant *S. cerevisiae* hücreleri arasında üreme hızları açısından herhangi bir fark olmadığı, araştırmada kullanılan maya suşlarının yaklaşık olarak aynı hızda ürediği, bu nedenle aynı sürede aynı büyüklükte maya kolonileri oluşturdukları görüldü (Şekil 4.1).

Nikel iyonlarının ise normal ortamda üremeye göre bütün maya suşlarında üremeye olumsuz etkisi olduğu görüldü. Özellikle $\Delta snf1$ (YST159) mutant suşunun nikel iyonları içeren üreme ortamında üremesinin çok yavaşladığı, görüldü (Şekil 4.2). Yaban tip suş ile $\Delta snf1$ (YST159) suşunun normal ortamdaki üreme durumu karşılaştırıldığında nikel iyonlarının $\Delta snf1$ mutantında üremeyi inhibe ettiği tayin edildi. Nikel iyonlarının $\Delta msn2$ (YST299) mutant suşunda da üremeye etki ettiği ve bu suşun üremesini yaban tip suş ile karşılaştırıldığında yavaşlattığı belirlendi (Şekil 4.2).

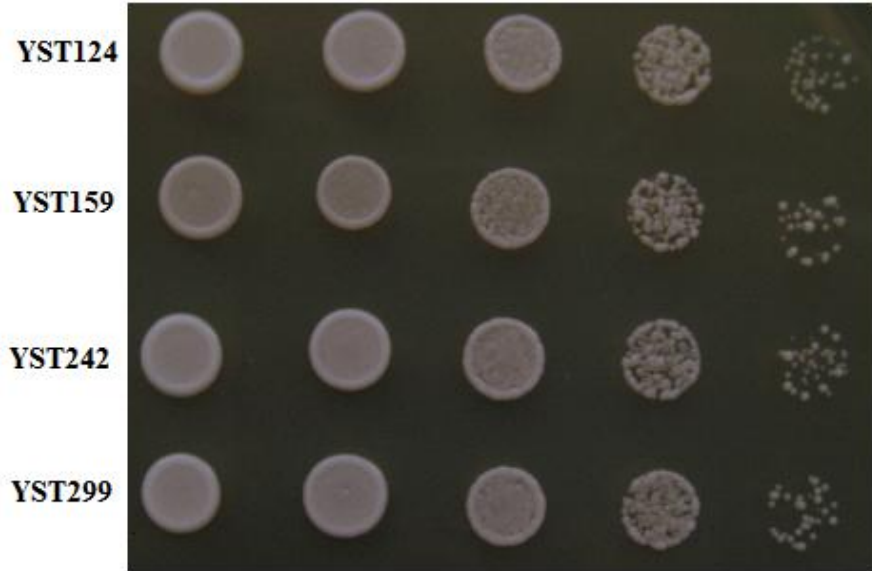


Şekil 4.1. Araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşlarının normal ortamda üreme durumları. (YST124 yaban tip; YST159 $\Delta snf1$; YST242 $\Delta yap1$, YST299 $\Delta msn2$ mutant suşlarını göstermektedir). Seyreltmeler logaritmik aşamadaki kültürlerden 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} olacak şekilde hazırlanmıştır.



Şekil 4.2. Araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşlarının nikel iyonları içeren ortamda üreme durumları. Seyreltmeler logaritmik aşamadaki kültürlerden 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} olacak şekilde hazırlanmıştır.

HXT2 transkripsiyonuna negatif yönde etki eden diğer bir metal iyonu ise lityumdur. Bu nedenle lityum iyonunun da araştırmada kullanılan maya suşlarında üreme durumuna etkileri kalitatif olarak petri testi ile incelendi. Lityum iyonu içeren petrilerde araştırmada kullanılan maya suşlarının üreme durumlarının normal ortama göre daha yavaş gerçekteği belirlendi (Şekil 4.3). Seri seyreltmeler incelendiğinde 10^{-5} seyreltmede üreyen kolonilerin normal ortama göre daha yavaş geliştiği görülmektedir (Şekil 4.3). Ayrıca, lityum iyonunun etkilerinin maya suşları arasında farklılık göstermediği de açıkça görülmektedir.



