

**AZOT SİNYAL İLETİMİNİN TY VİRÜSLERİNDE GEN
ANLATIMINA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Tuğçe KARADUMAN



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

**AZOT SİNYAL İLETİMİNİN TY VİRÜSLERİNDE GEN ANLATIMINA
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Tuğçe KARADUMAN
0000-0003-0479-0559**

**Prof. Dr. Sezai TÜRKEKEL
(Danışman)**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**BURSA-2019
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ ONAYI

Tuğçe Karaduman tarafından hazırlanan "Azot Sinyal İletiminin Ty Virüslerinde Gen Anlatımına Etkilerinin İncelenmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Bursa 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 TÜRKEKEL
0000-0001-7128-6948
B.U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı


İmza.

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Figen ERSOY
0000-0003-2267-069X
B.U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı


İmza.

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Tuba YAGCI
0000-0003-1705-5107
Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı


İmza.

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

Prof. Dr. Hüseyin Aksoy EREN
Enstitü Müdürü

27 / 09 / 2019

Bilimsel Etik Bildirim Sayfası

B.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.

27 / 09 / 2019

Tuğçe KARADUMAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

AZOT SİNYAL İLETİMİNİN TY VİRÜSLERİNDE GEN ANLATIMINA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Tuğçe KARADUMAN

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sezai TÜRKEKEL

Saccharomyces cerevisiae genomunda 5 farklı türü bulunan Ty elementleri, RNA aracılığı ile genomda yer değiştirdikleri için retrotranspozonlar olarak da bilinmektedirler. Ty elementlerinin *S. cerevisiae* genomunda kopya sayıları sabittir. *S. cerevisiae* genomunda çoğalma mekanizmaları virüslere benzediği için Ty1 ve Ty2 elementleri pseudovirüsler olarak da adlandırılırlar. Bu pseudovirüslerde gen ifadesi hem transkripsiyon ve hem de translasyon seviyesinde kontrol edilmektedir. Ty elementlerinin genomundan transkripsiyon ve translasyonları için hiçbir düzenleyici veya temel faktör kodlanmaz. Bu nedenle Ty elementlerinin genomda çoğalmaları ve replikasyon döngüsü tamamen konak olarak buldukları *S. cerevisiae* hücrelerine bağlıdır. Bundan dolayı *S. cerevisiae*'da gen ifadesine etki eden metabolik veya fizyolojik sinyallerin Ty elementlerinde de transkripsiyon ve translasyona etki etmeleri beklenebilir. Azot, hücre metabolizması için en temel element olup, farklı azot kaynaklarının algılanması ve kullanımı da genetik kontrol altındadır. Üreme ortamındaki azot miktarı ve azot kaynağının çeşidi *S. cerevisiae*'da üreme hızı başta olmak üzere çok sayıda genin ifadesine direkt olarak etki etmektedir. Bu tez araştırmasında; azot sinyal iletiminin ve azot kaynağının Ty1 ve Ty2'de gen ifadesine etkileri incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda Ty1 ve Ty2'de gen ifadesinin azot kaynağına göre kontrol edildiği gösterilmiştir. Azot sinyal iletim yolağında yer alan, azot miktarı ve çeşidine göre gen ifadesini kontrol eden bazı transkripsiyon faktörlerinin Ty1 ve Ty2'de gen ifadesinin kontrolünde de yer aldığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Azot sinyal iletimi, Ribozomal Frameshift, *S. cerevisiae*, Transkripsiyon, Ty elementleri.

2019, XII + 46 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF NITROGEN SIGNALING ON THE GENE EXPRESSION IN TY VIRUSES

Tuğçe KARADUMAN

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

Supervisor: Prof. Dr. Sezai TÜRKEKEL

Ty elements are present in 5 different types in *Saccharomyces cerevisiae* genome. They transpose within the yeast genome through an RNA intermediate and also named as retrotransposons. Their copy number in the yeast genome is constant. Since the propagation mechanisms of Ty1 and Ty2 in the yeast genomes resemble to retroviruses, they are also called as pseudoviruses. Gene expression in Ty elements is controlled at transcription translation level. Ty elements do not encode any regulatory factors for their transcriptional and translational regulation from their genome. Hence their replication cycles completely depend on the yeast encoded factors. Therefore it is expected that any metabolic or physiological signal that affects the gene expression in *S. cerevisiae*, also affects the transcription and translation process in Ty elements. Nitrogen is one of the basic elements required for cellular metabolic events. Nitrogen sensing and signaling is under the genetic control in yeast. The types and the quantities of nitrogen sources directly affect the growth rate and the expression levels of many genes in *S. cerevisiae*. In this thesis research, the effects of nitrogen source and nitrogen signaling on the gene expression in Ty1 and Ty2 were investigated. Results of this study indicated that TOR kinase and the GATA factors that are major regulators of nitrogen signaling in yeast, might control the gene expression in Ty1 and Ty2 element of *S. cerevisiae*.

Keywords: Nitrogen signaling, Ribosomal frameshift, *S. cerevisiae*, Transcription, Ty elements.

2019, XII + 46 pages

TEŞEKKÜR

Başta, yüksek lisans eğitimim boyunca duruŐu, bilimsel birikimi, yol göstericiliği, yardımları ve sabrı ile desteğini esirgemeyen, her yüksek lisans öğrencisinin sahip olmak isteyeceği sayın bölüm baŐkanım ve danıŐmanım **Prof. Dr. Sezai Türkel**'e ve laboratuvar çalıŐmalarımda bana yardımcı olan değerli yüksek lisans arkadaŐlarım **Aylin Kahraman**'a **Seda Sarıca**'ya ve destek olan tüm arkadaŐlarıma teşekkür ederim.

Bu tez araştırmasında kullandığımız Ty ekspresyon vektörlerini ve maya suŐlarını sağlayan değerli bilim insanları **P.J. Farabaugh**, **P. Lesage**, **E. Dubois**, **M.E. Cardenas**'a sonsuz teŐekklerimi sunarım.

Son olarak da öğrenimimi sürdürmemi daima destekleyen; annem **Hatice Karaduman**, babam **Hüseyin Karaduman** ncelikli olmak üzere ailemdeki her bireye sevgimi sunar ve sonsuz teşekkür ederim.

Tuğçe KARADUMAN
27/ 09/ 2019

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.....	3
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nin Önemi, Genetik Ve Hücresel Özellikleri.....	3
2.2. Ty Elementlerinin Genel Özellikleri.....	4
2.3. Ty Elementlerinde Gen İfadesinin Kontrol Mekanizmaları.....	7
2.4. Ty Virüslerinde Ribozomal Frameshift ve Replikasyon Döngüsü.....	10
2.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'de Azot Sinyal İletim Yolağı ve Bileşenleri.....	12
2.6. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'de Psödohifsel Gelişmenin Genetiği ve Biyolojisi.....	16
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	18
3.1. Araştırmada Kullanılan Maya Suşları ve Üreme Koşulları.....	18
3.2. Ty-LacZ Ekspresyon Vektörünün Özellikleri ve Transformasyonu.....	19
3.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Transformantlarının Üretilmesi.....	22
3.4. β -Galaktozidaz Aktivitelerinin Tayini.....	23
4. BULGULAR.....	25
4.1. Ty1 ve Ty2 Promotorlarında GATAA Faktörü Sekanslarının İncelenmesi.....	25
4.2. Farklı Azot kaynaklarının Ty Virüslerinde Transkripsiyona Etkileri.....	27
4.3. Ty 1 Transkripsiyonuna GATAA Faktörlerinin Etkisi.....	29
4.4. Ty2 Transkripsiyonuna GATAA Faktörlerinin Etkisi.....	30
4.5. Psödohifsel Üremenin Ty Transkripsiyonuna Etkisi.....	31
4.6. TOR İnhibitörü Olarak Kafeinin Ty Transkripsiyonuna Etkisi.....	32
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	34
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	37
EKLER.....	41
Ek 1: Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması.....	42
Ek 2: β - Galaktozidaz Aktivitesi Hesaplanması.....	45
ÖZGEÇMİŞ.....	46

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

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

Kısaltmalar

Kısaltmalar	Açıklama
ATP	Adenosin tri fosfat
cDNA	Copy of their DNA
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DR	Glukoz baskısı altında olmayan, (Derepressed)
dsDNA	Double Strand DNA
eIF	Eukaryotic Initiation Factor
FS	Frameshift
Gag	Group specific antigen, virüs kapsit proteini
GRAS	Generally Recognized as Safe
HOG	High Osmolarity Glycerol response
Kbp	Kilo base pair
LacZ	Beta-Galactozidaz geni
Leu	Lösin
LTR	Long Terminal Repeats
M	Molar
MAT	Mating type, <i>S. cerevisiae</i> 'da eşleşme tipi
Mbç	Mega baz çifti
mg	Miligram
mm	Milimetre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
OD	Optical Density
ONPG	Orto Nitro Phenyl Galactoside
ORF	Open Reading Frame (Açık okuma Penceresi)
PEG	Polyetilen glikol
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PKA	Protein Kinaz A

Pol	Polimeraz
PRF	Programmed Ribosomal Frameshift
R	Glukoz baskılaması (Repressed)
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Rotation per minute
SA	Salisilik asit
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC- Ura	Urasil içermeyen sentetik tam üreme ortamı
Ser	Serin
SGD	Saccharomyces Genome Database
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOD	Süperoksit dismutaz
SNF	Sucrose non-fermenting
ssRNA	Single Strand RNA
TOR	Target of Rapamycin
tRNA	Taşıyıcı RNA
Ty	Transposon Yeast
URA	Uracil
VLP	Virüs-like particles
yAP	Yeast Aktivatör Protein
YE _p	Yeast Epizomal plazmit
YPK	Yeast Protein Kinase
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast extract Pepton Dextrose

ŞEKİLLERİN DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. <i>S. cerevisiae</i> genomunda bulunan Ty elementlerinin dağılımı.....	6
Şekil 2.2. Ty virüslerinin genomik organizasyonları.....	6
Şekil 2.3 Ty elementlerinde virüs benzeri parçacıkların oluşum aşamaları.....	9
Şekil 2.4. Ty3'de PRF bölgesindeki kodon sıralaması.....	11
Şekil 2.5. <i>S. cerevisiae</i> 'da Ty1 replikasyon döngüsü.....	12
Şekil 2.6. Farklı azot kaynaklarının <i>S. cerevisiae</i> 'da bölünme süresine etkileri....	13
Şekil 2.7. TOR kompleksinin azot sinyal yolağındaki işlevi.....	14
Şekil 2.8. Azot metabolizmasının ana yolları.....	15
Şekil 2.9. <i>S.cerevisiae</i> 'da psödohifsel gelişim.....	17
Şekil 4.1. Ty2 promotorunda potansiyel GATA faktörü bağlanma yerleri.....	26
Şekil 4.2. Ty1 promotorunda potansiyel GATA faktörü bağlanma yerleri.....	27

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşları ve özellikleri.....	19
Çizelge 4.1. Farklı azot kaynaklarının Ty1 ve Ty2’de transkripsiyona etkileri....	28
Çizelge 4.2. GATA faktörlerinin Ty1 transkripsiyonuna etkileri.....	29
Çizelge 4.3. GATA faktörlerinin Ty2 transkripsiyonuna etkileri.....	30
Çizelge 4.4. Psödohifsel üremenin Ty1 ve Ty2’de transkripsiyona etkileri.....	32
Çizelge 4.5. TOR inhibitörünün Ty1 ve Ty2’de transkripsiyona etkileri.....	33

1. GİRİŞ

Saccharomyces cerevisiae barındırdığı avantajlı özellikler sayesinde bilim çevresinde birçok araştırmacı tarafından model organizma olarak kullanılan ökaryot bir maya mantarıdır. Tek hücreli olması bakımından laboratuvarında çok hızlı üretilebilir (Botstein ve Fink 2011).

S.cerevisiae genomunda bulunan Ty (Transposon yeast) retrotranspozonları, LTR (Long Terminal Repeats) tekrarı içeren ökaryotik retrovirüslerin bir grubudur (Cameron ve ark. 1979). Maya genomunda RNA aracılığı ile yer değiştirme yeteneğine sahip oldukları için retrotranspozon olarak da bilinmektedirler. Bu özellikleri nedeniyle insan retrovirüslerine de benzerlik gösterirler (Boeke ve ark. 1985). Ty virüsleri insanda hastalığa sebep olan bazı virüslere genetik benzerlik göstermekle birlikte, herhangi bir hastalığa neden olmazlar. Bu özelliklerinden dolayı virüslerin gen ifadesinin incelenmesinde model olarak kullanılmaktadırlar. Maya genomunda 5 farklı çeşit Ty virüsü bulunabilir (Ty 1-5) ve çeşitleri; LTR dizi özelliklerine göre ayırt edilebilir (Kim ve ark. 1998). Virüslerin gen ifadesinde transkripsiyonel ve translasyonel seviyede bir kontrol sağlanabilmektedir. Ty elementlerinde translasyonel kontrol, programlı ribozomal frameshift (çerçeve kayması) mekanizması ile sağlanır (Clare ve ark. 1988, Belcourt ve Farabaugh 1990).

Ty elementlerinden ilk keşfedilen Ty1 elementi ve daha sonra da Ty2 elementinin genetik yapısı ve kontrol mekanizmaları detaylı bir şekilde analiz edilmiştir. Ty1 ve Ty2'de transkripsiyonel regulasyon için gerekli transkripsiyon faktörlerinin bir çoğu tayin edilmiştir. Translasyonel kontrolde ise kodlama bölgesinde bulunan GAG-POL polipeptidlerinin belirli oranda sentezi de programlı ribozomal frameshift ile yapılır. Çerçeve kayması düşük bir frekansta oluşur. Ty elementlerinde PRF +1 yönde ribozomal kayma ile yapılır. Bazı virüslerde ise -1 yönde olduğu bilinmektedir (Farabaugh 1996).

S. cerevisiae hücrelerinde gen ifadesine etkin bir şekilde etki eden metabolik sinyaller glikoz ve azot sinyalleridir. Glikoz sinyaline yanıt olarak *S. cerevisiae* genlerinin yaklaşık %20'sinde gen ifadesinde artış veya azalma olduğu gösterilmiştir (Schneper ve ark. 2004). Glikoz sinyal yolağına bağlı olarak Ty elementlerinde gen ifadesinin kontrol edildiği daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Türkel ve ark. 2009, Türkel ve ark. 1997). Azot ise

S.cerevisiae'nin üremesi için gerekli olan temel bileşiklerden olup, farklı maddeler de azot kaynağı olarak kullanılır. Azot kaynağının çeşidi ve miktarına göre de *S. cerevisiae*'da çok sayıda gen ifadesinin kontrol edildiği bulunmuştur (Zhang ve ark. 2018, Godard ve ark. 2007) Bu çalışma kapsamında; farklı azot kaynaklarının Ty1 ve Ty2 elementlerinde gen ifadesine etkileri incelendi. Elde edilen sonuçlar, azot sinyal iletim yolağının Ty1 ve Ty2'de gen ifadesine farklı şekilde etki ettiğini göstermektedir. Ty1 ve Ty2'de transkripsiyonel kontrolde azot sinyal iletim yolağı bileşenleri olan TOR kinaz ve bazı GATA faktörlerinin de işlevi olduğu bulunmuştur.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Saccharomyces cerevisiae*'nin Önemi, Genetik ve Hücresel Özellikleri

Saccharomyces cerevisiae genetik, moleküler biyoloji, biyokimya ve diğer yaşam bilimleri alanlarında temel araştırmalar için uygun bir model organizma olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır (Botstein ve Fink 2011). *S. cerevisiae*, endüstriyel önemi dolayısıyla da hem endüstriyel üretim ve hem de biyoteknolojik araştırmalar için gözde olan ökaryotik tek hücreli bir model organizmadır. Kullanıldığı alanların çeşitliliği, genomik üstünlükleri ve pek çok çalışma alanı açısından GRAS (Generally Recognized as Safe), yani güvenli olması, organizmanın en büyük avantajlarından biridir. 90 dakika gibi kısa bir sürede üretilmesi, özellikle endüstriyel üretimdeki rolünü önemli kılmaktadır. *S. cerevisiae*'nin üreme ortamları, kolay temin edilebilen ucuz besiyerleridir. Genomu, sekanslanan ökaryot genomları içinde ilk olma özelliği taşır (Goffeau ve ark. 1996). Heterolog gen ifadesi için vektör çeşitliliği fazla olup transformasyonu da kolay ve etkindir (Feldman 2012).