Şekil 4.3. Araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşlarının lityum iyonları içeren ortamda üreme durumları. Seyreltmeler logaritmik aşamadaki kültürlerden 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} olacak şekilde hazırlanmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Biyosferde bulunan metal iyonları hücrel faaliyetler için gerekli olduğu kadar belirli dozlarda hücreye alındığında sitotoksik ve genotoksik etki de göstermektedirler. Metallerin toksik etkilerine karşı hücreler çeşitli detoksifikasyon mekanizmaları geliştirmiştir (Pocsi 2011). Metal stresine karşı oluşan önemli hücrel yanıtlardan birisi de transkriptom düzeyinde olan yanıtıdır. Çeşitli metal iyonları ile yapılan çalışmada *S. cerevisiae*'da çok sayıda genin metal stres adaptasyonu ve metal detoksifikasyonu için gerekli olduğu bulunmuştur (Jin ve ark. 2008).

S. cerevisiae'da glukozun üreme ortamından hücre içine taşınması *HXT* genleri tarafından kodlanan ve kolaylaştırılmış difüzyon mekanizması ile çalışan Hxtp'ler tarafından gerçekleştirilmektedir. *S. cerevisiae*'da yirmi çeşit *HXT* geni genetik olarak tanımlanmıştır ve her bir *HXT* geninin kontrol mekanizmaları da ayrıntılı olarak incelenmiştir (Boles ve Hollenberg 1997, Özcan ve Jonhston 1999).

HXT genleri tarafından kodlanan bazı Hxt transporterlarının normal işlevleri olan glukoz transportuna ek olarak bazı metal iyonlarının transportu için de işlev gördüğü bulunmuştur. *HXT1*, *HXT3*, *HXT4*, *HXT5* ve *HXT7*'nin arsenik transportu için kullanıldığı bilinmektedir (Liu ve ark. 2004). Farklı metal iyonlarına karşı (gümüş, arsenik, kadmium, krom, bakır, civa ve çinko) *S. cerevisiae* genomu işleyişinde meydana gelen değişikliklerin incelendiği çalışmada *HXT2*, *HXT4*, *HXT6* ve *HXT7* genleri transkripsiyonunda önemli miktarda azalma olduğu (en az iki kat) mikro dizi analizi ile belirlenmiştir (Jin ve ark. 2008). Bu çalışmada lityum ve nikel iyonları kullanılmamıştır. Bu tez çalışmasında *HXT2* promotor füzyonu ile yapılan çalışmada nikel ve lityum iyonlarının *HXT2* geni transkripsiyonunu yaklaşık olarak %30 kadar baskıladığı bulunmuştur. Çalışmamızda metal stresi etkisinin daha önce çeşitli metal iyonları için rapor edilen seviyeden daha düşük olması iki çalışmada transkript ölçümü için farklı metodların kullanılmış olmasından kaynaklanabilir. Jin ve ark. (2008) yayımladıkları çalışmada metal iyonlarının *S. cerevisiae* transkriptomuna etkilerini mikro-dizin (micro array) tekniği ile analizi etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise *HXT2-lacZ* gen füzyonu kullanılmıştır. *HXT2-lacZ* gen füzyonunun çok kopyalı plazmitten

transkribe edilmiş olması ve/veya Hxt2-lacZ hibrid mRNA'sının sitoplazmik yarı ömrünün normal, kromozomal *HXT2* geni mRNA'sına göre farklı olması bizim yaptığımız ölçümlerde daha düşük seviyede etki görülmesine yol açmış olabilir. Bununla birlikte mikro-dizin analizi ile yapılan çalışma bizim HXT2-lacZ gen füzyonu ile yaptığımız çalışmayı destekler niteliktedir. Ayrıca, Jin ve ark. (2008) tarafından yapılan araştırmada üreme ortamı olarak zengin ortam (YPD) ve *S. cerevisiae* BY4743 diploid maya suşu kullanılmıştır. Bu araştırmada metal iyonlarının diploid *S. cerevisiae* suşu üreme hızına etkileri ise incelenmemiştir. Bu tez araştırmasında yapılan çalışmalar ise sentetik tam üreme ortamı ve haploid *S. cerevisiae* suşu kullanılmıştır. Magnezyum ve demir iyonları ise araştırmamızda uygulanan şartlarda *HXT2* geni transkripsiyonunda yaklaşık %10 kadar aktivasyona yol açmıştır. Kalsiyum iyonlarının *HXT2* geni transkripsiyonunu önemli derecede aktive ettiği daha önce rapor edilmiştir (Ruiz ve ark. 2008). Kalsiyuma benzer özellikler göstermesine rağmen magnezyum iyonlarının *HXT2* geni transkripsiyonunu beklenen seviyede aktive etmediği de görülmüştür. Kalsiyum iyonlarının *HXT2* geni transkripsiyonunu yaklaşık on kat aktive ettiği bilinmektedir (Ruiz ve ark. 2008).

Metal iyonlarının *S. cerevisiae*'da oksidatif stres oluşturduğu, bu strese yanıt olarak da *S. cerevisiae*'da stres yanıt transkripsiyon faktörleri olan Msn2p, Msn4p ve Yap1p'nin aktive edilerek oksidatif stres ile kontrol edilen hedef genlerin transkripsiyonlarını kontrol ettiği rapor edilmektedir (Morano ve ark. 2012). Ayrıca, çok fonksiyonlu bir çeşit protein kinaz olan Snf1p'nin de stres ile aktive edildiği daha önce yapılan çalışmalar ile açıklanmıştır (Hong ve Carlson 2007). Bu araştırmada metal stresinde *HXT2* transkripsiyonunun bu faktörlere bağlı olarak kontrol edilip edilmediği de mutant *S. cerevisiae* suşları kullanılarak incelendi. Nikel ve lityum stresi uygulandığında *YAP1* geni delesyonu olan *S. cerevisiae* suşunda *HXT2* geni transkripsiyonunun normal, yaban tip suşta görülen şekilde yanıt oluştuğu bulundu. Bu sonuç Yap1p'nin araştırmamızda uygulanan deneysel şartlarda *HXT2* geni transkripsiyonunda yer almadığını göstermektedir. Msn2p ve Snf1p'nin ise bazal seviyede *HXT2* transkripsiyonu için gerekli olduğu görülmüştür.

Lityum ve nikel iyonlarının ve araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* BY4741 suşu, $\Delta snf1$, $\Delta msn2$ ve $\Delta yap1$ mutant suşlarının üreme özelliklerine etkileri petri testi ile incelenmiştir. Lityum iyonlarının araştırmamızda uygulanan konsantrasyonu ile genel olarak yaban tip ve mutant *S. cerevisiae* suşlarında üremeyi yavaşlattığı görölmüştür. Lityum iyonları polietilen glikol ile birlikte *S. cerevisiae* suşlarına plazmit transformasyonu için kullanılmaktadır. Lityum iyonlarının hücre duvarı ve hücre zarında porlar oluşturduğu, pozitif yüklü olması dolayısıyla negatif yüklü DNA'ya bağlanarak transformasyon için gerekli olduğu bilinmektedir. Üremeyi yavaşlatıcı etkisi dolayısıyla lityum iyonlarının transformasyon ortamından uzaklaştırılmış olması gerekir. Nikel iyonlarının ise araştırmada uygulanan dozda yaban tip, $\Delta msn2$ ve $\Delta yap1$ mutant suşlarında üreme hızında azalmaya yol açtığı, $\Delta snf1$ mutant suşunda ise önemli derecede üremeyi engellediği görölmektedir. Bu sonuç nikel stresine yanıt için protein kinaz Snf1p'nin gerekli olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- 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.*, 21: 85-111.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., Boeke, J.D. 1998.** Designer Deletion Strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a Useful set of Strains and Plasmids for PCR-mediated Gene Disruption and Other Applications. *Yeast*, 14: 115-132.
- Broach, J.R. 2012.** Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics*, 192: 73-105.
- 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.
- Eide, D.J. 2001.** Functional genomics and metal metabolism. *Genome Biol.*, 2: 1028.1-1028.3.
- Hong, S.P., Carlson, M. 2007.** Regulation of snf1 protein kinase in response to environmental stress. *J Biol Chem.*, 282: 16838-16845
- Jin, Y.H., Dunlap, P.E., McBride, S.J., Al-Refai, H., Bushel, P.R., vd. 2008.** Global transcriptome and deletome profiles of yeast exposed to transition metals. *PLoS Genet.*, 4(4): e1000053.
- Jomova, K., Valko, M. 2011.** Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283: 65-87.
- Kruckeberg, A.L., Bisson, L.F. 1990.** The *HXT2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is required for high-affinity glucose transport. *Mol Cell Biol.*, 10: 5903-5913.
- Liu, Z., Boles, E., Rosen, B.P. 2004.** Arsenic trioxide uptake by hexose permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*, 279: 17312-17318.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randal, R.J. 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, 193: 265-275.
- Morano, K.A., Grant, C.M., Moye-Rowley, W.S. 2012.** The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190: 1157-1195.