S. cerevisiae genomunda 16 kromozom bulundurulur. (Madigan ve Martinko 2010). Kromozomlara ek olarak genomda 2 mikron plazmiti, RNA virüsleri, ve Ty elementleri (Transposon Yeast) de bulunmaktadır (Feldman 2012). Genomu kompakt yapıda olup 13 Mbç büyüklüğündedir ve kodlanmayan bölge miktarı çok azdır (Madigan ve Martinko 2010). Genomunun %70'i ORF yani Açık Okuma Çerçevesinden oluşmaktadır. Genler arası boşlukları diğer ökaryotlara kıyasla daha kısadır. ORF'lerinde %4 civarında intron bölgesi içerir. 5570 protein kodlayan geni bulunur (Feldman 2012). Bu özelliklerin tamamı genetik manüplasyon, insan genlerindeki homologların bulunması ve gen fonksiyonlarının bulunması açısından önemlidir.

S. cerevisiae'da genomu sekanslanan ve aynı zamanda genom veritabanı da oluşturulan ilk ökaryotik organizma olma özelliği de taşımaktadır. *S. cerevisiae* kromozomlarının sekansları, genlerin koordinatları, gen yapıları ve kodlanan polipeptidlerin yapıları oldukça ayrıntılı olarak Saccharomyces Genome Data Base (SGD) adlı verilen veri tabanında açık erişim ile ulaşılabilir durumdadır (Cherry ve ark. 2012). Bu veri tabanından sağlanan genetik ve

biyokimyasal veriler *S. cerevisiae* araştırmalarında oldukça önemli bir yer tutar. (Cherry ve ark. 2012)

S. cerevisiae hücreleri tipik ökaryotik organel yapıları içerir. Hem haploid hem de diploid olarak bulunabilirler. Haploid hücrelerde hücre tipleri MAT α ve MAT a olmak üzere iki eşitir. Haploid hücreler eşleşerek MAT a/α diploidleri oluştururlar. Diploid *S. cerevisiae* hücreleri olumsuz üreme ortam koşullarında sporulasyon ile tekrar haploidleri oluşturmaktadır (Feldman 2012). Haploid ve diploid *S. cerevisiae* hücrelerini mikroskopta görsel olarak ayırt etmek de oldukça kolaydır. Haploid *S. cerevisiae* hücrelerinin tomurcuklanma şekli aksial olarak tanımlanan, birbirine yakın konumda olurken; diploid hücrelerde tomurcuklanma ana hücrenin zıt kutuplarından (bipolar) olarak gerçekleşir (Feldman 2012).

S. cerevisiae'da ökaryotik organeller de mevcuttur. Özellikle vakuol, mitokondri, peroksizom yapısı ve biyogenezi konularında; *S. cerevisiae* hücre biyolojisi için temel araştırmalarda kullanılır. *S. cerevisiae* mitokondrisine gen aktarımı yani transformasyon da yapılabilmektedir. Peroksizomların bölünerek çoğalmalarının moleküler mekanizması da *S. cerevisiae*'da gösterilmiştir. Protein sekresyon sistemi de çok iyi incelenmiştir (Feldman 2012).

2.2. Ty Elementlerinin Genel zellikleri

Ty elementleri ilk kez Cameron ve ark. (1979) tarafından *S. cerevisiae*'da kromozomal mutasyonlara neden olan hareketli genetik elementler olarak tanımlanmıştır (Cameron ve ark. 1979). İlk elde edilen bulgular dolayısıyla bakterilerde, *Drosophila*'da ve mısır bitkisindeki transpozonlara benzer olarak genomda yer değiştirdikleri için bu elementler Transposon yeast anlamında kısaca Ty elementleri denilmiştir (Cameron ve ark. 1979). Daha sonra yapılan çalışmalarda Ty elementlerinin *S. cerevisiae* genomunda RNA aracılığı ile yer değiştirdikleri keşfedildiği için retrotranspozonlar olarak adlandırılmaya başlanmıştır (Boeke ve ark. 1985).

Ty elementlerinin virüs sistematidindeki yeri ise daha sonra genomik veriler kullanılarak tekrar değerlendirilmiştir. Farklı *S. cerevisiae* suşlarında farklı sayı ve çeşitlerde Ty elementleri keşfedilmiştir. Virüs sistematidinde değerlendirildiklerinde ise Ty elementlerine virüs sistematidinde Retrovirales takımı içinde yer verilmiştir. Genom

yapılarında aşağıda açıklandığı şekildeki farklılık dolayısıyla Ty1, Ty2, Ty4 ve Ty5 elementleri Pseudoviridae cinsinde sınıflandırılırken Ty3 elementi Metaviridae cinsinde bulunan retrovirüs benzeri genetik element olarak sınıflandırılmıştır (Capy 2005).

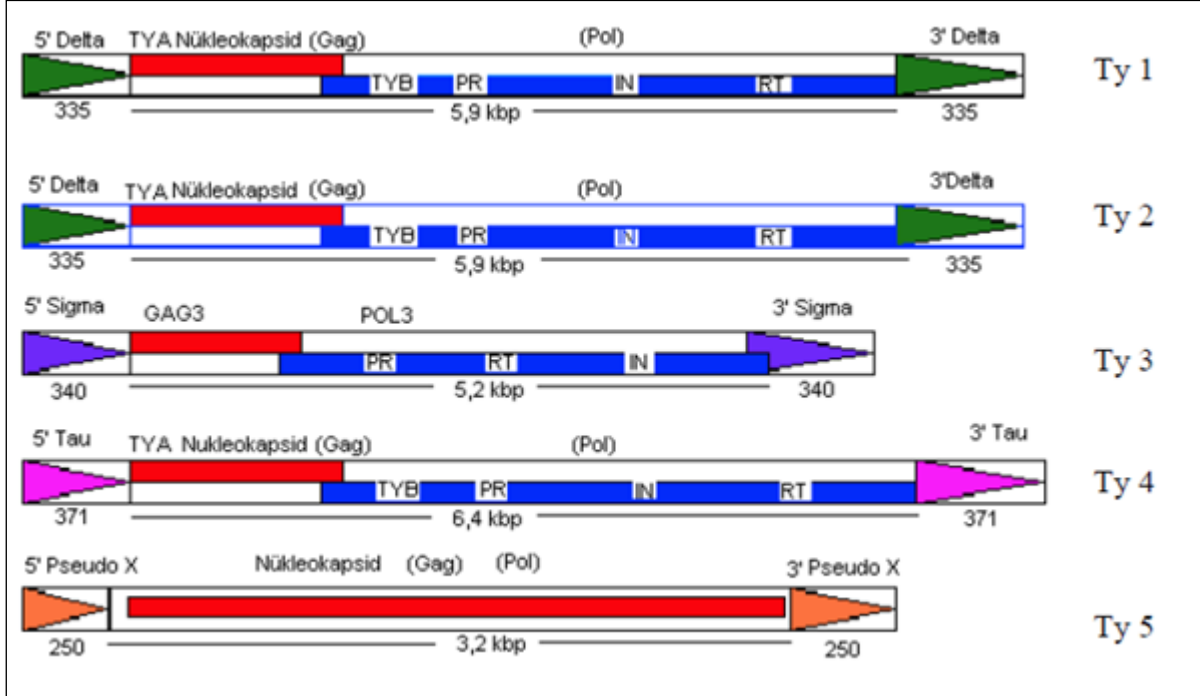
Tipik bir *S. cerevisiae* suşunda Ty elementlerinin 5 farklı yapıda olduğu bulunmuştur. Bu yapısal farklılıkları dolayısıyla Ty elementleri Ty1-Ty5 olarak 5 farklı grupta sınıflandırılmaktadır (Kim ve ark. 1998). Ty elementlerinin genom yapılarındaki benzerlikler de çeşitlilik göstermektedir. Genom sekansları birbirine en çok benzeyen Ty'ler Ty1 ve Ty2'dir (Kim ve ark. 1998). Ty3'ün genom organizasyonu diğer Ty'lerden farklılık göstermektedir (Curcio ve ark. 2014, Sandmeyer ve ark. 2015).

Ty elementlerinin genomdaki kopya sayıları da farklılık göstermektedir. Ty1, haploid maya genomu başına 30 kopya olarak bulunur ve yüksek kopya sayılı element olarak bilinmektedir. Diğer Ty elementlerinin genomdaki kopya sayıları düşük olup *S. cerevisiae* suşuna göre değişebilen miktarlarda ve genellikle 1-5 kopya kadar bulunmaktadır (Kim ve ark. 1998). *S. cerevisiae* genomunda tam uzunlukta bulunan Ty elementlerine ek olarak sadece direkt tekrar bölgelerini içeren Ty parçaları da bulunmaktadır. Ty elementlerinin 5' ve 3' uçlarında yaklaşık 330 bp uzunluğunda direkt tekrarlar bulunmaktadır. Ty elementlerindeki bu bölgeler genel olarak LTR (Long Terminal Repeats) olarak da adlandırılır. Ty1 ve Ty2'de bulunan bu direkt tekrarlara delta elementi, Ty3'de bulunan direkt tekrar bölgesine ise sigma elementi denir. Transposonlarda direkt tekrar veya ters tekrar olarak bulunan bu sekanslar arasında homolog rekombinasyon olabilmektedir. Bu durum Ty elementlerinin direkt tekrarları arasında da gerçekleşir. Bunun sonucu olarak Ty elementlerinin iki tekrar bölgesi arasındaki sekansı delesyona uğrar ve genomda, yani *S. cerevisiae* kromozomlarında sadece direkt tekrarlar kalır. Bu Ty parçalarına da solo delta veya solo sigma elementi denilir. Tam uzunlukta veya solo delta elementlerin maya genomlarındaki sayıları ve buldukları kromozomlar da *S. cerevisiae* genom analizi sonucu belirlenerek yayınlanmıştır (Şekil 2.1) (Kim ve ark. 1998). Ty elementlerinin genel olarak genom yapıları sırasıyla Şekil 2.2'de verilmiştir.

Chr. no.	Number of insertions ^a					Total Ty insertions on chromosome
	Ty1	Ty2	Ty3	Ty4	Ty5	
I	6 (1)	1	1	0	0	8
II	13 (2)	2 (1)	1	2	0	18
III	11	2 (1)	0	1	2 (1)	16
IV	20 (5)	3 (3)	6	2	0	31
V	18 (2)	5	4	3	2	32
VI	8	1 (1)	0	1	0	10
VII	25 (3)	2 (2)	6 (1)	4	1	38
VIII	14 (1)	1	3	3 (1)	1	22
IX	5	1	2 (1)	1	0	9
X	14 (2)	4	1	3 (1)	0	22
XI	11	1	1	0	1	14
XII	18 (4)	3 (2)	4	1	0	26
XIII	15 (4)	2	0	3	0	20
XIV	5 (2)	1 (1)	4	3	0	13
XV	18 (2)	3 (2)	4	2	0	27
XVI	16 (4)	2	4	3 (1)	0	25
Genome total	217 (32)	34 (13)	41 (2)	32 (3)	7 (1)	331

^aInsertions include full-length elements, solo LTRs, and LTR fragments. Numbers of full-length elements are shown in parentheses.

Şekil 2.1. *S. cerevisiae* genomunda bulunan Ty elementlerinin dağılımı (Kim ve ark. 1998)



Şekil 2.2. Ty virüslerinin genomik organizasyonları (Bayram 2005. Farbaugh 1995).

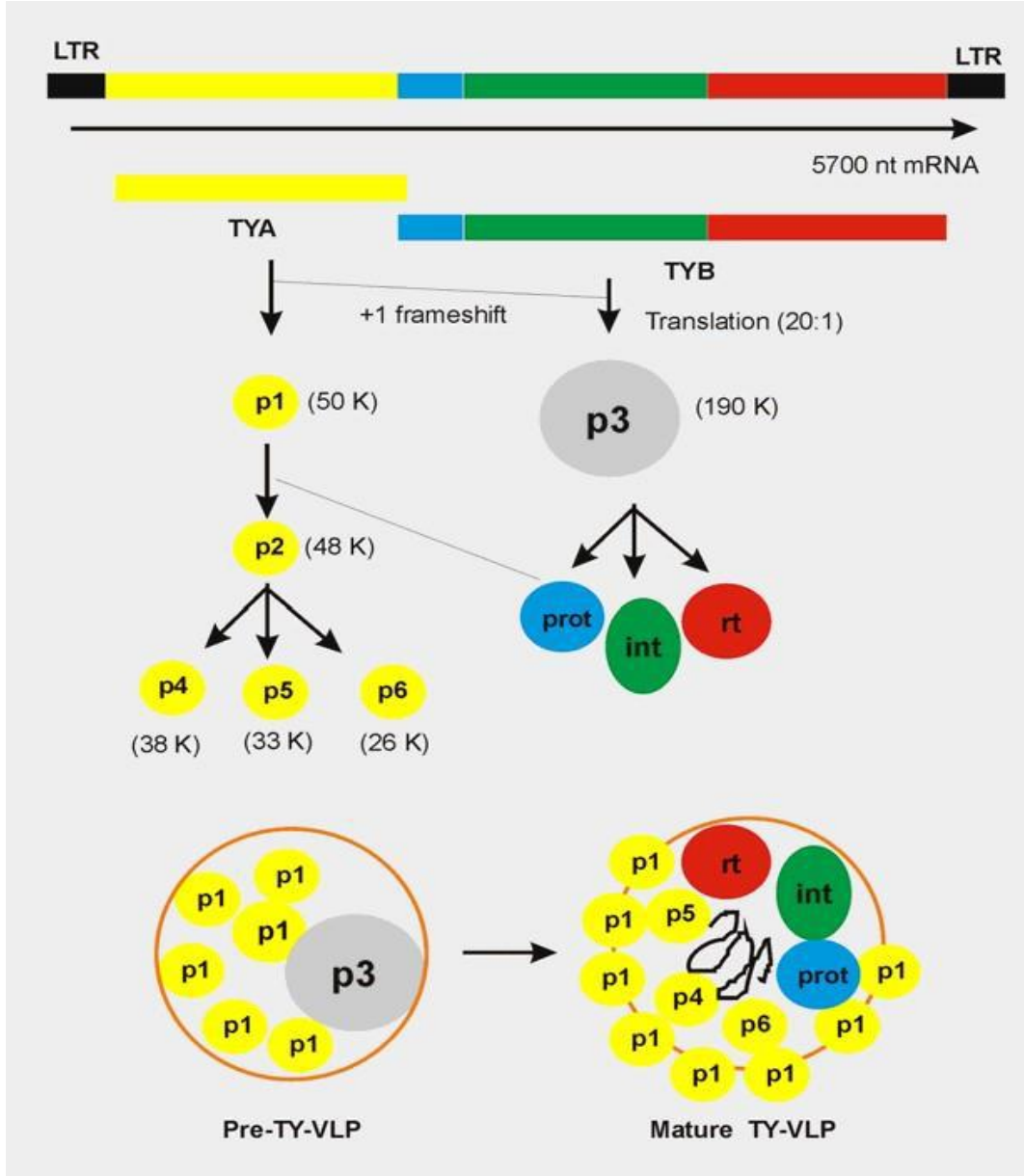
2.3. Ty Elementlerinde Gen İfadesinin Kontrol Mekanizmaları

Ty elementlerinde gen ifadesi hem transkripsiyonel ve hem de translasyonel seviyede kontrol edilmektedir. Ty1 ve Ty2 ilk tanımlanan Ty elementi olduklarından bu iki Ty elementinde gen ifadesi ve kontrol mekanizmaları daha ayrıntılı analiz edilmiştir (Türkel 1994, Farabaugh 1995, 1996, Bayram 2003).