Nourani, A., Wesolowski-Louvel, M., Delaveau, T., Jacq, C., Delahodde, A. 1997. Multiple-drug-resistance phenomenon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of two hexose transporters. *Mol Cell Biol.*, 17: 5453-5460.

Özcan, S., Johnston, M. 1995. 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., Johnston, M. 1999. Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 63: 554-569.

Paraszkiewicz, K., Długonski, J. 2009. Effect of nickel, copper, and zinc on emulsifier production and saturation of cellular fatty acids in the filamentous fungus *Curvularia lunata*. *Int Biodeter Biodegr.*, 63: 100–105.

Pocsi, I. 2011. Toxic Metal/Metalloid Tolerance in Fungi - A Biotechnology-Oriented Approach: In, Cellular Effects of Heavy Metals, Ed: G. Banfalvi, Ch II, Springer, Dordrecht, Holland, pp: 31-58.

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

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.

Rivera-Mancía, S., Pérez-Neri, I., Ríos, C., Tristán-López, L., Rivera-Espinosa, L., Montes, S. 2010. The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. *Chem Biol Interact.*, 186: 184-199.

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.

Ruiz, A., Serrano, R., Ariño, J. 2008. Direct regulation of genes involved in glucose utilization by the calcium/calcieneurin pathway. *J Biol Chem.*, 283:13923-13933.

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

Schmidt, K., Wolfe, K.D., Barbara Stiller, B., Pearce, D.A. 2009. Cd²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ and Se²⁺ toxicity to *Saccharomyces cerevisiae* lacking YPK9p the orthologue of human ATP13A2. *Biochem Biophys Res Comm.*, 383: 198-202.

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.

Wang, Y., Pierce, M., Schneper, L., ve ark. 2004. Ras and Gpa2 mediate one branch of a redundant glucose signaling pathway in yeast. *PLoS Biol.*, 2: E128.

Wysocki, R., Tamas, M.J., 2010. How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *FEMS Microbiol Rev.*, 34: 925–951

Anonim, 2016. URL1: <http://www.yeastgenome.org/locus/S000004613/regulation#regulators> (24.11.2016, 14:00)

Anonim, 2016. URL2: <http://www.yeasttract.com/findregulators.php> (24.11.2016, 14:00)



EKLER

EK 1: Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması

EK 2: β - Galaktozidaz aktivitesi hesaplanması

EK 3: Araştırmada Kullanılan Metal İyonlarının Hazırlanması



EKLER

EK 1: Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması

1: YPD (Yeast Ekstrakt, Pepton, Dekstroz)

S. cerevisiae için üreme ortamı olarak kullanılan zengin, tam besiyeridir.

Önce 10 gram/litre Yeast Ekstrakt, 20 gram/litre Pepton saf suda çözülerek hazırlandı.

YPD petrilerini hazırlamak için sıvı besiyerine 20 gram/litre olacak şekilde agar agar eklendi ve 121°C'de 25 dakika otoklavda steril edildi.

Üreme ortamına ilave etmek için glukoz %20'lik stok çözelti halinde hazırlandı, 121°C'de 25 dakika otoklavda steril edildi. Glukoz otoklav işleminden sonra üreme ortamına son konsantrasyonu %2 olacak şekilde ilave edildi.

2: Sentetik tam –Urasil Üreme Ortamı (Sc-Ura)

Maya transformantlarını petrilerde veya sıvı besiyerinde üretebilmek için seçici besiyeri olarak kullanıldı

1.7 gram/litre Yeast Nitrogen Base (YNB), 5 gram/litre Amonyum sülfat saf suda çözülerek otoklavda steril edildi. Otoklav işlemi sonrası 1.92 gram/litre urasil içermeyen amino asit karışımı (SC-Ura) (Sigma Y-1501) filtre ile steril edilerek ortama ilave edildi. Katı besiyerleri için son konsantrasyonu 20 gram/litre olacak şekilde agar agar ilave edildi, 121°C'de 25 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi. Glukoz %20'lik steril stok çözeltilerden deneylerde açıklanan konsantrasyonlarda kullanımdan hemen önce ilave edildi.

3: Lityum Asetat Çözeltileri (1M ve 0,1M)

Bu çözelti HXT2-lacZ gen füzyonu plazmitini *S. cerevisiae* hücrelerine transformasyon yapmak için kullanıldı. Lityum asetat (FW: 102,02) son konsantrasyonu 1M olacak şekilde 0,45 µm por çaplı disk filtre ile steril edilerek hazırlandı, oda sıcaklığında depo edildi. 0,1M lityum asetat ise transformasyon işleminden hemen önce stok çözeltilerden seyreltilerek taze olarak hazırlandı.

4: Polietilen Gilikol (%50 PEG)

S. cerevisiae hücrelerinin transformasyonu için kullanıldı. Polietilen Glikol (PEG) (FW: 3,350) saf suda %50'lik stok çözelti olarak hazırlandı, 121°C'de 25 dakika otoklavda steril edildi.

5: SDS (%0,1) ve Kloroform çözeltileri

SDS ve kloroform *S. cerevisiae* transformantlarını çöktürme işleminden sonra permeabilize edip hücre lizatlarını elde etmek için kullanıldı. SDS steril saf suda %0,1'lik stok çözelti olarak hazırlandı. Kloroform ise direk olarak stok çözülden herhangi bir seyreltme yapılmadan kullanıldı.

6: Lizis tampon çözeltisi

S. cerevisiae transformantlarını süspanse etmek ve lizat elde etmek için kullanıldı.

Lizis Tampon Çözeltisi (Break Buffer) İçeriği:

100 mM Tris.HCl (pH: 8)

1 mM 1,4-Dithio-DL-threitol (DTT)

%20 Gliserol

4 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF).

Çözelti verilen maddeler son konsantrasyonları yukarıda olacak şekilde steril distile su ile hazırlandı ve +4°C'de saklandı.

7: β -Galaktozidaz tampon çözeltisi (Z Buffer)

Maya transformantlarında β -galaktosidaz enzimatik aktivitesini tayin etmek için tampon çözelti olarak kullanıldı.

Çözelti içeriği aşağıdaki gibidir:

60 mM Na₂HPO₄.7H₂O,

40 mM NaH₂PO₄.H₂O,

10 mM KCl,

1 mM MgSO₄.7H₂O

50 mM β -Merkepto-etanol çözeltisi

Çözelti steril saf su ile hazırlandı ve +4°C'de saklandı.

8: Lowry Çözeltileri

S. cerevisiae hücre lizatlarındaki protein konsantrasyonlarını tayin etmek için kullanıldı.

Çözeltilerin bileşimi ve hazırlanması:

I: Lowry A çözeltisi: 20g Na₂CO₃ ve 4g NaOH toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü, stok çözelti olarak oda sıcaklığında depo edildi.

II: Lowry-B1 çözeltisi: 1 gram CuSO₄ toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile suda çözüldü, stok çözelti olarak +4 °C de depo edildi.

III: Lowry-B2 çözeltisi: 2 gram Sodyum potasyum tartarat toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile suda çözüldü, stok çözelti olarak +4 °Cde depo edildi.

IV: Lowry-C çözeltisi: Her deneyde taze olarak yukarıda verilen Lowry-A, Lowry-B1 ve Lowry-B2 stok çözeltilerden hazırlandı:

Lowry-C çözeltisinin hazırlanması:

24,5 ml Lowry A,

250 µl Lowry B1,

250 µl Lowry B2, karıştırıldı ve taze olarak kullanıldı.

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

ONPG (Sigma N1127) son konsantrasyonu 4 mg/ml olacak şekilde Z-tampon çözeltisi içinde hazırlandı. +4°C'de saklandı.