Ty elementlerinde transkripsiyon 5'LTR'dan başlayıp 3' LTR'da sonlanır. Transkripsiyonları *S. cerevisiae* RNA Polimeraz II kompleksi tarafından yapılmaktadır ve Ty mRNA'larının da normal hücrel mRNA'lar gibi polyA kuyruğu taşıdıkları bilinmektedir. Kromozomlara entegre durumda bulunan Ty elementlerinden tek çeşit mRNA transkribe edilir. Ty elementlerinde promotor bölgesi olarak genellikle 5' LTR (Delta veya Sigma elementi) kabul edilmektedir. TATA kutusunun yeri, transkripsiyon ve translasyon başlama noktaları da tayin edilmiştir. Hem Ty1 ve hem de Ty2'de transkripsiyonun kontrolü için transkribe edilen bölgede de (TATAA'nın 3' yönünde) çeşitli transkripsiyon faktörlerinin bağlanma dizileri olduğu ve bu bölgelerin transkripsiyonel kontrol için gerekli oldukları da daha önce yapılan çalışmalarda bulunmuştur. Genel olarak değerlendirildiğinde Ty1 elementinde ilk 1500 bp uzunluktaki bölgenin Ty2'de ise ilk 750 bp uzunluktaki bölgenin transkripsiyonel kontrol için gerekli olduğu bulunmuştur (Türkel 1994, Farabaugh ve ark. 1989, Morillon ve ark. 2002). Ty1'de transkripsiyonel regulasyonun haploid ve diploid hücrelerde farklı şekilde gerçekleştiği, özellikle diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde Ty1 transkripsiyonunun daha düşük seviyede gerçekleştiği de bulunmuştur (Errede ve ark. 1987). Ty2 transkripsiyonunun aktivasyonunda temel aktivatörün, transkripsiyon faktörü Gcr1 olduğu, in-vivo ve in-vitro çalışmalar ile gösterilmiştir (Türkel 1994, Türkel ve ark. 1997). Ty1'de ise transkripsiyonel kontrol için çok daha fazla faktörün gerekli olduğu; amino asit açlığına yanıt olarak aktive edilen Gcn4 faktörü ve Gcr1 ile transkripsiyonunun kontrol edildiği bulunmuştur (Morillon ve ark. 2002, Curcio ve ark. 2014).

Ty mRNA'larının translasyonu, diğer mRNA'larda olduğu gibi sitoplazmada gerçekleşir. Ty mRNA'larında iki farklı kodlama bölgesi (ORF) belirlenmiştir. Bu kodlama bölgeleri TYA ve TYB olarak da adlandırılır. Bu iki kodlama bölgesinin kesişim noktasında okuma çerçevesi +1 yönde değişiklik göstermektedir. TYA 5' uçta bulunan peptid olup, virüslerde bulunan

GAG analogudur. GAG translasyon sonrası proteolitik olarak kesilerek daha küçük peptidlere bölünür ve Ty virüslerinin kapsid kısmını oluşturur. İkinci kodlama bölgesi olan TYB ise viral POL analogu olup bu polipeptidin translasyon sonrası proteolitik kesimi ile Ty replikasyonu için gerekli olan revers transkriptaz, integras, proteaz polipeptidleri üretilir (Şekil 2.3). Bu polipeptidler belirli oranlarda bir araya gelerek Ty replikasyon döngüsü için önemli olan olgun virüs benzeri parçacıkları (VLP: Virus Like Particles) meydana getirirler. VLP’de her proteinin belirli oranda bulunması da translasyon sırasında TYA ve TYB’nin belirli oranda translasyonunun yapılması, programlı ribozomal frameshift (PRF) ile sağlanır. Ty virüslerinde translasyon elongasyonu sırasında +1 yönde ribozomal çerçeve kayması meydana gelmektedir. PRF’in moleküler mekanizmaları Ty ve Ty3 için oldukça ayrıntılı olarak incelenmiş ve bölüm 2.4’de verilmiştir.



Şekil 2.3. Ty elementlerinde virüs benzeri parçacıkların oluşum aşamaları.

TYA'dan proteolitik olarak ayrılan peptidler sarı renkli olarak gösterilmiştir. TYB'den kesilen peptidler ise revers transkriptaz (rt), integraz (int) ve proteazı (prot) oluştururlar (Feldman 2012)

2.4. Ty Virüslerinde Ribozomal Frameshift ve Replikasyon Döngüsü

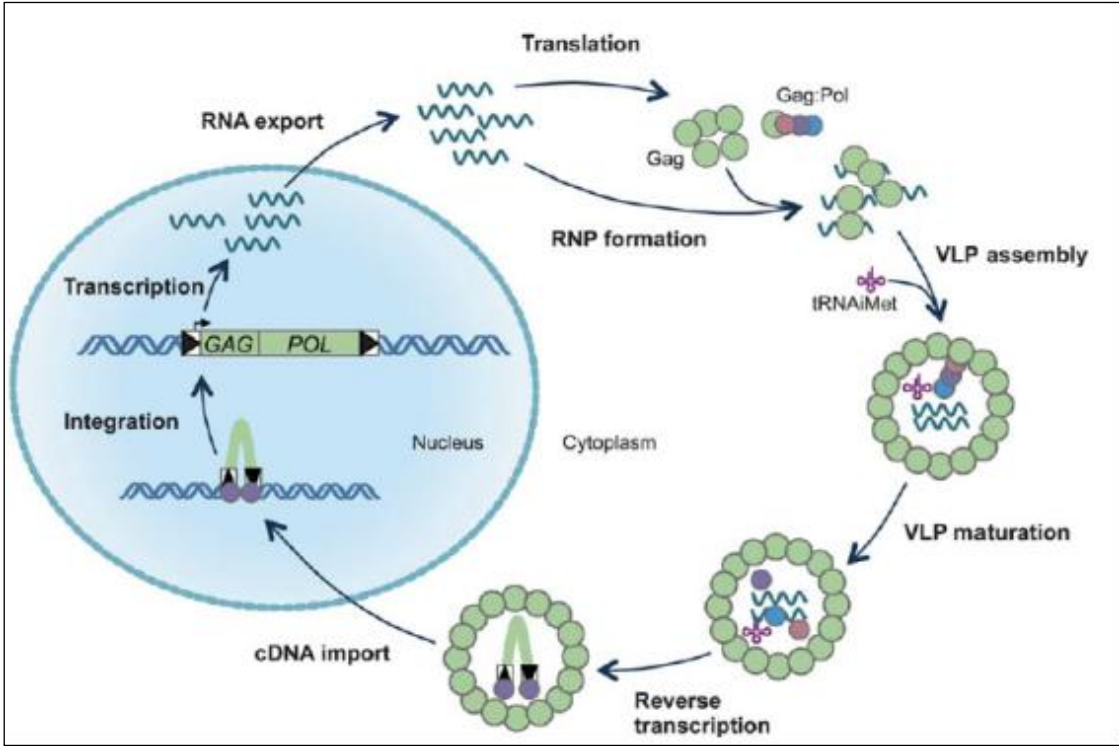
Translasyonel frameshift (PRF), ya da ribozomal çerçeve kayması; 2 çakışan açık okuma çerçevesi tarafından şifrelenen proteinleri oluşturmak için alternatif bir translasyon kontrol mekanizmasıdır (Farabaugh 1996, Dinman 2012). Aynı mRNA üzerinden, iki ya da daha çok proteinin farklı oranlarda sentezi sağlanır. PRF'in frekansı virüs türüne göre değişmektedir. Bu oran Ty1 ve Ty2'de ortalama %25 kadardır. Diğer bir ifade ile TYA sentezi için 5' AUG'den başlayan translayon bu kodlama bölgesinin sonundaki stop kodonunda sonlanmaktadır. Yalnız translasyona devam eden ribozomların belirli kısmı (yaklaşık 100 ribozomdan 25'i) TYA'nın stop kodonuna erişmeden önce yaklaşık 10 baz uzunluktaki bölgede +1 nükleotid 3' yönde kayarak okuma çerçevesini değiştirmektedir. Bu durumda okuma çerçevesini değiştiren ribozomlar TYB içinde translasyona devam ederek TYA-TYB polipeptidinin translasyonunu gerçekleştirmektedir. Böylece Ty mRNA'sından TYA (GAG) ve TYA-TYB (GAG-POL) füzyonu olarak iki farklı polipeptid sentezlenmiş olur. Bu polipeptidler daha sonra proteolitik olarak kesilerek VLP oluşturmaktadır.

PRF'in moleküler mekanizması Ty1 ve Ty2'de ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Ty1'de mRNA'da TYA ve TYB polipeptidlerinin çakıştığı bölgede (PRF site) bulunan kodonların PRF için yeterli olduğu gösterilmiştir. Bu bölgede TYA'nın stop kodonundan önceki kodonu tanıyan tRNA'nın sitoplazmik konsantrasyonunun çok düşük olduğu, mRNA'da translasyon yapan ribozomun bu bölgeye eriştiğinde kodon antikodon etkileşimi çok yavaş olduğundan durduğu (ribosomal pause) ve bu duraklama esnasında her 100 ribozomdan 25-30 tanesinin mRNA'da 1 nükleotid kayarak translasyona devam ettiği gösterilmiştir (Belcourt ve Farabaugh 1990). Ty3'de ise ribozomal frameshiftin mekanistik olarak Ty1'den farklı olduğu bulunmuştur. Ty3 mRNA'sında TYA ve TYB kesişim bölgesinde yine bir ribozomal duraklama olduğu ve bu duraklama sonucu bu kez tRNA'nın +1 nükleotid atlayıp yeni kodona bağlandığı gösterilmiştir (Farabaugh ve ark. 1993). Ty3'de PRF bölgesinin kodon sıralaması Şekil 2.4'te verilmiştir.

TY3A	Ala – Ser - Ser- Asn- Arg – Leu - Stop GCG AGU UCU AAC CGU UCU <u>UGA</u>
TY3A-TY3A..	GCG A GUU CUA ACC GUU CUU GAx Ala — Val - Leu- Thr - Asp – Leu - xxxx

Şekil 2.4. Ty3’de PRF bölgesindeki kodon sıralaması.

Ty elementlerinde translasyon sonrası proteolitik kesim sonucu oluşan kısa polipeptidler birbiri ile etkileşerek olgun virüs benzeri parçacıkları oluştururlar. Bu parçacık oluşumu sırasında ise Ty mRNA’larından 2 adet ve bir adet met-tRNA bu kapsid içine diğer enzimler ile birlikte paketlenmektedir. tRNA molekülü kapsid içindeki revers transkriptaz için primer görevi görmektedir ve Ty mRNAsında primer bağlanma bölgesi olarak da bilinen sekansa bağlanır. Kapsid içinde revers transkriptaz Ty mRNA’sından Ty cDNA’sı sentez eder. Daha sonra bu Ty cDNA’sı *S. cerevisiae* nükleer por komplekslerinden geçerek *S. cerevisiae* kromozomlarından birisine rastgele olmayan şekilde integre olur. Bu şekilde Ty virüslerinin hücre içinde replikasyon döngüleri tamamlanmış olur (Curcio ve ark. 2015) (Şekil 2.5). Bu özellikleri kısmen insan retrovirüslerine benzer. Fakat retrovirüslerden farklı olarak Ty genomlarında zarf proteini (Env: Envelop) olmadığı için *S. cerevisiae* hücrelerinden hücre dışına salınamaz. Yalnız bu da Ty virüslerinin maya genomlarında dağılımı için bir engel teşkil etmez. Maya populasyonunda mayalar haploid – diploid döngüsüne uğradıkları için populasyon içinde dağılımları mayada mating/eşleşme ile dağılım gösterir (Curcio ve ark. 2015, Sandmeyer ve ark. 2015). Ty1 cDNA’larının maya kromozomlarında daha çok heterokromatin bölgelere integre olduğu da gösterilmiştir. Ty3 cDNA’larının ise daha çok tRNA kodlanan genom bölgelerine integre olduğu gösterilmiştir (Curcio ve ark. 2015, Sandmeyer ve ark. 2015). Bu integrasyon işleminde de Ty integraz peptidinin heterokromatin bölgesindeki faktörler ile etkileştiği bilinmektedir.



Şekil 2.5. *S. cerevisiae*'da Ty1 replikasyon döngüsü (Curcio ve ark. 2015).

2.5. *Saccharomyces cerevisiae*'de Azot Sinyal İletim Yolu ve Bileşenleri

Azot, hücredeki temel makromoleküllerin yapısında bulunur ve bütün yaşam formları için gerekli bir elementtir. *S. cerevisiae*'da da diğer canlılarda olduğu gibi azotun hücre dışı kaynaklardan alınması ve hücre içinde kullanılması hem biyokimyasal ve hem de genetik faktörlerin kontrolü altındadır (Magasanik ve Kaiser 2002, Zhang ve ark. 2018). *S. Cerevisiae*, azot fikse eden bir mikroorganizma olmadığı için azot ihtiyacını hücre dışında bulunan ve azot içeren bileşiklerden sağlamaktadır. Azot kaynağı olarak çeşitli amino asitleri, üre, allantoin gibi yaklaşık 30 farklı azotlu bileşiği metabolize ederek azot kaynağı olarak kullanabilir. Bu azotlu bileşiklerin *S. cerevisiae* üreme hızına veya bölünme süresine etkileri de tayin edilmiştir (Godard ve ark. 2017). Azot kaynaklarının kullanım etkinliklerinin *S. cerevisiae* suşuna göre değişiklik gösterdiği de bilinmektedir. Şekil 2.6'da *S. cerevisiae* sigma 1278b suşunda farklı azot kaynaklarının üreme sürelerine etkileri verilmiştir (Godard ve ark. 2017).