EK 2: β - Galaktozidaz aktivitesi hesaplanması

HXT2-lacZ gen füzyonlarını içeren *S. cerevisiae* transformantlarından elde edilen hücre lizatlarından ölçülen β -galaktozidaz aktivitesi aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

Aktivite: $(OD_{420} \times 1.7 / 0.0045) / (t \times V \times P)$

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

t: β -galaktozidaz reaksiyon süresi (dakika)

V: B-Galaktozidaz ölçümünde kullanılan hücre lizatı hacmi (ml)

P: Hücre lizatlarının protein konsantrasyonları (mg/ml)

β -Galaktozidaz aktivitesi birimi: Dakikada 1 mg protein tarafından hidroliz edilen nmol ONPG (nmol ONPG/dk/ mg protein) cinsinden verilmiştir

EK 3: Araştırmada Kullanılan Metal İyonlarının Hazırlanması

Araştırmada metal iyon stresi uygulamak için aşağıda verilen metal iyonları kullanıldı. Metal iyonlarının stok çözeltileri 0,45 µM çaplı disk filtre ile steril edilerek steril stok çözeltileri hazırlandı. *S. cerevisiae* üreme ortamına daha önce Schmidt ve ark. (2009) tarafından açıklanan konsantrasyonlarda ilave edildi.

a-) Cu²⁺ (CuSO₄.5H₂O, FW: 249,69)

Son konsantrasyonu 100 µM olacak şekilde kullanıldı. Stok: 20 mM'dır. 0,125 gr CuSO₄.5H₂O, 25 ml dH₂O'da çözüldü. Bu 20 mM'lık stoktan 5 ml'lik kültürler için 25 µl eklendi ve 4 saat inkübe edildi.

b-) Fe³⁺ (Fe₂(SO₄)₃.H₂O, Fw: 399,88)

Son konsantrasyonu 0,5 mM olacak şekilde kullanıldı. Stok: 50 mM'dır. 0.5 gr Fe₂(SO₄)₃, 25 ml dH₂O'da çözüldü. Bu 50 mM stoktan 5 ml'lik kültürlere 50 µl eklendi.

c-) Ni⁺² (NiSO₄.6H₂O, FW: 262,86)

Son konsantrasyonu 2,5 mM olarak kullanıldı. Stok: 100 mM'dır. Stok hazırlanması için 0,66g NiSO₄.6H₂O, 25 ml dH₂O'da çözüldü. Bu 100 mM'lık stoktan 5 ml'lik kültürlere 125 µl eklendi ve standart şartlarda 4 saat beklendi.

d-) Zn⁺² (ZnCl₂, FW: 136,3)

Son konsantrasyonu 4,4 mM olacak şekilde kullanıldı. Stok: 100 mM'dır. Stok Zn çözeltileri hazırlamak için 0,34 gr ZnCl₂ 25 ml dH₂O'da çözüldü. Bu 100 mM'lık stoktan 5 ml'lik kültürlere 220 µl eklendi ve standart şartlarda 4 saat beklendi.

e-) Mg⁺² (MgCl₂.6H₂O, FW: 203,31)

Son konsantrasyonu 150 mM olarak kullanıldı. Stok: 1,5 M'dır. 1,5 M stok hazırlamak için 7,6 gr MgCl₂, 25 ml dH₂O'da çözüldü. Bu 1,5 M stoktan 5 ml'lik kültürlere 500 µl eklendi ve 4 saat beklendi.

f-) Li⁺² (CH₃COO.Li.2H₂O, FW: 101,01)

Lityum asetat 2,55 gr alınıp 25 ml dH₂O'da çözüldü ve 1 M stok çözelti hazırlandı. Son konsantrasyonu 40 mM olarak kullanıldı. 1 M lityum asetat stoktan 5 ml'lik kültürler için 200 µl kullanıldı ve 4 saat beklendi.

g-) Co⁺² (CoSO₄.H₂O, FW: 281,1)

Kobalt sülfat son konsantrasyonu 1,2 mM olarak kullanıldı. Stok: 100 mM'dır. 100 mM stok hazırlamak için 0,7 gr CoSO₄ 25ml dH₂O'da çözüldü. Bu stoktan 5 ml'lik kültürler için 60 µl eklendi.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sinem ANGIN
Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul, 11.06.1990
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lise : İstanbul Ataköy Lisesi/ 2008
Lisans : Uludağ Üniversitesi/ 2013
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi/ 2017
İletişim (e-posta) : sinemangn@gmail.com
Yayımları :

1- Aylin Kahraman, Sinem Angın, Sezai Türkel. 2015. Molecular and Biochemical Analysis of the Effects of some Food Additives on the Expression of Trehalose and Glycerol Metabolism Genes in *S.cerevisiae*. IV Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi. Afyonkarahisar, 21-24 Ağustos, 2015. (Poster).