Amonyum genellikle *S. cerevisiae* için en kolay asimile edilebilen azot kaynağı olarak tercih edilir ve zengin azot kaynağı olarak bilinir. Allantoin ve üre gibi bileşikler ise zayıf azot kaynağı olarak bilinmektedir. Bunun biyokimyasal nedeni ise hücre içine alınan amonyum tek reaksiyon ile glutamik asite bağlanıp azot deposu gibi kullanılan glutamine dönüştürülürken, allantoin, üre ve diğer zayıf azot kaynaklarının glutamik asite direk olarak bağlanamamalarıdır. (Şekil 2.6)

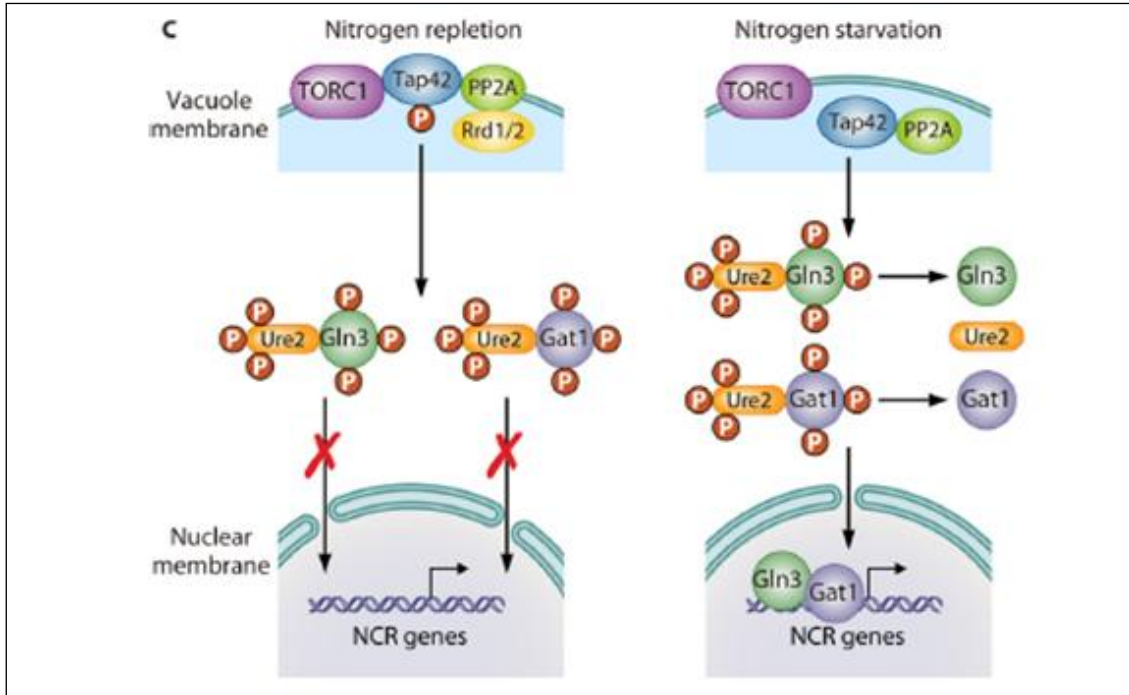
Alanine (10)	2, 30
Ammonium [(NH ₄ ⁺) ₂ SO ₄] (10)	2, 00
Arginine (10).....	2, 25
Asparagine (10)	2, 00
Aspartate (10).....	2, 10
Citrulline (10)	4, 30
γ-Aminobutyric acid (10)	2, 35
Glutamine (10)	2, 05
Glutamate (10).....	2, 15
Isoleucine (10)	3, 55
Leucine (10).....	3, 25
Methionine (10).....	4, 05
Ornithine (10).....	4, 30
Phenylalanine (10).....	3, 20
Proline (10)	3, 15
Serine (10).....	2, 15
Threonine (10).....	4, 20
Tryptophan (5).....	4, 45
Tyrosine (10).....	4, 10
Urea (10).....	3, 35
Valine (10)	3, 00

Şekil 2.6. Farklı azot kaynaklarının *S. cerevisiae* 'da bölünme süresine etkileri. Parantez içindeki rakamlar ilgili azotlu bileşiğin mM olarak konsantrasyonunu göstermektedir (Godard ve ark. 2007).

Azot kaynağının kontrol mekanizması genel olarak Nitrogen Catabolite Repression (NCR) olarak bilinen mekanizma ile kontrol edilir. Azot kaynağına göre azot kullanımı için ana düzenleyici faktörler TOR kinaz ve GATAA faktörleri olarak bilinen transkripsiyon faktörleridir. TOR kinaz, azot kaynağının kalitesine göre GATAA faktörlerinin nükleo-sitoplazmik lokasyonunu kontrol eder. GATAA faktörleri ise azot kaynağının durumuna göre hedef genleri baskılayan veya aktive eden transkripsiyon faktörlerinin genel adıdır. GATAA

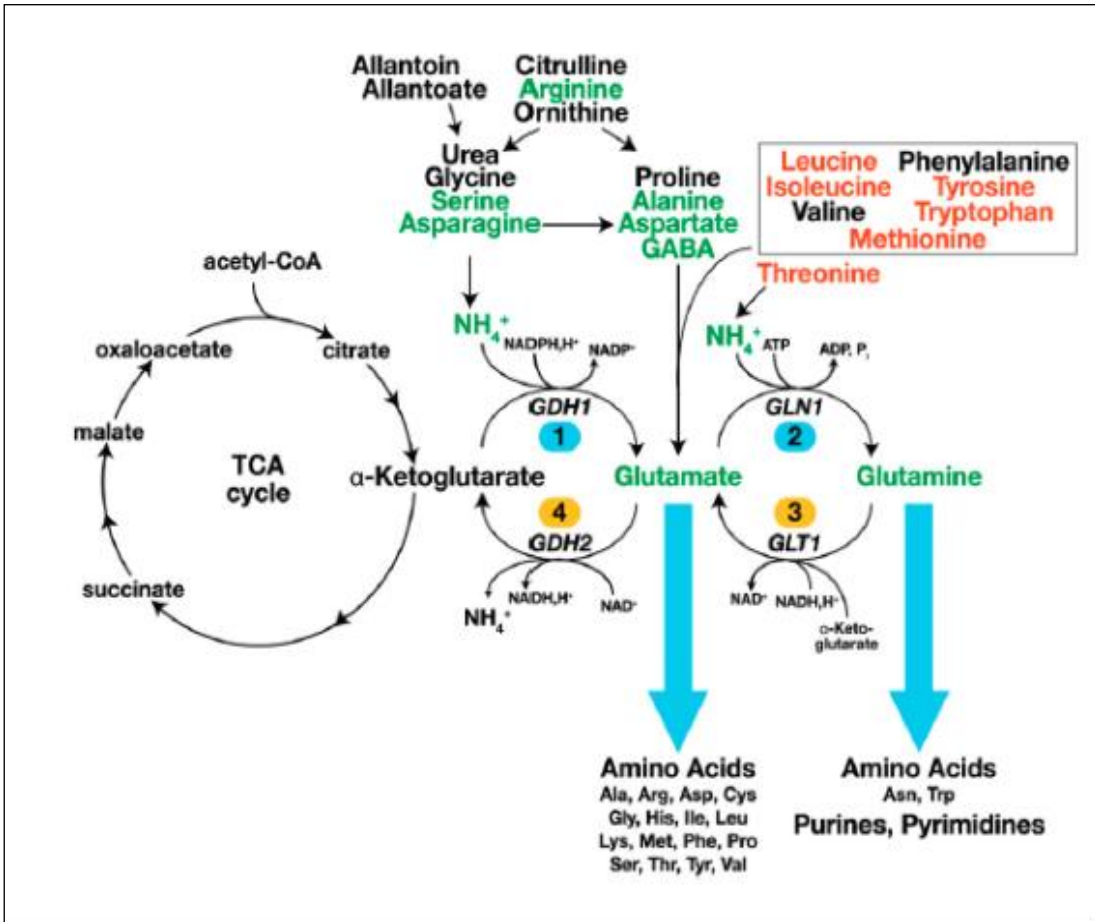
faktörleri hedef genlerin promotor dizilerinde 5'-GATAA-3' sekansına spesifik olarak bağlanma özelliği olan faktörlerdir (Ko ve Engel 1993). Bu faktörlerden Gln3 ve Gat1 aktivatör, Gzf3 ve Dal80 ise represör olarak işlevi olan transkripsiyon faktörleridir (Zhang ve ark. 2018).

Üreme ortamında tercih edilen azot kaynağı bulunduğunda (amonyum ve glutamin gibi) Gln3 ve Gat1 faktörleri TOR kinaz tarafından fosforlanarak sitoplazmada tutulurlar. Bu faktörler aynı zamanda sitoplazmada Ure2 olarak bilinen faktör ile de kompleks oluşturular (Şekil 2.7). Üreme ortamında azot eksikliği meydana geldiğinde veya üre, allantoin, ya da amino asitler azot kaynağı olarak bulunduğunda TOR kinazın aktivitesi de inhibe edilir ve Gln3 ile Gat1 defosforile edilerek nükleusa taşınır. Nükleusta ise alternatif azot kaynaklarının hücre içine taşınımı ve kullanımı için gerekli genleri aktive ederler. Gzf3 ise zengin azot kaynağı olduğunda Gat1 transkripsiyonunu baskılayan represördür. GATAA faktörlerinin birbiri ile etkileşimi oldukça komplekstir (Zhang ve ark. 2018).



Şekil 2.7. TOR kompleksinin azot sinyal yolundaki işlevi (Zhang ve ark. 2018).

Şekil 2.8’de azot metabolizmasının ana yolları şematik diyagramı verilmiştir. Yeşil ile gösterilenler tercih edilen azot kullanım yollarını, turuncu ile gösterilenler ise tercih edilmeyenleri göstermektedir. Glikozlu ortamda büyütülen hücrelerde amonyum iki yolak ile asimile edilmektedir. NADPH’ye bağlı glutamat dehidrogenaz (GDH1) tarafından katalizlenen glutamat sentezinde amonyum ve ketoglutarattan glutamat sentezlenmektedir. Diğer yolak olarak da glutamin sentetaz (GLN1) ile amonyum ve glutamattan, glutamin sentezlenmektedir (Ljungdahl ve Daignan-Fornier 2012) Glutamat ve glutamin, biyosentez reaksiyonlarının iki ana azot donörüdür. Amonyum, glutamat ve glutamin, azot metabolizmasının merkezini oluşturan spesifik enzim sistemleri ile birbirine bağlanır (Godard ve ark. 2007, Zhang ve ark. 2018)



Şekil 2.8. Azot metabolizmasının ana yolları (Ljungdahl ve Daignan-Fornier 2012).

TOR kompleksi 2 (TORC2), hücre döngüsü ilerlemesi, hücre duvarı bütünlüğü ve reseptör endositozu sırasında aktin hücre iskeleti polarizasyonunun düzenlenmesinde rol oynar. TOR2 iki temel sinyal fonksiyonuna sahiptir. İlk fonksiyon TOR1 ile ortak ve beslenmeye yanıt olarak translasyonun başlatılması ve erken G1 ilerlemesinin aktivasyonu için gereklidir. İkinci temel fonksiyon ise TOR2'ye özgüdür ve aktin hücre iskeletinin hücre döngüsüne bağlı polarizasyonuna aracılık eder (Crespo ve Hall 2002).

TOR'un, azot kaynağı, amino asitler, ATP, fosfatidik asit ve stres dahil olmak üzere çok çeşitli uyarıcılara cevap olarak bir dizi farklı efektör yolunu aktive ettiği bilinmektedir (Crespo ve Hall 2002).

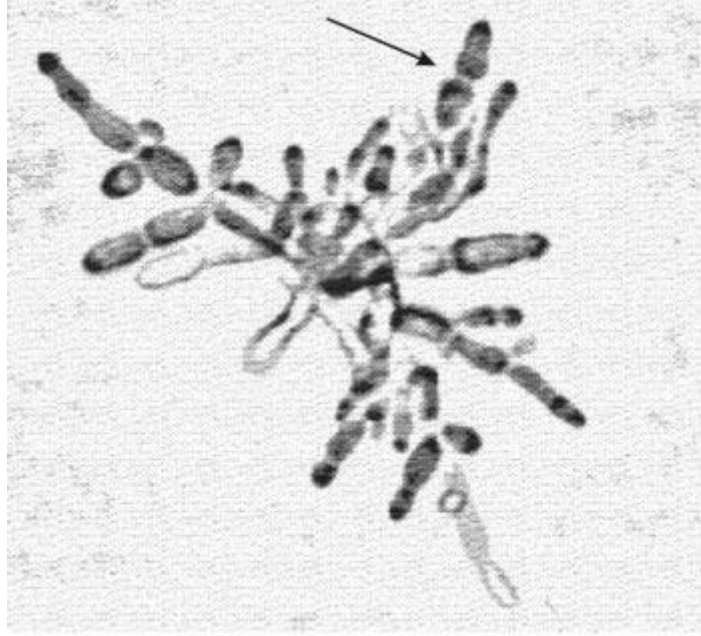
Besin açlığı ve çevresel stres, hücre büyümesinin kontrolü ve hayatta kalma açısından önemli olan metabolik tepkileri teşvik eder. Korunmuş TOR (rapamisin hedefi) Ser / Thr kinazları, besin açısından zengin koşullar altında aktive edilir ve otofajinin indüklenmesine yol açan açlıkta inhibe edilir. Aminoasit açlığı ya da Rapamisin tedavisi ile TOR inaktive olur ve bozunmayı sağlayan permeaz, vakuole verilir (Dobzinski ve ark. 2015). Amino asit açlığı sonucu TOR inaktive olur ve golgi proteinlerini mayadaki bozunma için vakuole vermeye teşvik eder (Dobzinski ve ark. 2015).

2.6. *Saccharomyces cerevisiae*'de Psödohifsel Gelişmenin Genetiği Ve Biyolojisi

S. cerevisiae hücreleri, beslenme ortamlarındaki azot açlığı karşısında Ras2 proteininin algısıyla psödohif denen bir yapı geliştirir. Bu durumda mitoz bölünme sonucu oluşan yavru hücre ana hücreden ayrılmaz ve bölünen hücreler birbirine bağlı kalır. Bu yapı küflerin oluşturduğu sinsizyum yapısından farklıdır. Hücreler arasında hücre duvarı yapısı korunur (Lo ve Dranginis 1998). Normal hif yapısından farklı olarak psödohiflerde hücreler arası bağlantılar vardır ama sitoplazmalar kaynaşmaz.

Psödohif oluşumu ilk kez *S. cerevisiae* sigma suşunda keşfedilmiştir (Gimeno ve ark. 1992). Bu suшта yapılan transkriptom analizinde psödohif gelişiminde 691 genin işlevi olduğu bulunmuştur (Ryan ve ark. 2012). Psödohif oluşumunda sensör olan faktör, membranda yer alan Ras2'dir. Ras2 sinyal yolağının aktivasyonu sonucu yukarıda da verildiği şekilde 691

genin transkripsiyonu yeniden programlanarak psödohif yapısı oluşur. Psödohif oluşumunda gerekli olan transkripsiyon faktörü Tec1'dir. Bu transkripsiyon faktörü psödohif oluşumu için gerekli olan Flo11'in transkripsiyonunu aktive eder.



Şekil 2.9. *S.cerevisiae*'de psödohifsel gelişim (Ceccato-Antonini ve Sudbery 2004)

Flo11 psödohifsel üreme, flokulasyon (kümelenme) ve biyofilm oluşumu için maya hücrelerinde gerekli olan bir hücre yüzey glikoproteinidir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Araştırmada Kullanılan Maya Suşları ve Üreme Koşulları

Tez çalışmasında kullanılan maya suşlarının kaynakları ve özellikleri çizelge 3.1’de verilmiştir. Bu araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşları, diğer araştırmacıların maya koleksiyonlarından sağlandı. YST101 laboratuvar kodu ile verilen *S. cerevisiae* suşunda azot sinyal iletim yolu ile ilgili hiçbir mutasyon bulunmamaktadır. Bu maya suşu Prof. Dr. P.J. Farabaugh’dan sağlandı (University of Maryland Baltimore County, Maryland, ABD). YST182 ve YST184 kodlu *S. cerevisiae* suşları ise Prof. Dr. Evelyne Dubois’dan sağlandı (Laboratoire de Microbiologie, Université Libre de Bruxelles, Brüksel, Belçika). YST182 kodlu *S. cerevisiae* suşunda azot metabolizması ile ilgili herhangi bir mutasyon bulunmazken, bu suşa izogenik olan YST184 suşunda ise azot sinyal yolağına bağlı olarak hedef genlerin aktivasyonunu sağlayan transkripsiyon faktörleri Gln3 ve Gat1 delesyonla genomdan çıkarılmıştır. YST246 nolu *S. cerevisiae* suşu ise Prof. Dr. Maria E. Cardenas’dan sağlandı (Department of Molecular Genetics and Microbiology, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, ABD). Bu maya suşunun genomunda bulunan ras2 mutasyonu dolayısıyla psödohifsel üremeye yatkın olduğu bilinmektedir (Zurita-Martinez ve Cardenas 2005).

Yukarıda verilen araştırma laboratuvarlarından sağlanan *S.cerevisiae* örnekleri, ayrı ayrı YPD (Yeast Extract, Peptone, Dextrose) petrilere çizgi ekimi yapılarak standart inkübasyon şartlarında yeniden üretilmek üzere 30 °C’de, 48 saat inkübatörde üremeye bırakıldı. Üretilen maya örneklerinden steril kürdan ile bir miktar alınarak uzun süreli stoklar için 1 ml %20’lik gliserol içeren mikrofuj tüplerinde süspanse edildikten sonra –80 °C’de derin dondurucuda depo edildi. Maya kültürleri araştırmalar esnasında sıvı kültür başlatmak amacıyla +4 °C’de buzdolabında muhafaza edildi. İhtiyaç olduğunda tekrar –80 °C’de depolanan stoklardan YPD petrilere tekrar taze kültürler hazırlandı. *S. cerevisiae* suşlarının üretilmesinde kullanılan besiyeri içerikleri ve bu besiyerlerinin hazırlanması Ek 1’de verildi.

YPD besiyeri seçici olmayan tam besiyeri olarak *S. cerevisiae* suşlarının transformasyon öncesi üretilmesinde kullanıldı. Transformantlar ise seçici besiyeri olarak kullanılan urasil

içermeyen minimal tam besiyerinde (YNB-Ura+%2 glukoz) üretildi (Rose ve ark. 1990). YST182 ve YST184 suşlarının minimal besiyerinde üremeleri için okzotrofik gereksinimleri oldukları aminoasitler (histidin, lösin, lizin, metionin, triptofan ve adenin) katı ve sıvı besiyerine ilave edildi (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. Maya suşlarının katı besiyerinde yani petrilere üretilmeleri için ise ekim yapılan petrilere 28-30 °C’de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Üreme süreleri, kullanılan besiyerine göre değişiklik göstermektedir.

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

ST Lab Kodu	Genotipi ve ilgili mutasyonlar	Kaynak
YST101	MAT α , ura3-52.	P.J. Farabaugh
YST182	MAT α , ade2 Δ ::hisG, his3 Δ 200, leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, met15 Δ 0, trp1 Δ 63, ura3 Δ 0.	E. Dubois
YST184	MAT α , ade2 Δ ::hisG, his3 Δ 200, leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, met15 Δ 0, trp1 Δ 63, ura3 Δ 0, gln3::KanMX4, gat1::KanMX4	E. Dubois
YST246	MAT a, ura3-52.	M.E. Cardenas

3.2. Ty-LacZ Ekspresyon Vektörünün Özellikleri ve Transformasyonu

Azot sinyal iletim yolunun Ty1 ve Ty2 elementlerinde gen ifadesine etkilerini incelemek için Ty1-LacZ ve Ty2-LacZ gen füzyonları kullanıldı. LacZ geni kantitatif yöntemle hızlı bir şekilde gen ifadesinin analizinde raporör gen olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır (Guarente 1983). Hem Ty1-lacZ ve hem de Ty2-lacZ gen füzyonları *S. cerevisiae* hücrelerinde seçici minimal besiyeri ortamında stabil bir şekilde replike olduğu bilinen 2 mikron-URA3 plazmitine daha önce yapılan çalışmalar ile klonlanmıştır. Ty1-lacZ ve Ty2-lacZ ekspresyon vektörlerinin sağlandığı kaynaklar ve yapıları aşağıda verildiği şekildedir.

Ty1-lacZ gen füzyonunda, Ty1 elementinin ilk 1500 baz çifti (bç) uzunluğundaki bölümü bulunmaktadır. Bu bölüm Ty1 delta sekansı ve kodlama bölgesinin bir bölümünü içermekte olup Ty1'in transkripsiyonel kontrolü için gerekli olan bütün elementleri içerdiği daha önce gösterilmiştir (Morillion ve ark. 2002). Ty1-lacZ ekspresyon plazmidi P. Lesage'dan (UPR 9073 du CNRS, Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris, Fransa) sağlandı. Ty1-lacZ gen füzyonunun ilgili plazmite klonlama işlemleri verilen kaynakta açıklanmaktadır (Morillion ve ark. 2002).

Ty2-lacZ gen füzyonunda ise Ty2 elementinin ilk 750 baz çifti uzunluğundaki bölümü bulunmaktadır. Bu bölüm Ty2'nin delta sekansını ve kodlama bölgesinin bir bölümünü içermektedir. Ty2'de de transkripsiyonel kontrol için verilen bu 750 bç'lik bölümün yeterli olduğu daha önce yapılan çalışmalarda teyit edilmiştir. Ty2-lacZ ekspresyon vektörü de 2 mikron-URA3 plazmiti üzerine klonlanmıştır. Ty2-lacZ vektörü P.J. Farabaugh tarafından sağlanmıştır ve daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda da kullanılmıştır (Farabaugh ve ark. 1993). Ty2-lacZ ekspresyon vektörünün yapısı ve klonlama işlemleri de verilen kaynakta açıklanmaktadır (Farabaugh ve ark. 1989). Ty1-lacZ ve Ty2 lacZ ekspresyon plazmitleri çoğaltımı için *E. coli* DH5 α hücrelerine CaCl₂-MgCl₂ metodu kullanılarak transformasyonu yapıldı. Bakteri transformantları LB-ampicillin besiyerinde üretildi (Ek-1). *E. coli*'den plazmit saflaştırma işlemi ise ticari plazmit saflaştırma kiti kullanılarak üretici firma tarafından açıklandığı şekilde yapıldı. Saflaştırılan plazmitler -20 °C'de buzdolabında depo edildi.

Ty1-lacZ ve Ty2-lacZ ekspresyon plazmitleri araştırmada kullanılan maya suşlarına lityum asetat-polietilen glikol yöntemi ile transforme edildi. Bu yöntem kaynakçada verilen referansa göre ve aşağıda özetlendiği şekilde uygulandı (Rose ve ark. 1990).

Transformasyon için *S. cerevisiae* suşları önce +4 °C'deki katı besin ortamından alınarak 5 ml'lik YPD sıvı besi ortamında 30 °C'de bir gece (16- 18 saat), çalkalamalı inkübatörde üretilerek durağan fazda olan ön kültür elde edildi. Ertesi gün, bu ön kültürler kullanılarak başlangıç OD₆₀₀ değeri 0.2 olacak şekilde, 20 ml'lik YPD besiyerine ekim yapıldı. Maya suşlarının standart koşullarda logaritmik aşamaya (yaklaşık OD₆₀₀= 1-1.5) kadar üremeleri sağlandı. Üreme periyodu sonunda maya kültürleri ayrı ayrı santrifüjde 1600 rpm'de

çöktürölüp 25 ml steril saf suda yıkandı ve tekrar aynı hızda çöktürölüdü. Maya peletleri verilen kaynakta açıklarığı şekilde 0.1 M lityum asetat çözeltilinde süspanse edildi. Bu süspanسیونlardan taze mikrofúj tüplerine 50 µl alınarak tekrar çöktürölüdü. Elde edilen maya hücrelerine aşarığı verilen sıra ile ilgili maddeler ilave edildi.

240 µl PEG (%50'lik stoktan)

36 µl 1 M LiAOc (taze stok)

6 µl denatüre Herring sperm DNA'sı

4-5 µl (1-2 µg) plazmid DNA'sı

64 µl dsH2O

Toplam hacim 350 µl olacak şekilde su eklendi. Karışım vortekslenip 30 °C'lik etüvde 30 dk bekletildi. Bu esnada ısınmaları için petri kapları da etüve konuldu. 30 dk sonra transformantlar, 30 dk'da 42 °C'lik sıcak su banyosunda bekletildi. Bekleme süresinin sonunda mikrofúj tüplerindeki transformasyon karışımı 12500 rpm'de 1 dk santrifúj yapıldı. Süpernatant atılıp pelete 500 µl steril saf su eklendi. Pelet pipetaj ile nazikçe süspanse edildi. Bu transformasyon karışımından 100 µl alınarak seçici besiyeri petrilere yayma ekimi yapıldı.

YST101 ve YST246 *S. cerevisia* suşlarında urasil dışında herhangi bir okzotrofik mutasyon olmadığından bu suşların transformantları YNB-Ura +%2 glukoz petrilere ekim yapıldı. YST182 ve YST184 suşları ise çeşitli aminoasitler için okzotrofik olduğundan gerekli aminoasitler ilave edilmiş YNB-Ura+%2 glukoz petrilere ekim yapıldı. Ekim yapılan petrilere 30 °C'lik etüvde maya transformantı kolonilerden iri koloni oluşturuncaya kadar (3-4 gün) inkübe edildi. Maya transformantları büyük koloni oluşturduktan sonra bu kolonilerden birkaç adeti steril kürdan ile alınarak tekrar YNB-Ura petrilere 0.5-1 cm² kadar büyüklükte pasajlar yapıldı. Pasaj yapılan transformantlar tekrar 30 °C'de inkübatörde 3-4 gün üremeye bırakıldı. Bu pasajlar Ty1 ve Ty2 ekspresyon vektörlerinden yapılan transkripsiyonu kantitatif olarak β-Galaktozidaz aktivitesi tayini ile ölçmek üzere sıvı kültürlerle ekim yapmak için kullanıldı.

3.3. *Saccharomyces cerevisiae* Transformantlarının Üretilmesi

Yukarıda açıklandığı şekilde elde edilen Ty1 ve Ty2 transformantlarından steril kürdan ile az miktarda alınarak 25 ml'lik erlen de bulunan 5 ml'lik YNB-Ura+%2 (veya YST182 ve YST184 transformantları için amino asit eklenmiş YNB besiyerine) sıvı kültürler ekim yapıldı ve standart şartlarda 16-18 saat üretilerek durağan fazda olan ön kültürler elde edildi. Bu ön kültürler kullanılarak tekrar 5 ml'lik YNB-Ura+%2 besiyerlerine başlangıç hücre yoğunluğu $OD_{600}=0.2$ olacak şekilde ekim yapıldı. Sıvı kültürler aynı şartlarda logaritmik aşamaya kadar üretildi. Üreme periyodu sonunda maya kültürleri santrifüjde 1600 rpm'de 5 dk çöktürülerek peletler elde edildi. Bu peletler 1 ml steril saf su ile süspansiyon edilerek bu kez mikrofüj tüplerine aktarıldı ve tekrar çöktürüldü. Bu kez elde edilen maya peletleri 200 ml maya lizis tampon çözeltisinde (lizis buffer) süspansiyon edildi. Maya örnekleri β -galaktozidaz aktiviteleri ölçülene kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de depo edildi. Bu Ty1 ve Ty2 transformantlardan yapılan transkript miktarları aşağıda verildiği şekilde β -galaktozidaz aktivitesi tayini ile belirlendi.

Farklı azot kaynaklarının Ty1 ve Ty2'de transkripsiyona etkilerini incelemek için üreme ortamına ilgili tablolarda verilen azot kaynakları (amonyum, glutamin, prolin, triptofan, lösin) verilen miktarlarda sıvı besiyerine azot kaynağı olarak ilave edildi. Psödohisel üremenin Ty transkripsiyonuna etkilerini incelemek için ise YST246 (s1278b) suşu transformantları önce logaritmik aşamaya kadar YNB+52 glukoz ortamında üretildi. Logaritmik aşamaya gelen sıvı kültürler steril saf su ile 2 kez yıkandı ve eşit hacimde SLAD (Synthetic Low Amonium Dextrose) ortamında süspansiyon edilerek standart oşullarda SLAD ortamında 12 saat üretildi.

Azot sinyal iletim yolağının ana kontrol protein kinaz elemanlarından birisi TOR'dur (Target of Ramaycin). TOR aktivitesi azot açlığı ile durdurulabildiği gibi rapamisin veya belirli miktarlarda kafein ile de inhibe edilebilmektedir. Ty elementlerine TOR kinazın aktivitesini tayin edebilmek için üreme ortamına verilen konsantrasyonlarda kafein ilave edilmiştir.

Maya transformantları 3'erli olarak üretildi ve en az bir kez aynı şartlarda tekrarlandı.

3.4. Beta-Galaktozidaz Aktivitelerinin Tayini

Yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanan transformantlar β -galaktozidaz aktivite tayini için -80°C 'den alınarak oda sıcaklığına kadar çözümleri beklendi. Çözülen maya süspansiyonlarına maya hücrelerini permeabilize etmek için $20\ \mu\text{l}$ $0.1\ \text{M}$ SDS ve $20\ \mu\text{l}$ saf kloroform eklendi ve karışım hızlıca en son hızda $1\ \text{dk}$ vortekslendi. Bu şekilde permeabilize edilmiş maya lizatları elde edildi.

Her transformant suş için üçlü olarak deney tüpleri hazırlandı ve deney tüplerine $980\ \mu\text{l}$ beta-galaktozidaz enzimi tayini için tampon çözelti (kısaca Z Buffer olarak adlandırılmakta) eklendi. Mikrofüj tüplerindeki maya lizatları tekrar vortekslenerek, orta kısımlardan $20\ \mu\text{l}$ alınıp Z buffer içeren deney tüplerine pipetajlama yapılarak eklendi. Deney tüpleri 30°C 'lik su banyosunda deney sıcaklığının optimum dereceye ulaşması için $2\ \text{dk}$ ön inkübasyona tabi tutuldu. Daha sonra enzimatik aktivite tayin tüplerine β -galaktozidaz enzimi substratı olan önceden hazırlanmış ONPG çözeltisinden $200\ \mu\text{l}$ ilave edildi, hafifçe karıştırılarak tekrar 30°C 'deki su banyosunda inkübasyona bırakıldı ve reaksiyon zamanını da tayin etmek için kronometre başlatıldı. Reaksiyon tüplerinde enzimatik aktivite sonucu belirli tonda sarı renk (açık limon sarısı rengi) oluştuğu görüldüğünde geçen süre dakika cinsinden kayıt edildi ve enzimatik reaksiyon tüplerine $500\ \mu\text{l}$ Na_2CO_3 (Sodyum karbonat) ilave edilerek durduruldu. İşlem bittikten sonra β -galaktozidaz tüpleri santrifüjde $1600\ \text{rpm}$ 'de $5\ \text{dk}$ çöktürüldü, sıvı kısım spektrofotometre küvetine aktarıldı ve spektrofotometrede $420\ \text{nm}$ 'de absorbans değerleri ölçülerek kayıt altına alındı.

LacZ gen füzyonu kullanılarak yapılan gen ifadesinin kantitatif tayinlerinde ölçülen aktivitenin normalizasyonu genellikle transformantların hücre yoğunluğuna (OD_{600} değerlerine) veya lizatların protein konsantrasyonuna göre yapılmaktadır. Bizim deneylerimizde elde edilen β -galaktozidaz aktiviteleri, lizatlarda bulunan toplam çözüner protein konsantrasyonuna göre normalize edildi. Transformant lizatlarındaki çözüner protein konsantrasyonu ise kısaca aşağıda verildiği şekilde Lowry yöntemi ile tayin edildi (Lowry ve ark. 1951).

Lowry yöntemi ile çözümlü protein tayini için deney tüplerine 180 µl steril ve yukarıda β-galaktozidaz aktivite tayininde kullanılan maya lizatlarından 20 µl ilave edilerek kısaca vorteksledi. Bu lizat karışımına taze olarak hazırlanmış Lowry-C çözeltisinden 1 ml ilave edildi ve 10 dk oda sıcaklığında beklendi. Süre sonunda bu kez 1N Folin çözeltisinden 100 µl alınarak aynı tüplere ilave edildi ve hızlıca vorteksledi. Daha sonra bu karışım oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi ve süre sonunda deney tüpleri lizat artıklarını çöktürmek için 1600 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Elde edilen çözelti peleti karıştırmadan spektrofotometre tüplerine aktarıldı ve dalga boyu OD₇₅₀ de absorbans değerleri tayin edilerek kayıt edildi.

Ty1 ve Ty2 transformantlarından elde edilen lizatlarda tayin edilen β-galaktozidaz aktiviteleri ve çözümlü protein konsantrasyonları Ek-2'de verilen eşitliğe göre değerlendirilerek Ty1 ve Ty2 gen füzyonlarından yapılan transkript miktarları hesap edildi. Deneyler üç tekrarlı yapıldı ve en az bir kez tekrarlandı. Bulgular bölümünde verilen herbir aktivite değeri en az 6-9 deneyin ortalamasıdır. Elde edilen aktivitelerin standart sapma değerleri genellikle %1-15 aralığında olup β-galaktozidaz aktivite tayinleri için kabul edilebilir standart sapma değeridir.

4- BULGULAR

4.1. Ty1 ve Ty2 Promotorlarında GATA Faktörü Sekanslarının İncelenmesi

Ty1 ve Ty2 elementlerinin genom dizileri uzun süre önce belirlenmiş ve yayınlanmış olup, ayrıca Saccharomyces Genome Database'den (SGD) de erişim bulunmaktadır. Ty1 ve Ty2'nin sekanslarındaki farklılıklar da çeşitli derlemelerde ayrıntılı olarak verilmiştir (Kim ve ark. 1998).

Azot sinyal iletimine yanıt olarak maya genomunda ilgili gen aktivitelerini kontrol eden transkripsiyon faktörlerinin 5'-GATAA-3' sekansına bağlandıkları uzun süre önce deneysel olarak gösterilmiştir (Ko ve Engel 1993, Zhang ve ark. 2018). Bu sekansa bağlanan transkripsiyon faktörleri genel olarak GATAA faktörleri olarak bilinmektedir. Bu faktörlerden bazıları hedef genlerde aktivatör olarak işlev görürken (Gln3/Gat1 gibi) bazıları da represör olarak işlev görmektedir (Zhang ve ark. 2018). Araştırmamızda ilk önce Ty1 ve Ty2'nin promotor bölgelerinde GATAA faktörlerinin bağlanabileceği dizilerin olup olmadığı araştırıldı. Ty1 ve Ty2'nin Ty1-lacZ ve Ty2-lacZ gen füzyonlarında bulunan promotor bölgeleri SGD'den alınarak GATAA faktörleri için potansiyel bağlanma dizilerinin promotor üzerindeki yerleri ve sayıları incelendi. Ty1 ve Ty2 promotorlarında GATAA faktörlerinin bağlanabileceği sekans analizinde hem Ty1 ve hem de Ty2'de GATAA faktörlerinin bağlandığı çok sayıda GATAA konsensüs dizisi bulunduğu görüldü. Ty2'nin transkripsiyonel kontrolünde yer alan ilk 750 bç'lik bölgesinde 5 adet GATAA faktörü bağlanma dizisi olduğu görülmektedir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Lakin bu GATAA dizilerinden 3 tanesinin Ty2 DNA'sında Crick zincirinde yer aldığı da dikkat çekmektedir. GATAA faktörlerinin bağlanma özelliği olarak 5 potansiyel GATAA faktörü bağlanma dizisinin 4 tanesinin Ty2'de transkribe edilen bölgede yer aldığı da dikkat çekmektedir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).

Ty1 elementinin transkripsiyonel kontrol bölgesinde de potansiyel GATA faktörü bağlanma sekanslarının varlığı da incelendi (Şekil 4.2). Yapılan sekans analizinde Ty1 elementinde 6 adet potansiyel GATAA faktörü bağlanma dizisi olduğu görüldü. Bu bağlanma bölgelerinden 4 tanesinin de Ty1'de transkribe edilen bölgede yer aldığı görülmektedir. Hem Ty1 hem de Ty2'de ayrıca GATAA faktörleri için zayıf bağlanma dizisi olarak değerlendirilen GATAA

sekansının bulunduğu da belirlendi. Ty1 ve Ty2 promotor dizilerinde GATAA faktörü bağlanma sekansları tayin edildikten sonra yaban tip maya suşunda farklı azot kaynaklarının Ty1 ve Ty2 transkripsiyonuna etkileri analiz edildi.

```
1  TGTGGGAATAAAAATCAACTATCATCTACTAACTAGTATTTACGTTACTAGTATATTATC
61  ATATACGGTGTTAGAAGATGACACAAATGATGAGAAATAGTCATCTAAATTAGTGGAAGC
121 TGAAACGCAAGGATTGATAATGTAATAGGATCAATGAATATTAACATTATAAAATGATGAT
181 AATAATATTTATAGAATTGTGTAGAATTGCAGATTCCTTTTCATGGATTCCTAAATCCTT
241 GAGGAGAACTTCTAGTATATCTACATACCTAATATTATAGCCTTAATCACAATGGAATCC
301 CAACAATTACATCAAAATCCACATTCTCTACATGGTAGCG CCTATGCTTCGGTTACTTCT
361 AAGGAAGTCTCATCAAATCAAGATCCGTT GCCGTTTCAGCTTCCAATTTACCGGAATTT
421 GATAGAGATTCCACTAAGGTTAATTCTCAACAAGAGACAACACCTGGGACATCAGCTGTT
481 CCAGAGAACCATCATCATGTCTCTCCTCAACCTGCTTCAGTACCACCTCCACAGAATGGA
541 CAGTACCAACAGCACGGCATGATGACTCCAAACAAAGCTATGGCTTCTAACTGGGCACAT
601 TACCAACAACCATCTATGATGACGTGTTCCACATTATCAAACGTCACCTGCGTATTTATCAA
661 CCGGACCCACACTATCCGCTGCCACAGTATATCCCACCGCTGAGTACTTCCTCACCTGAT
721 CCAATCGATTCACAGGATCACACTCTGAAGTACCTCAAGCTAAGACAAAGGTGAGAAAT
```

Şekil 4.1. Ty2 promotorunda potansiyel GATA faktörü bağlanma yerleri.

Ty2 sekansı *S. cerevisiae*'nin sekanslanan suşundan (BY4741) Kromozom II'de başlangıç noktası 29644 bç olan Ty2 elementinden ilk 800 bç'lik bölge alınmıştır. Potansiyel GATA faktörü bağlanma dizileri GATAA/TTATC (alt zincirde) renkli ve alt çizgili olarak verilmektedir. Sekansı verilen bu Ty2 elementinde TATAAA Kutusu 5' ucuna göre 167- 173 bç bölgesinde yer almaktadır. mRNA başlangıç noktası 241bç olarak belirlenmiştir. Translasyon başlangıç noktası ise 292. bç'dir.

```

1 TGTGGAAATAGAAATCAACTATCATCTACTAACTAGTATTTACATTACTAGTATA TTATC
61 ATATACGGTGTTAGAAGATGACGCAAATGATGAGAAATAGTCATCTAAATTAGTGGAAGC
121 TGAAACGCAAGGATT GATAATGTAATAGGATCAATGAATATAAACAT TATAAAAATGATGAT
181 AATAATATTTATAGAATTGTGTAGAATTGCAGATTCCCTTTTATGGATTCCCTAAATCCTT
241 GAGGAGAACTTCTAGTATATTCTGTATACCTAATATTATAGCCT TTATC AACAATGGAAT
301 CCCAACAA TTATC TCAACATTCACCCATTTCTCATGGTAGCGCCTGTGCTTCGGTTACTT
361 CTAAGGAAGTCCACACAAATCAAGATCCGTTAGACGTTTCAGCTTCCAAAACAGAAGAAT
421 GTGAGAAGGCTTCCACTAAGGCTAACTCTCAACAGACAACAACACCTGCTTCATCAGCTG
481 TTCCAGAGAACCCCATCATGCCTCTCCTCAAACCTGCTCAGTCACATTACCACAGAATG
541 GGCCGTACCCACAGCAGTGCATGATGACCCAAAACCAAGCCAATCCATCTGGTTGGTCAT
601 TTTACGGACACCCATCTATGATTCCGTATACACC TTATC AAATGTCGCCTATGTACTTTC
661 CACCTGGGCCACAATCACAGTTTCCGCAGTATCCATCATCAGTTGGAACGCCTCTGAGCA
721 CTCCATCACCTGAGTCAGGTAATACATTTACTGATTCATCCTCAGCGGACTCT GATA TGA
781 CATCCACTAAAAAATATGTCAGACCACCACCAATGTTAACCTCACCTAATGACTTTCCAA
841 ATTGGGTTAAAACATACATCAAATTTTTACAAAACCTCGATCTCGGTGGT ATTATTCCGA
901 CAGTAAACGGAAAACCCGTACGTCAGATCACTGATGATGAACTCACCTTCTTGATAACA
961 CTTTTCAAATATTTGCTCCCTCTCAATTCCTACCTACCTGGGTCAAAGACATCCTATCCG
1021 TTGATTATACG GATA TCATGAAAATTCTTTCCAAAAGTATTGAAAAAATGCAATCT GATA
1081 CCCAAGAGGCAAACGACATTGTGACCCTGGCAAATTTGCATATAATGGCAGTACACCTG
1141 CAGATGCATTTGAAAACAAAAGTCACAAACA TTATC GACAGACTGAACAATAATGGCATTCC
1201 ATATCAATAACAAGGTCGCATGCCAATTAATTATGAGAGGTCTATCTGGCGAATATAAAT
1261 TTTTACGCTACACACGTCATCGACATCTAAATATGACAGTCGCTGAACTGTTCTTA GATA
1321 TCCATGCTATTTATGAAGAACAACAGGGATCGAGAAACAGTAAACCTAATTACAGGAGAA
1381 ATCCGAGTGATGAGAAGAATGATTCTCGCAGCTATACGAATACAACCAAACCCAAAGTTA
1441 TAGCTCGGAATCCTCAAAAAACAAATAATTGAAATCGAAAACAGCCAGGGCTCACAATG
1500

```

Şekil 4.2. Ty1 promotorunda potansiyel GATA faktörü bağlanma yerleri.

Ty1 sekansı *S. cerevisiae*'nin sekanslanan suşundan (BY4741) Kromozom XVI'da başlangıç noktası 804645 bç olan Ty1 elementinden ilk 1500 bç'lik bölge alınmıştır. Potansiyel GATA faktörü bağlanma dizileri GATAA/TTATC (alt zincirde) renkli ve alt çizgili olarak verilmektedir. Sekansı verilen bu Ty1 elementinde TATAAA Kutusu 5' ucuna göre 166- 172 bç bölgesinde yer almaktadır.

4.2 Farklı Azot Kaynaklarının Ty Virüslerinde Transkripsiyona Etkileri

Ty1-lacZ ve Ty2 lacZ ekspresyon vektörünün YST101 transformantları, bu elementlere farklı azot kaynaklarının etkilerini incelemek için besiyerinde azot kaynağı olarak amonyum veya çeşitli aminoasitleri içeren üreme ortamlarında üretildi. Üreme periyotları sonunda yaban tip maya suşunda Ty1-lacZ ve Ty2 lacZ gen füzyonlarından yapılan transkript seviyeleri β -galaktozidaz testi uygulanarak tayin edildi. *S. cerevisiae*'nin tercih ettiği azot kaynakları

amonyum ve glutamindir. Bu azot kaynaklarının varlığında Ty1 ve Ty2'den yapılan transkript seviyeleri sırasıyla 1654 ve 224 ünite olarak tayin edildi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Farklı azot kaynaklarının Ty1 ve Ty2'de transkripsiyona etkileri.

Azot Kaynağı	β -Galaktozidaz Aktiviteleri* \pm SD	
	Ty1	Ty2
%0.5 Amonyum	1654 \pm 7	224 \pm 7
%0.2 Glutamin	1918 \pm 202	190 \pm 5
%0.2 Prolin	1980 \pm 17	190 \pm 6
%0.2 Trptofan	2100 \pm 9	160 \pm 5
%0.2 Lösin	1422 \pm 25	229 \pm 7

* β -Galaktozidaz aktiviteleri nmol ONPG/dakika/mg protein olarak verilmiştir.
 \pm SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir.

Alternatif azot kaynağı olarak kullanılan aminoasitler (prolin, trptofan ve lösin) üreme ortamında tek çeşit azot kaynağı olarak bulunduğu ise Ty1 ve Ty2 transkripsiyon seviyelerinde normal azot ortamına göre az da olsa farklılıklar olduğu görüldü. Özellikle azot kaynağı olarak triptofan üreme ortamında bulunduğu Ty1'de transkripsiyonel artış yaklaşık %27 olarak (1654'den 2100'e) görülürken Ty2 transkripsiyonunda %40 kadar azalma (224'den 160'a) olduğu görülmektedir. Benzer şekilde zayıf azot kaynağı olarak değerlendirilen prolin üreme ortamında bulunduğu Ty1 transkripsiyonunda artış (1654 üniteye) görülürken aynı azot kaynağının Ty2'de transkripsiyona çok fazla etkisinin olmadığı dikkat çekmektedir. Bu sonuçlar Ty1 ve Ty2 elementlerinde transkripsiyonun farklı azot kaynaklarına değişik şekilde yanıt verdiği şeklinde değerlendirilmiştir.

4.3. Ty 1 Transkripsiyonuna GATAA Faktörlerinin Etkisi

Yaban tip *S. cerevisiae* suşunda farklı azot kaynaklarının Ty1 ve Ty2 transkripsiyonuna etkileri analiz edildikten sonra bu elementlerde standard üreme koşullarında ve farklı azot kaynakları olan ortamda GATA transkripsiyon aktivatörleri olan Gln3 ve Gat1 faktörlerinin etkileri incelendi. Sonuçlar çizelge 4.2’de verildi.

Çizelge 4.2. GATA faktörlerinin Ty1 transkripsiyonuna etkileri

Azot Kaynağı	β -Galaktozidaz Aktiviteleri* \pm SD	
	Yaban tip (YST182)	Δ gln3/gat1 ikili mutant suşu (YST184)
%0.5 Amonyum	2375 \pm 8	1092 \pm 22
%0.2 Glutamin	1844 \pm 45	292 \pm 17
%0.2 Prolin	3448 \pm 188	675 \pm 35

** β -Galaktozidaz aktiviteleri nmol ONPG/dakika/mg protein olarak verilmiştir.
 \pm SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir.

Ty1 transkripsiyon seviyeleri farklı azot kaynakları içeren üreme ortamlarında yaban tip (YST182) ve gln3/gat1 faktörlerini içermeyen ikili mutant suşda karşılaştırmalı olarak analiz edildi. Yaban tip suşta normal azot kaynağı olarak değerlendirilen amonyumlu ortamda 2375 ünite olan transkripsiyon azot kaynağı olarak prolin içeren ortamda yaklaşık %45’lik artış ile 3448 üniteye yükseldiği belirlendi (Çizelge 4.2). Ty1 transkripsiyonu gln3/gat1 mutantında incelendiğinde ise izogenik yaban tip suşa göre Ty1 transkripsiyonunda önemli azalmalar olduğu görüldü. Mutant suşta normal azot ortamında dahi Ty1 transkripsiyonunda yaklaşık %50 azalma olduğu görüldü. Prolin ortamında ise mutant suşta transkripsiyonun yaban tip suşa oranla yaklaşık 5 kat kadar azaldığı ve transkripsiyonun 3448 üniteden 675 üniteye düştüğü belirlendi. Yaban tip suşta glutamin ortamında da Ty1 transkripsiyonunda az miktarda azalma olduğu görüldü (Çizelge 4.2). Bu durumun daha önce ilgili referansta da açıklandığı gibi farklı maya suşlarının değişik azot kaynaklarına verdiği yanıtın farklılığından

kaynaklanmış olabileceği şeklinde değerlendirildi (Georis ve ark. 2009). Bu nedenle araştırma sonuçları farklı maya suşlarından ziyade izogenik olan suşlar arasında karşılaştırıldı.

4.4. Ty 2 Transkripsiyonuna GATAA Faktörlerine Etkisi

GATA faktörlerinin Ty2 transkripsiyonuna etkileri de yaban tip ve izogenik *gln3/gat1* mutant suşunda karşılaştırmalı olarak incelendi. Sonuçlar Çizelge 4.3’de verildi. Ty2 transkripsiyonunun da farklı bir yaban tip suş olan YST182’de YST101 suşundaki ekspresyon seviyesine göre daha düşük seviyede gerçekleştiği görüldü. Bu yaban tip maya suşunda Ty2 ekspresyonun da glutamin ve prolin ortamlarında yaklaşık 2-3 kat artış gösterdiği belirlendi. Amonyum içeren ortamda 115 ünite olarak belirlenen transkripsiyonun glutamin ortamında 188 üniteye, prolin ortamında ise 309 üniteye yükseldiği tayin edildi (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. GATA faktörlerinin Ty2 transkripsiyonuna etkileri

Azot Kaynağı	β -Galaktozidaz Aktiviteleri* \pm SD	
	Yaban tip (YST182)	Δ <i>gln3/gat1</i> çift mutant suşu (YST184)
%0.5 Amonyum	115 \pm 20	80 \pm 4
%0.2 Glutamin	188 \pm 10	15 \pm 3
%0.2 Prolin	309 \pm 6	15 \pm 2

* β -Galaktozidaz aktiviteleri nmol ONPG/dakika/mg protein olarak verilmiştir.
 \pm SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir.

Ty2 transkripsiyon seviyesi *gln3/gat1* mutant suşunda izogenik yaban tip suşa göre 20 kat kadar azalma gösterdiği belirlendi. Yaban tip suşa (YST182) glutamin ortamında 188 ünite olan Ty2 transkripsiyonu *gln3/gat1* mutant suşunda (YST184) yaklaşık 12-kat azalarak 15 ünite olarak gerçekleşti. Benzer şekilde yaban tip maya suşunda prolin ortamında 309 ünite olan Ty2 transkripsiyonunun mutant suşa 20 kat azalarak 15 ünite olarak gerçekleştiği bulundu. Bu sonuçlar azot sinyal yolağının Ty1 elementine göre Ty2’de transkripsiyona daha fazla etki ettiği ve azot sinyal yolağına yanıt olarak Ty transkripsiyonlarının kontrol

edilmesinde transkripsiyon faktörleri Gln3 ve Gat1'in direk veya dolaylı olarak işlevleri olduğunu da göstermektedir.

4.5. Psödohifsel Üremenin Ty Transkripsiyonuna Etkisi

S. cerevisiae hücreleri üreme ortamında yetersiz miktarda azot kaynağı bulunduğunda normal üreme döngüsünden çıkarak pseudohif olarak adlandırılan gelişim şeklinde ürmeye başlamaktadır. Normal şartlarda bölünen maya hücreleri birbirinden ayrılırken, azot kaynağının çok sınırlı olduğu durumda bölünen maya hücreleri birbirine bağlı kalarak küflerde görülen hif benzeri yapı oluşturular. Küflerdeki hif yapısından farklı olarak pseudohifte hücre duvarları korunmaktadır. Pseudohifsel üreme s1278b suşu olarak tanımlanan *S. cerevisiae* suşunda kolaylıkla uyarılabilirken bazı maya suşlarında pseudohifsel üremeyi sağlamak mayaların genetik kökenindeki farklılık dolayısıyla güçlükte sağlanmaktadır. s1278b suşunda spontan olarak oluştuğu bilinen ras2 mutasyonu dolayısıyla pseudohifsel uyarım daha kolay olmakta ve SLAD ortamında kısa sürede ortamdaki maya hücrelerinin büyük bir yüzdesi pseudohifsel gelişim göstermeye başlamaktadır. Bu nedenle pseudohifsel üremeye de neden olan azot açlığının Ty elementlerine etkisini test etmek için Ty1-lacZ ve Ty2-lacZ vektörleri Σ 1278b suşuna transform edildi. Transformantlar logaritmik aşamaya kadar standart YNB+%2 glukoz ortamında üretildikten sonra bu aşamada SLAD ortamına aktarıldı ve bu ortamda da 12 saat inkübe edildi.

SLAD ortamında pseudohifsel üremenin uyarılması sonucu Ty1 ve Ty2'de transkripsiyonun farklı şekilde gerçekleştiği bulundu (Çizelge 4,4). SLAD ortamında üreme sonucu Ty1 transkripsiyonunda önemli seviyede artış görülürken (2797 üniteden 4299 üniteye) Ty2 elementinde ise transkripsiyonda en az 2-kat azalma olduğu tayin edildi (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Pseudohifsel üremenin Ty1 ve Ty2’de transkripsiyona etkileri

Ty vektörü	β -Galaktozidaz Aktiviteleri* \pm SD	
	Normal ortam	SLAD ortamı
Ty1-lacZ	2797 \pm 73	4299 \pm 63
Ty2-lacZ	193 \pm 6	80 \pm 3

* β -Galaktozidaz aktiviteleri nmol ONPG/dakika/mg protein olarak verilmiştir.
 \pm SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir.

4.6. TOR İnhibitörü Olarak Kafeinin Ty Transkripsiyonuna Etkisi

TOR kinaz azot sinyal iletim yolağının önemli bir bileşenidir. TOR kinaz aktivitesi *S. cerevisiae*’da üreme ortamı koşullarına göre kontrol edilir. TOR *S. cerevisiae*’da iki farklı kompleks olarak bulunur. Bunlardan TOR kompleksi 1 (TORC1) üreme koşullarına uygun olarak hücre döngüsü, gen ekspresyonu ve translasyon olmak üzere çok sayıda hücresel olayın kontrolünde yer almaktadır (Wullschleger ve ark 2006; Loewith ve ark. 2002). TOR2 kompleksi ise (TORC2) polarize hücre büyümesi ve hücre iskeletinin organizasyonunda yer almaktadır (Loewith ve ark. 2002). TORC1’in aktivitesinin rapamisin ile bloke edildiği bilinmektedir. Ayrıca kafein’in de belirli konsantrasyonlarda uygulandığında TORC1 aktivitesini bloke edebildiği rapor edilmiştir (Reinke ve ark. 2006). Kafein, tam olarak karakterize edilemeyen bir mekanizma ile genelde hücre ölümüne yol açan doğal bir pürin analogudur (Kuranda ve ark. 2006)

Ty2 elementi transkripsiyonunda TOR kompleksinin normal koşullarda işlevi olup olmadığı rapamisin kullanılarak farklı maya suşlarında daha önce incelenmiştir (Bayram 2003). Bu çalışmada ise TOR inhibitörü olarak kullanılan kafein farklı dozlarda kullanıldığında Ty1 ve Ty2 de transkripsiyona etkisi olup olmadığı Σ 1278b suşunda incelendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4’de verildi. TORC1 kompleksi inhibitörü olarak üreme ortamına kafein ilave edilmesinin kafein dozuna bağlı olarak Ty1 transkripsiyonunda 2-kat kadar artış gösterdiği tayin edildi. Ty2 transkripsiyonunda ise kafein dozuna bağlı olarak genellikle azalma olduğu transkripsiyonun 193 üniteden 146 üniteye azaldığı görüldü (Çizelge 4.4). Bu sonuçlar da

TORC1 kinaz kompleksinin aktif olduğu durumda Ty1 ve Ty2 de transkripsiyona farklı şekilde etki ettiğini göstermektedir.

Çizelge 4.5. TOR inhibitörünün Ty1 ve Ty2’de transkripsiyona etkileri

Kafein Konsantrasyonu	β-Galaktozidaz Aktiviteleri*± SD	
	Ty1	Ty2
Normal Ortam (0 kafein)	2797 ± 73	193 ± 14
2.5 mM kafein	3354 ± 7	111 ± 4
5 mM kafein	4790 ± 120	136 ± 4
10 mM kafein	6118 ± 281	146 ± 8

*β-Galaktozidaz aktiviteleri nmol ONPG/dakika/mg protein olarak verilmiştir.
± SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ty elementleri, *Saccharomyces cerevisiae*'da hücre içi zorunlu virüs benzeri yapılar olarak adlandırılmaktadır (Cameron ve ark. 1979). Özellikle retrovirüslere benzer özelliklerinden dolayı bu virüslerde gen ifadesinin araştırılmasında model elementler olarak kullanılmaktadırlar. Retrovirüslerde gen ifadesinin kontrol mekanizmalarından olan ribozomal frameshift'in moleküler mekanizması özellikle Ty elementleri kullanılarak aydınlatılmıştır (Farabaugh 1996). Ty elementleri 5 farklı grupta sınıflandırılmıştır ve herbir grubun maya genomu içindeki kopya sayısı yaklaşık olarak aynıdır, mayada nesilden nesile aktarımlarda da kopya sayısında değişiklik olmadığı gösterilmiştir (Kim ve ark. 1998). Bu durum maya hücrelerinde metabolizmaya bağlı olarak Ty elementlerinde de gen ifadesinin kontrol edilebildiğini göstermektedir. Bu elementlerde gen ifadesinin glikoz sinyal iletimine bağlı olarak kontrol edildiği daha önce yapılan çalışmalarda moleküler seviyede gösterilmiştir. Ty1 ve Ty2 elementlerinde transkripsiyonun Gcr1 ve Gcn4 faktörleri ile kontrol edildiği daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Türkel 1994, Türkel ve ark. 1997, Morillon ve ark. 2002). Gcr1 glikolitik enzimlerin kodlandığı genlerin transkripsiyonunu aktive eden faktördür. Gcn4 ise aminoasit biyosentezi için gerekli enzimlerin kodlandığı genlerin aktivatörüdür (Hinnebusch 2005). Bu bulgular Ty elementlerinde gen ifadesinin mayada metabolik sinyallere bağlı olarak kontrol edildiğini göstermiştir.

Bu araştırmada ise azot sinyal yolağının Ty1 ve Ty2 elementlerinde gen ifadesine etkileri incelenmiştir. Azotun temel element olarak hücreye girişi ve metabolizması da genetik ve biyokimyasal kontrol altındadır (Ljungdahl ve Daignan-Fornier 2012). Azot kaynağının niteliğine göre azot metabolizması genlerini kontrol eden faktörler GATA faktörleridir. Bu faktörler hedef genlerin promotor bölgelerindeki GATAA dizisine bağlanarak gen ifadesini kontrol etmektedirler. Bu nedenle araştırmamızda ilk önce Ty1 ve Ty2 promotorlarında GATA faktörlerinin potansiyel olarak bağlanma dizisi/sekansı olan GATAA dizisinin olup olmadığı kontrol edilmiştir. Yapılan sekans analizinde hem Ty1 ve hem de Ty2 promotorunda çok sayıda GATA sekansı olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle Ty elementlerinde transkripsiyonun azot sinyal yolağı ile de kontrol edilebileceği var sayılarak farklı azot

kaynaklarının Ty elementlerinde gen ifadesine etkileri Ty-lacZ gen füzyonları kullanılarak incelenmiştir.

Yaban tip *S. cerevisiae* suşunda farklı azot kaynaklarının Ty1 ve Ty2 de transkripsiyonel etkileri incelendiğinde; azot kaynağına ve Ty elementine göre değişen aktivasyon veya baskılama olduğu görülmüştür. Daha önce yapılan çalışmada 21 farklı azot kaynağının azot sinyal yolağı ile kontrol edilen genlere etkileri incelenmiş olup bu genlerin ifade düzeylerinin de azot kaynağı türüne göre değiştiği bulunmuştur (Godard ve ark. 2007).

Bu temel analizden sonra araştırmamızda GATA faktörlerinden ikisini Gln3 ve Gat1 içermeyen maya suşunda farklı azot kaynaklarının Ty elementlerinde gen ifadesine etkileri de incelenmiştir. Gln3 ve Gat1 transkripsiyonel aktivatör olup alternatif azot kaynağı kullanımı için gerekli genlerin aktivasyonunu gerçekleştirirler (Ljungdahl ve Daignan-Fornier 2012, Zhang ve ark. 2018). Yaban tip ve gln3/gat1 ikili mutant suşunda Ty1 ve Ty2 elementlerinin transkripsiyonları karşılaştırıldığında mutant suşta her iki elementin transkripsiyonunda da önemli seviyede azalma olduğu görülmüştür. Bu sonuç Ty elementlerinde transkripsiyonel aktivasyonda GATA faktörlerinin önemli işlevi olduğunu da göstermektedir.

S. cerevisiae hücreleri azot miktarının kısıtlı olduğu durumlarda farklı bir gelişim süreci olan psödohifsel gelişim gösterirler. Bu araştırmada psödohifsel gelişimin de Ty elementlerine etkisi incelenmiştir. Psödohifsel gelişim için gerekli genlerin aktivasyonunda Tec1 olarak bilinen transkripsiyon faktörünün işlevi vardır. Daha önce yapılan çalışmada Ty1 elementinin Tec1 faktörü tarafından kontrol edildiği rapor edilmiştir (Laloux ve ark. 1990). Tec1 kontrolünde olan Ty1’de psödohifsel üreme şartlarında Ty1 transkripsiyonunda artış olması beklenen bir sonuçtur. Fakat Ty2 de bu şartlarda transkripsiyonun azalması bu elementte psödohifsel üreme şartlarında farklı faktörler bağlı olarak transkripsiyonel kontrol yapıldığı görülmektedir. Ty2’de Tec1 faktörünün işlevi olup olmadığı araştırılmamıştır.

Azot sinyal iletim yolunda ana kontrol elementi olan faktörlerden bir diğeri ise TOR kinazdır. TOR kinaz normal koşullarda aktif olup Gln3 faktörünün sitoplazmada tutulmasını da sağlar. TOR kinaz aktivitesi aynı zamanda kafein ile de bloke edilebilir. Araştırmamızda maya hücrelerinde TOR kinaz aktivitesinin kafeine maruz bırakılarak bloke edilmesi ile Ty1 ve Ty2

elementlerinin transkripsiyonunda farklılıklar olduğu da gözlemlenmiştir. TOR kinaz aktivitesinin bloke edilmesi ile Ty1 de önemli seviyede artış görülürken Ty2 de transkripsiyonda azalma olduğu görülmektedir. Bu sonuç da Ty1 ve Ty2 de gerek TOR kinaz ve gerekse GATA faktörlerinin farklı yönde etkileri olduğunu göstermektedir.

Maya genomunda yaklaşık 10 farklı GATA faktörü belirlenmiştir (Ronsman ve ark. 2019). Fakat günümüzde dahi aktivatör veya represör olan GATA faktörlerinde sekans özgüllüğünün nasıl sağlanabildiği halen tam olarak açıklanamamaktadır (Ko ve Engel 1993, Ronsman ve ark. 2019). Ty elementlerinde de hangi GATA faktörünün transkripsiyonel kontrolde yer aldığı belirlenmesi için daha fazla in vivo ve in vitro çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir. Bütün GATA faktörleri tekli, ikili veya üçlü kombinasyonlar ile genomunda silinmiş *S. cerevisiae* mutantlarının kullanılması hangi GATA faktörünün daha etkili olduğunu gösterebilir. Ayrıca saflaştırılmış GATA faktörleri ile yapılacak in vitro jel mobilite veya DNazI foot print çalışmaları da spesifik olarak GATA faktörlerinin Ty elementlerinde hangi sekansa bağlanabildiğini gösteren çalışmalardır.

KAYNAKLAR

- Bayram, Ö. 2003.** Ortam şartlarının Ty2 retrotranspozonu transkripsiyonuna ve frame shift oranına etkilerinin analizi. Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, *Yüksek Lisans Tezi*, 59 sayfa.
- Belcourt, M.F. ve Farabaugh, P.J. 1990.** Ribosomal frameshifting in the yeast retrotransposon Ty: tRNAs induces slippage on a 7 nucleotide minimal site. *Cell*, 62: 339–352.
- Boeke, J.D., Garfinkel, D.J. Syles, C.A., Fink, G.R. 1985.** Ty elements transpose through an RNA intermediate. *Cell*, 40: 491–500.
- Botstein, D., Fink, G. R. 2011.** Yeast: An experimental organism for 21st century biology. *Genetics*, 189(3): 695–704.
- Cameron, J.R., Loh, Y.E., Dawis, W.R. 1979.** Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell*, 16: 739–751.
- Capy, P. 2005.** Classification and nomenclature of retrotransposable elements. *Cytogenetics and Genome Research*, 110:457–461.
- Cherry, J.M., Hong, E.L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E.T., Christie, K.R., Costanzo, M.C., Dwight, S.S., Engel, S.R., Fisk, D.G., Hirschman, J.E., Hitz, B.C., Karra, K., Krieger, C.J., Miyasato, S.R., Nash, R.S., Park, J., Skrzypek, M.S., Simison, M., Weng, S., Wong, E.D. 2012.** *Saccharomyces* genome database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 40: 700–705.
- Crespo, J.L., Hall, M.N. 2002.** Elucidating TOR Signaling and Rapamycin Action: Lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66 (4): 579 – 591.
- Clare, J.J., Belcourt, M., Farabaugh, P.J. 1988.** Efficient translational frameshifting occurs within a conserved sequence of the overlap between the two genes of a yeast Ty1 transposon. *The Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 85: 6816–6820.
- Cunningham, T.S., Rai, R., Cooper, T.G. 2000.** The Level of DAL80 Expression Down-Regulates GATA Factor-Mediated Transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 182 (23): 6584–6591.
- Curcio, J.M., Lutz, S., Lesage, P. 2014.** The Ty1 LTRretrotransposon of budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology Spectrum*, 3(2):MDNA3-0053-2014.
- Dinman, J. D. 2012.** Control of gene expression by translational recoding. *In Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 86: 129–149.

- Dobzinski, N., Chuartzman, S.G., Kama, R., Schuldiner, M., Gerst, J.E. 2015.** Starvation-Dependent Regulation of Golgi Quality Control Links the TOR Signaling and Vacuolar Protein Sorting Pathways. *Cell Reports*, 12(11):1876–1886.
- Errede, B., Company, M., Hutchison III, C.A. 1987.** Ty1 sequence with enhancer and mating-type-dependent regulatory activities. *Molecular and Cellular Biology*, 7:258–265.
- Farabaugh, P.J., Liao X.B., Belcourt, M., Zhao, H., Kapakos, J., Clare, J. 1989.** Enhancer and silencerlike sites within the transcribed portion of a Ty2 transposable element of *S.cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 9:4824–4834.
- Farabaugh, P.J., Vimaladithan, A., Zhao, H. 1993a.** A novel programmed frameshift expresses the POL3 gene of retrotransposon Ty3 of yeast: frameshifting without tRNA slippage. *Cell*, 74:93–103.
- Farabaugh, P.J., Vimaladithan, A., Türkel, S., Johnson, S., Zhao, H. 1993b.** Three downstream sites repress transcription of a Ty2 retrotransposon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 13: 2081–2090.
- Farabaugh, P.J. 1995.** Post-transcriptional regulation of transposition by Ty retrotransposons of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 10361–10364.
- Farabaugh, P.J. 1996.** Programmed translational frameshifting. *Microbiological Reviews*, 60: 103–134.
- Feldman, H., 2012.** *Yeast: Molecular and Cellular Biology*, Wiley-Blackwell, Weinheim, Germany, 1650 pp
- Georis, I., Feller, A., Jennifer J., Tate, J.J., Terrance G. Cooper, TG., Dubois, E. 2009.** Nitrogen catabolite repression-sensitive transcription as a readout of Tor pathway regulation: The genetic background, reporter gene and GATA factor assayed determine the outcomes. *Genetics* 181: 861–874.
- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., Fink, G.R. 1992.** Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell*, 68: 1077–1090.
- Godard, P., Urrestarazu, A., Vissers, S., Kontos, K., Bontempi, G., van Helden, J., ve Andre, B. 2007.** Effect of 21 Different Nitrogen Sources on Global Gene Expression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 27 (8): 3065–3086.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G. 1996.** Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287): 546, 563–567.
- Guarente, L. 1983.** Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods in Enzymology*, 101: 181–191.

Kim, Jin M., Swathi Vanguri, Jef D. Boeke, Abram Gabriel, Daniel F. Voytas. 1998. Transposable Elements and Genome Organization: A Comprehensive Survey of Retrotransposons Revealed by the Complete *Saccharomyces cerevisiae* Genome Sequence. *Genome Research*, 8(5): 464–478.

Ko, L.J., Engel, D.J. 1993. DNA-Binding Specificities of the GATA Transcription Factor Family. *Molecular and Cellular Biology*, 13(7):4011–4022.

Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, s., Palamarczyk, G., Jean François, J. 2006. Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Molecular Microbiology*, 61(5): 1147–1166

Laloux, I., Dubois, E., Dewerchin M., Jacobs, E. 1990. TEC1, a gene involved in the activation of Ty1 and Ty1-mediated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and molecular analysis. *Molecular and Cellular Biology*, 10(7), 3541-3550.

Ljungdahl,P.O., Daignan-Fornier, B. 2012. Regulation of Amino Acid, Nucleotide, and Phosphate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190: 885–929.

Lo, WS., Dranginis, A. 1998. The Cell Surface Flocculin Flo11 Is Required for Pseudohyphae Formation and Invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 9: 161–171.

Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger W., Jenoe, P., Hall, M.N. 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular Cell*, 10: 457–468.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265–275.

Magasanik, B., Kaiser, C.A. 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 290: 1–18.

Morillon, A., Benard, L., Springer, M., Lesage, P. 2002. Differential effect of chromatin and Gcn4 on the 50-fold range of expression among individual Yeast Ty1 retrotransposons. *Molecular and Cellular Biology*, 22: 2078–2088.

Reinke, A., C.-Y.Chen, J.C-Y., Aronova, S., Powers, T. 2006. Caffeine targets TOR complex I and provides evidence for a regulatory link between the FRB and kinase domains of Tor1p. *The Journal of Biological Chemistry*, 281 (42): 31616–31626.

Ronsmans, A., Wery, M., Szachnowski, U., Gautier, C., Descrimes, M., Dubois, E., Morillon, A., Georis, I. 2019. Transcription-dependent spreading of the Dal80 yeast GATA factor across the body of highly expressed genes. *PLoS Genetics*, 15(2): e1007999.

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, 455 pp

Ryan, O., Shapiro, R.S., Kurat, C.F., Mayhew, D., Baryshnikova, A., Chin, B., Lin, Z., Cox, M.J., Vizeacoumar, F., Cheung, D., Bahr, S., Tsui, K., Tebbji, F., Sellam, A., Istel, F., Schwarzmuller, T., Reynolds, T.B., Kuchler, K., Gifford, D.K., Whiteway, M., Giaever, G., Nislow, C., Costanzo, M., Gingras, A., Mitra, R.D., Andrews, B., Fink, G.R., Cowen, L.E., Boone, C. 2012. Global gene deletion analysis exploring yeast filamentous growth. *Science*, 337: 1353–1356.

Sandmeyer, S., Patterson, K, Bilanchone, V. 2015. Ty3, a position-specific retrotransposon in budding yeast. *Microbiology Spectrum*, 3(2): MDNA3-0057-2014.

Schneper, L., Düvel, K., Broach, J.R. 2004. Sense and sensibility: nutritional response and signal integration in yeast. *Current Opinion in Microbiology*, 7(6): 624–630.

Türkel, S. 1994. Transcriptional regulation of yeast retrotransposon Ty2-917. Graduate School, University of Maryland Baltimore County, Baltimore, Maryland, ABD, *Doktora Tezi*, 258 pp

Türkel, S., Liao, X-B., Farabaugh, P.J. 1997. Gcr1-dependent transcriptional activation of yeast retrotransposon Ty2-917. *Yeast*, 13: 917–930.

Türkel, S., Bayram, S., Arik, E. 2009. Glucose Signaling Pathway and Growth Conditions Regulate Gene Expression in Retrotransposon Ty2. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 64c: 526–532.

Zhang, W., Du, G., Zhou, J., Chena, J. 2018. Regulation of Sensing, Transportation, and Catabolism of Nitrogen Sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82(1): e00040-17.

Zurita-Martinez, S.A., Cardenas, M.E. 2005. Tor and Cyclic AMP Protein Kinase A: two parallel pathways regulating expression of genes required for cell growth. *Eukaryotic Cell*, 4: 63–71.

Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124: 471–484.

EKLER

EK 1 Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması

EK 2 β - Galaktozidaz Aktivitesi Hesaplanması

EK 1 Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması

1:YPD (Yeast Ekstrakt, Pepton, Dekstroz)

10 g yeast ekstrakt ve 20 g pepton saf suda çözüldü. Katı besiyeri (petriler) için, sıvı besiyeri ortamına 20 gram/litre oluşturacak şekilde *Agar agar* eklendi ve 121°C sıcaklıkta, 25 dk steril edildi. Karbon kaynağı olarak %20'lik stok çözelti halinde glikoz hazırlandı, 121°C'de 25 dakika otoklavda steril edildi. Glikoz, kullanımından önce besiyerlerine son konsantrasyonu %2 olacak şekilde ortama ilave edildi.

2: Yeast Nitrogen Base, YNB

1.7 gram/litre Yeast Nitrogen Base (YNB), 5 gram/litre Amonyum sülfat distile suda çözülüp, otoklavda steril edildi. Otoklavdan sonra gerekli aminoasitler 0.45 mm'lik disk filtre ile steril edilerek verilen konsantrasyonlarda besiyerine eklendi.

Katı besiyerleri için 20 gram/litre olacak şekilde *Agar agar* ilave edildi. Glukoz son konsantrasyonu %2 olacak şekilde %20'lik steril stok çözeltilerden deneydeki kullanımdan hemen önce ilave edildi.

3: LB (Luria Broth) Besi yeri

Escherichia coli hücrelerinin plazmit transformasyonu için üretilmesinde kullanıldı. Bu besi yerini hazırlamak için LB besiyeri distile suda süspanse edilerek otoklavda steril edildi. LB petrileri için besiyerine agar ilave edildi. *E. coli*'ye plazmit transformasyonunda kullanılan LB-Ampicillin petrileri ve LB sıvı besiyeri için son konsantrasyonu 100 mg/l olacak şekilde filtre sterilizasyonu yapılmış ampisilin ilave edildi.

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

Lityum asetat (Molekül ağırlığı: 102,02) 1M olacak şekilde saf suda hazırlandı ve 0,45 µm por çaplı steril disk filtreler ile steril edildi.

4: Polietilen Glikol (%50 PEG)

Polietilen Glikol (PEG) (Molekül ağırlığı: 3,350) distile suda %50'lik stok çözelti olarak hazırlanıp, 121°C'de 25 dk otoklavda steril edildi.

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

Sodyum dodesil sülfat (SDS), steril distile suda %0,1'lik stok çözelti olarak hazırlandı.

Kloroform seyreltilmeden, doğrudan stoktan kullanıldı.

6: Lizis Tampon Çözeltisi (Break Buffer)

Lizis Tampon Çözeltisinin (Break Buffer) Bileşenleri:

100 mM Tris.HCl (pH: 8)

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

%20 Gliserol

4 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF).

7: B- Galaktozidaz Tampon Çözeltisi (Z Buffer)

Z Buffer içeriği:

60 mM Na₂HPO₄.7H₂O,

40 mM NaH₂PO₄.H₂O,

10 mM KCl,

1 mM MgSO₄.7H₂O

50 mM β-Merkepto-etanol çözeltisi

Yukarıda belirtilen son konsantrasyonlarda, steril distile su ile hazırlanıp +4°C'de saklandı

8: Lowry Çözeltileri

I: Lowry A çözeltisi:

20 g Na₂CO₃ ve 4g NaOH, toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü.

II: Lowry-B1 çözeltisi:

1 g CuSO₄, toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile su ile çözümlenip, +4 °C'de depolandı.

III: Lowry-B2 çözeltisi:

2 g Sodyum potasyum tartarat, toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile su ile çözümlenip, +4 C'de depo edildi. (Stok çözelti)

IV: Lowry-C çözeltisi:

Her deney için, Lowry-A, Lowry-B1 ve Lowry-B2 stok çözeltilerden belirlenen konsantrasyonda taze olarak hazırlandı.

Lowry-C Çözeltisinin İçeriği:

24,5 ml Lowry A,

250 µl Lowry B1,

250 µl Lowry B2.

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

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

10- SLAD Besiyeri (Synthetic Low Amonyum Dextrose).

Psödohifsel üreme ortamı olarak kullanıldı. YNB besiyeri amonyumsuz olarak hazırlandı. Ortama kullanmadan önce 10mM kadar amonyum sülfat ilave edildi.

EK 2 β - Galaktozidaz aktivitesi hesaplanması

β -galaktozidaz aktivitesi aşağıda verilen formüle gore hesaplandı.

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

OD₄₂₀: Sarı rengin absorbansı

1.7: Sarı rengin bulunduğu tupun 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 suresi (dakika)

V: B-Galaktozidaz olmunde kullanılan huce lizatı hacmi (ml)

P: Huce lizatlarının protein konsantrasyonları (mg/ml)

β -Galaktozidaz aktivitesi biririmi, dakika başına 1 mg proteince hidroliz edilen nmol ONPG (nmol ONPG/dk/ mg protein) cinsinden verilmiştir

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Tuğçe KARADUMAN
Doğum Yeri ve Tarihi : Sivas, 22.11.1991
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lise : Ahmet Vefik Paşa Anadolu Lisesi/ 2009
Lisans : Anadolu Üniversitesi/ 2014
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi/ 2019
İletişim (e-posta) : tycessku@gmail.com
Yayımları :

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

Yazar Adı Soyadı	Tuğçe KARADUMAN
Tez Adı	Azot Sinyal İletiminin Ty Virüslerinde Gen Anlatımına Etkilerinin İncelenmesi.
Enstitü	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Türü	Yüksek lisans
Tez Danışman(lar)ı	Prof. Dr. Sezai Türkel
Çoğaltma (Fotokopi Çekim) izni	<input type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimin sadece içindekiler, özet, kaynakça ve içeriğinin % 10 bölümünün fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input checked="" type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin vermiyorum
Yayımlama izni	<input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin Veriyorum

Hazırlamış olduğum tezimin belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Bursa Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih : 27. 09. 2019

İmza:

