

**GLUKOZ VE AZOT SİNYAL İLETİM YOLLARININ *NTH1* GENİ  
TRANSKRİPSİYONUNA ETKİLERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ**

**Türkan TURAN**



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

**GLUKOZ VE AZOT SİNYAL İLETİM YOLLARININ *NTH1* GENİ  
TRANSKRİPSİYONUNA ETKİLERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ**

**Türkan TURAN**

Prof. Dr. Sezai TÜRKEL  
(Danışman)

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BURSA-2011  
Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ ONAYI

Türkan TURAN tarafından hazırlanan “Glukoz ve Azot Sinyal İletim Yollarının *NTH1* Geni Transkripsiyonuna Etkilerinin Moleküler Analizi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Prof. Dr. Sezai Türkel

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

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

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

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Kadri ARSLAN**  
**Enstitü Müdürü**

.../.../2011

## 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.**

03 / 01 / 2011.

**Türkan Turan**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### GLUKOZ VE AZOT SİNYAL İLETİM YOLLARININ *NTH1* GENİ TRANSKRİPSİYONUNA ETKİLERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ

**Türkan TURAN**

Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Trehaloz genellikle stres koşullarında *S. cerevisiae* hücrelerinde fazla miktarda sentezlenip hücreleri olumsuz üreme koşullarına karşı korur. Trehaloz TPS enzim kompleksi tarafından sentezlenir. Trehalozun glukoz birimlerine yıkımı ise trehalaz enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. *S. cerevisiae*'da iki farklı trehalaz belirlenmiştir. Bu enzimler nötral trehalaz (Nth1p) ve asit trehalazdır (Ath1p). Bu araştırmada *NTH1* geninin transkripsiyonuna glukoz ve azot sinyal iletim yollarının etkileri incelendi. *NTH1* geni transkripsiyonunun haploid ve diploid *S. cerevisiae* suşlarında benzer şekilde kontrol edildiği gösterildi. Bu araştırmada elde edilen sonuçlar *NTH1* geni transkripsiyonunun durağan fazda ve düşük glukoz ortamında da birkaç kat aktive edildiğini gösterdi. Düşük glukoz sinyaline yanıt olarak *NTH1* geni transkripsiyonunun protein kinaz Snf1p tarafından düzenlendiği bulundu. Bu sonuçlara ek olarak *S. cerevisiae* da azot sinyal iletim yolunun da *NTH1* geni transkripsiyonuna etki ettiği belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Trehaloz, Trehalaz, Glukoz sinyali, Azot sinyali, *S. cerevisiae*.  
**2011, IX + 33 sayfa**

## ABSTRACT

MSc Thesis

**Türkan TURAN**

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

**Supervisor:** Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Trehalose is generally over-synthesized under stress inducing conditions and protects *S. cerevisiae* cells from unfavorable growth conditions. Trehalose is synthesized by TPS enzyme complex. Degradation of trehalose to glucose subunits is catalyzed by trehalase enzyme. Two different trehalase enzymes have been identified in *S. cerevisiae*. These enzymes are neutral trehalase (Nth1p) and acid trehalase (Ath1p). In this study, the effects of glucose and nitrogen signaling pathway on the transcription of *NTH1* gene was investigated. It was shown that the *NTH1* transcription is controlled by a similar mechanism in haploid and diploid *S. cerevisiae* cells. Results of this study also showed that the transcription of *NTH1* gene increases several fold in stationary stage and in low glucose medium. It was found that the protein kinase Snf1p regulates *NTH1* transcription in response to low glucose signaling. In addition to these results, it was shown that the nitrogen signaling pathway also affects the transcription of *NTH1* gene in *S. cerevisiae*.

**Key Words:** Trehalose, Trehalase, Glucose signaling, Nitrogen signaling, *S. cerevisiae*.  
**2011, IX + 33 pages**

## TEŞEKKÜR

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

Türkan TURAN

3. 01. 2011

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....</b>	<b>3</b>
2. 1. <i>S.cerevisiae</i> 'de Glukoz Sinyal İletimi.....	3
2. 2. <i>S. cerevisiae</i> 'de Trehaloz Metabolizması.....	4
2. 3. <i>S. cerevisiae</i> <i>NTH1</i> Geninin Yapısı ve İşlevi.....	6
2. 4. <i>S. cerevisiae</i> Azot Sinyal İletim Yolu.....	8
<b>3.MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>10</b>
3. 1. Araştırmada Kullanılan <i>S.cerevisiae</i> Suşları ve Üretilmesi.....	10
3. 2. Araştırmada Kullanılan Plazmidlerin Yapısı ve Transformasyonu.....	11
3. 3. <i>NTH1</i> Transformantlarının Farklı Koşullarda Üretilmesi.....	13
3. 4. <i>S. cerevisiae</i> 'da $\beta$ -Galaktozidaz Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	14
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>16</b>
4. 1. <i>NTH1</i> Transkripsiyonuna Üreme Aşamalarının Etkileri.....	16
4. 2. Farklı Karbonhidratların <i>NTH1</i> Geni Transkripsiyonuna Etkileri.....	17
4. 3. Glukoz sinyalinin <i>NTH1</i> Geni Transkripsiyonuna Etkileri.....	18
4. 4. Snf1p Kinazın <i>NTH1</i> Geni Transkripsiyonuna Etkileri.....	19
4. 5. Azot Sinyal İletim Yolunun <i>NTH1</i> Transkripsiyonuna Etkileri.....	21
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>23</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>25</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>29</b>



Ek 1: Araştırmada Kullanılan Besi Yerleri ve özeltilerin Hazırlanması. ....	29
Ek 2: $\beta$ - Galaktosidaz Aktivitesinin Hesaplanması.....	32
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	33

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

### Açıklama

$\alpha$ :	Alfa
$\beta$ :	Beta
$^{\circ}$ C:	Santigrat derece
g:	Gravity (santrifuj birimi)
$\mu\text{m}$ :	Mikron
$\mu\text{g}$ :	Mikrogram
$\mu\text{l}$ :	Mikrolitre
$\Delta$ :	Delta, delesyon
%:	Yüzde

### Kısaltmalar

### Açıklama

ATH1:	Asidik Trehalaz Geni-1
Ath1p:	Asidik trehalaz enzimi-1
ATP:	Adenozin Trifosfat
Bp-Bç:	Base pair, Baz çifti
CaCl <sub>2</sub> :	Kalsiyum Klorür
cAMP:	siklikAMP (Halkasal Adenozin MonoFosfat)
Cyc1:	Sitokrom C1
DAL80:	Degredation of Allantoin-80 (Allantoin degradesyonu)
Dk:	Dakika
DNA:	Deoksiribonükleik asit
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
GLN3:	Glutamin metabolizması geni-3
GPR:	G-Proteine Bağlı Reseptör

gr:	Gram
Gly/lakt:	Gliserol-Laktat
HXT:	Heksoz transporter
Kbç:	Kilobaz çifti uzunluk
kDA:	Kilodalton
lac-Z:	$\beta$ -Galaktozidaz geni, LacZ
LB:	Luria Bertani sıvı besiyeri
LiOAc:	Lityum Asetat
M:	Molar
MAT:	Mating tipi
mg:	Miligram
MIG 1:	Multicopy Inhibitors of Gal Genes
ml:	Mililitre
mM:	Milimolar
mRNA:	Messenger Ribonükleik asit
NTH1:	Nötral Trehalaz Geni-1
Nth1p:	Nötral trehalaz proteini-1
nmol:	Nanomole
OD:	Optical Density (optik yoğunluk)
ONPG:	O-Nitro-Phenyl- $\beta$ -D- Galaktosidase
pH:	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PEG:	Polyetilen Glikol
PKA:	Protein Kinaz-A
RGT:	Restoration of Glukoz Transport
<i>S. cerevisiae</i> :	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC- Ura:	Synthethic Complete minus Uracil
SNF:	Sucrose Non-fermenting
STRE:	Stress Response Element
SUC:	Sukroz
TE:	Tris-EDTA
TOR:	Target of Rapamycin
TPS:	Trehaloz Fosfat Sentaz enzim kompleksi

TPS1:	Trehaloz Fosfat Sentaz Geni-1
Tps1p:	Trehaloz fosfat sentez enzimi altbirimi-1
TSL1:	TPS Enzimi büyük alt birimi-1
UDP:	Uridin Di Fosfat
URA:	Uracil
YEp:	Yeast Episomal Plasmid
YNB:	Yeast Nitrogen Base
YPD:	Yeast extract Pepton Dextrose

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Çizelge 2.1. Trehaloz metabolizması genleri ve kodladıkları enzimler.	5
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşları ve özellikleri.	11
Çizelge 4.1. Üreme aşamalarının <i>NTH1</i> geni transkripsiyonuna etkileri.	17
Çizelge 4.2. Farklı karbon kaynaklarının <i>NTH1</i> geni transkripsiyonuna etkileri.	18
Çizelge 4.3. Glukoz sinyalinin <i>NTH1</i> geni transkripsiyonuna etkileri.	19
Çizelge 4.4. Protein Kinaz Snf1p'nin <i>NTH1</i> transkripsiyonuna etkileri.	20
Çizelge 4.5. Azot sinyal iletiminin <i>NTH1</i> transkripsiyonuna etkileri.	22

## 1. GİRİŞ

*Saccharomyces cerevisiae*'da trehaloz çeşitli stres koşullarına karşı koruyucu bir metabolit olarak glukozdan iki enzimatik reaksiyon ile sentezlenir. Trehaloz'un *S. cerevisiae* sitoplazmasındaki miktarı üreme aşamaları ve üreme koşullarına göre farklılıklar gösterir. Trehaloz, hücrede strese karşı koruyucu molekül olarak bakterilerde ve bitkilerde de bulunmaktadır (Singer ve Lindquist 1998, Benaroudy ve ark. 2001, Francois ve Parrou 2001). *S. cerevisiae*'da trehaloz biyosentezi Trehaloz Fosfat Sentaz (TPS) enzim kompleksince yapılır. Hücre içinde depolanan veya hücre dışından alınan trehalozun yıkımı ise trehalaz enzimlerince yapılır. *S. cerevisiae*'da nötral ve asidik trehalaz olmak üzere iki trehalaz bulunmaktadır. Nötral trehalaz *NTH1* geni tarafından, asidik trehalaz ise *ATH1* geni tarafından kodlanmaktadır. *S. cerevisiae*'da *NTH1* geni ile çok büyük bir homoloji gösteren başka bir trehalaz geni daha bulunmaktadır. *NTH2* olarak adlandırılan bu genin kodladığı trehalaz enzimi Nth2p'nin biyolojik işlevleri henüz tam olarak belirlenememiştir (Francois ve Parrou 2001).

Trehaloz biyosentezi sırasında ara bileşik olarak oluşan trehaloz-6-fosfat'ın *S. cerevisiae*'da glukozun hücreye alınması ve glikolitik yolun kontrolünde önemli işlevi bulunmaktadır. Bu bileşiğin glukozun fosforilasyonu için gerekli olan heksokinaz enzimlerinin inhibitörü olduğu ve bu enzimlere etki ederek glukozun kontrollü bir şekilde glikolitik yola girişini sağladığı bulunmuştur (Thevelein ve Hohmann 1995). Bundan dolayı trehaloz biyosentezi normal koşullarda da belirli bir bazal seviyede yapılmaktadır.

Trehaloz biyosentezinde yer alan *TPS1* geni transkripsiyonunun bazı stres koşullarında aktive edildiği bilinmektedir. Bu genin transkripsiyonel aktivasyonunun promotor bölgesinde bulunan STRE elementlerine bağlanan faktörlerce gerçekleştirildiği bulunmuştur (Francois ve Parrou 2001).

*S. cerevisiae*'da sitoplazmik trehaloz miktarının belirli bir seviyede tutulabilmesi için trehalaz enzim aktivitesi de gereklidir. Ayrıca, stres koşulları sona erdiğinde

hücrel metabolik işlemlerin normal seviyeye dönebilmesi için depo edilen trehalozun da hızlı bir şekilde yıkımı gerekmektedir. Bu işlemler için kullanılan Nötral trehalaz enziminin (Nth1p) aktivitesinin fosforilasyon ile kontrol edildiği bilinmektedir. Nth1p fosforilasyonunun cAMP'ye bağlı protein kinaz tarafından yapıldığı bulunmuştur. Fakat Nth1p'nin kodlandığı *NTH1* geninin kontrol mekanizmaları hakkında ayrıntılı araştırmalar mevcut değildir. *NTH1* ve *NTH2* transkripsiyonlarının belirli bir bazal seviyede konstitutif olarak yapıldığı öne sürülmektedir (Singer ve Lindquist 1998).

Bu tez araştırmasında *NTH1* geni transkripsiyonuna etki eden sinyal iletim yolları incelenmiştir. Bu araştırmadan elde edilen sonuçlar *NTH1* geni transkripsiyonunun bazı üreme koşullarında aktive edildiğini göstermektedir. Araştırmalarımızda glukoz ve azot sinyal iletim yollarının *NTH1* geni transkripsiyonuna önemli derecede etki ettiği bulunmuştur.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. *S.cerevisiae*'de Glukoz Sinyal İletimi.

Glukoz, *S. cerevisiae* tarafından tercih edilen bir karbonhidrattır. Glukozun *S. cerevisiae* üreme ortamında belirli miktarda bulunması çeşitli sinyal iletim yollarını aktive eder (Belinchon ve Gancedo 2007). Üreme ortamında karbon ve enerji kaynağı olarak yüksek miktarlarda (%2 veya daha fazla) glukoz bulunduğunda sukroz, etanol, gliserol, galaktoz gibi alternatif karbon ve enerji kaynaklarının kullanımı glukoz baskılaması olarak bilinen mekanizma ile baskılanmaktadır (Gancedo 1998). Fermente edilemeyen gliserol veya laktat gibi alternatif karbon kaynaklarında üremekte olan *S. cerevisiae* kültürlerine glukoz eklenmesi ile de *S. cerevisiae*'daki genlerin %30'nun anlatımında değişme olduğu rapor edilmiştir (DeRisi ve ark. 1997, Wang ve ark. 2004). Bu tür üreme ortamlarına glukoz eklenmesi ile üreme hızı artar, bütün metabolizma yeniden programlanarak *S. cerevisiae* fermentatif mod'da üremeye başlar.

*S. cerevisiae*'da hücre zarında üreme ortamındaki farklı glukoz miktarlarını algılayabilen glukoz sensörleri bulunmaktadır. Bu glukoz sinyal iletim yollarından biri Snf3p (Sucrose non-fermenting) ve Rgt2p (Restoration of glucose transport) yollarıdır. Rgt2p, üreme ortamında yüksek glukoz (%1'den daha fazla) olduğu zaman aktive olur. Snf3p ise düşük glukoz (%0.1) ile aktive olan membran glukoz sensörüdür (Özcan ve ark. 1998). Bu glukoz sensörleri bir çeşit transkripsiyon faktörü olan Rgt1'i aktive ederek hedef genlerin glukoz miktarına göre düzenlenmesini sağlarlar.

*S. cerevisiae*'da glukoz algılanmasında kullanılan ikinci bir sensör sistem ise cAMP'ye bağlı olarak etkisini gösteren Protein Kinaz-A (PKA) yoludur. Bu sinyal iletim sistemi membranda yer alan Gpr1p sensör proteini ile aktive edilmektedir (Santangelo 2006). Gpr1p sensör proteini yüksek glukoz varlığında hızlı bir şekilde sitoplazmadaki cAMP sentezini aktive eder. Oluşan cAMP de PKA'yı aktive ederek hedef proteinlerin (enzim, yapısal protein ve transkripsiyon faktörlerinin) fosforlanması ile glukoz sinyaline hücresel yanıt oluşur (Santangelo 2006, Gancedo 1998, 2008).



*S. cerevisiae*'daki bu iki sinyal iletim yolunun aktivitesine bağlı olarak çeşitli sitoplazmik protein kinazların aktiviteleri de kontrol edilir. Bu protein kinazlardan en önemli olanı Snf1p'dir (Hardie 2007). Snf1p protein kinaz kompleksi düşük glukoz sinyali ile aktive edilmektedir. Yüksek glukoz konsantrasyonunda ise Snf1p kompleksi inaktiftir. Bu durumda aktivitesi Snf1p tarafından kontrol edilen bir çeşit represör olan Mig1p aktiftir. Aktif Mig1p alternatif karbonhidrat kaynaklarının kullanımı ile ilgili enzim veya yapısal protein kodlayan genlerin transkripsiyonunu baskılar. Bu olay *S. cerevisiae*'da glukoz baskılaması (Glucose Repression) olarak adlandırılır (Ronne 1995, Gancedo 1998). Düşük glukoz veya alternatif karbon kaynakları bulunduğunda ise aktif durumdaki Snf1p, Mig1p'yi fosforlayarak inaktive eder. Bu durum da *S. cerevisiae*'da glukoz derepresyonu olarak adlandırılır. Birçok genin transkripsiyonu *S. cerevisiae*'da glukoz baskılaması veya depresyonu ile kontrol edilir.

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

## **2.2. *S. cerevisiae*'de Trehaloz Metabolizması.**

Değişen çevresel şartlara yanıt olarak *S. cerevisiae* hücreleri içindeki glikojen ve trehalozun miktarları büyük değişkenlikler gösterir. Bu bileşiklerin metabolizması kompleks düzenleyici sistemlerle kontrol edilir. Trehaloz bir çeşit disakkarit olup kimyasal yapısı glukoz- $\alpha$ 1-1-glukoz dimeridir. Trehaloz birçok mikroorganizmada, bazı bitkilerde ve hatta bazı omurgasız hayvanlarda stres metaboliti olarak sentezlenerek depo edilmektedir (Singer ve Lindquist 1998, François ve Parrou 2001).

*S. cerevisiae*'da trehalozun biyosentezi ve hücrede birikimi üreme koşullarına bağlı olarak birçok enzimatik olay sonucu gerçekleşir (Plourde-Owobi ve ark. 2000). Trehaloz metabolizmasında yer alan enzimler ve işlevleri özet olarak Çizelge 2. 1'de verilmektedir. Trehaloz glikolitik yola bağlı olarak sitoplazmada Trehaloz Fosfat Sentaz (TPS) kompleksi olarak bilinen enzim tarafından sentezlenir.

**Çizelge 2.1.** Trehaloz metabolizması genleri ve kodladıkları enzimler.

GEN	ÜRÜNÜ	FONKSİYONU
<i>TPS1</i>	Trehaloz-6-P sentaz	Trehaloz sentezi
<i>TPS2 (TPP)</i>	Trehaloz-6-P fosfotaz	Trehaloz-6-P defosforilasyonu
<i>TSL1 ve TPS3</i>	Düzenleyici alt birimler	TPS kompleksinin stabilitesi
<i>NTH1</i>	Nötral, sitosolik trehalaz	Trehaloz yıkımı
<i>ATH1</i>	Asidik, vakuolar trehalaz	Trehaloz yıkımı

Trehaloz biyosentezinde kullanılan substratlar UDP-Glukoz ve Glukoz-6 fosfat'tır. Önce bu iki monosakkarit TPS kompleksinin alt birimi olan Tps1p tarafından trehaloz-6 fosfata dönüştürülür (Cabib ve Leloir 1958). Daha sonra aynı enzim kompleksinde bulunan katalitik alt birim Tps2 tarafından defosforilasyonla Trehaloz birimine dönüştürülür. Trehaloz biyosentezi için gerekli olan TPS enzim kompleksi 4 alt birimden oluşmaktadır. Bu alt birimler Tps1p, Tps2p, Tps3 ve Tsl1'dir (Bell ve ark. 1998). Tps1p bu enzim kompleksinin en küçük alt birimi olup TPS enzim kompleksinin katalitik alt birimidir. Tps2 ise trehaloz-6 fosfataz aktivitesi olan enzimdir. Tsl1p enzim kompleksindeki en büyük alt birim olup protein seviyesinde Tps3p ile %55 benzerlik gösterir. Tps3p ve Tsl1p'nin işlevlerinin TPS enzim kompleksinin aktivitesini sağlamak olduğu gösterilmiştir (Bell ve ark. 1998).

*S. cerevisiae* sitoplazmasında bulunan trehalozun önemli işlevi ısı şoku, ozmotik stres ve diğer abiyotik stres koşulları oluştuğunda hızlı bir şekilde sentezlenerek hücre içi bileşenlerini denaturasyondan korumaktır (Argüelles 2000, Francois ve Parrou 2001). Bu işlevine bağlı olarak özellikle biyosentetik alt birim olan Tps1'nin

transkripsiyonunun stres koşullarında aktive edildiği bilinmektedir (Parrou ve ark. 1997, Parrou ve ark. 1999). Trehaloz biyosentezinden sonra üreme ortamı koşulları normale döndüğünde hızlı bir şekilde glukozu parçalanır. Bunun için gerekli olan enzim ise nötral trehalazdır. Nötral trehalaz ile ilgili bilgiler bölüm 2.3'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

*S. cerevisiae*'da trehaloz'un streslere karşı koruyucu molekül olma özelliğine ek olarak bir diğer işlevi de *S. cerevisiae*'ya glukoz girişini kontrol etmek ve buna bağlı olarak da glikolizi kontrol etmektir. *TPS1* geni delesyonlu *S. cerevisiae* suşlarının glukozda üremedikleri, galaktoz veya gliserol laktat'da ise normal *S. cerevisiae* suşu gibi üredikleri belirlenmiştir (Thevelein ve Hohmann 1995).  $\Delta tps1$  mutanları *S. cerevisiae* hücrelerinin galaktoz içeren ortamdan glukozu aktarıldıklarında glukoz toksisitesi oluştuğu ve hızlı bir şekilde sitoplazmik ATP miktarında düşüş olduğu, glukoz 6 fosfatın da fazla miktarda biriktiği belirlenmiştir (Blazquez ve ark. 1993, Eastmond ve Graham 2003). Yapılan in-vitro çalışmalarda da Trehaloz-6 fosfatın glikolitik yoldaki ilk enzim olan Hezkokinazları inhibe ettiği gösterilmiştir (Blazquez ve ark. 1993). Bu şekilde trehaloz-6 fosfatın hezkokinazlara etki ederek glukozun kontrolsüz bir şekilde glikolize girişini engellediği ve glikolizi de kontrol ettiği bulunmuştur (Blazquez ve ark. 1993, Eastmond ve Graham 2003).

### **2.3. *S. cerevisiae* NTH1 Geninin Yapısı ve İşlevi.**

*S. cerevisiae* da *NTH1* (Neutral Trehalase 1) geni tek kopya gen olarak IV. kromozom üzerinde yer almaktadır. *NTH1* geninin sistematik adı YDR001c'dir. *NTH1* geni trehalase aktivitesi içermeyen mutant *S. cerevisiae* suşunda komplementasyon ile klonlanmıştır (Kopp ve ark. 1993). Komplementasyon ile klonlama tekniğine uygun olarak yaban tip *S. cerevisiae* suşunda *NTH1* geni delesyonu yapıldığında bu suşta trehalase enzim aktivitesinin olmadığı da gösterilmiştir (Kopp ve ark. 1993).

*NTH1* geni kodlama bölgesinin 2079 bp uzunlukta olduğu, intron içermediği ve 693 amino asit büyüklüğünde ve yaklaşık 80 kDa ağırlığında nötral trehalaz enzimini

(Nth1p) kodladığı belirlenmiştir (Kopp ve ark. 1993). Nötral trehalaz enziminin, enzim sınıflandırma sistemine göre kod numarası E.C: 3.2.1.28'dir. Bu enzimin optimum pH'sının 6.8-7.0 aralığında olduğu ve sitoplazmik bir enzim olduğu bulunmuştur (App ve Holzer 1989). Nth1p'nin yapısal özellikleri ve aktivitesinin kontrol mekanizmaları ile ilgili yapılan çalışmada bu enzimin fosfoprotein olduğu ve protein kinaz A tarafından fosforlandığı bulunmuştur (App ve Holzer 1989). Nth1p'nin enzimatik aktivitesinin fosforilasyon ve defosforilasyon ile kontrol edildiği de gösterilmiştir (App ve Holzer 1989). Bununla birlikte Nth1p'ni defosforile eden protein fosfatazların hangileri olduğu henüz bilinmemektedir.

*S. cerevisiae*'nin genom yapısı belirlendikten sonra genom analizi sırasında *NTH1* geni ile yüksek düzeyde homoloji gösteren ikinci bir gen daha belirlenmiştir. *NTH2* olarak adlandırılan bu gen ise *S. cerevisiae*'nin II. kromozomunda yer alır ve *NTH1* geni ile protein seviyesindeki benzerliği yaklaşık olarak %77 olarak belirlenmiştir. *NTH2* geninin (YBR001c) hücredeki işlevi henüz tam olarak belirlenmemiştir.  $\Delta$ *nth1* mutanti *S. cerevisiae* suşlarında trehaloz yıkımı gözlenmezken  $\Delta$ *nth2* mutanti *S. cerevisiae* suşlarında trehaloz metabolizmasıyla ilgili herhangi bir anormallik bulunmamaktadır (Nwaka ve ark. 1995a, 1995b).  $\Delta$ *nth2* mutanti *S. cerevisiae* hücrelerinde sitoplazmik trehaloz konsantrasyonu ve trehalaz aktivitesinde herhangi bir değişiklik olmadığı rapor edilmektedir (Nwaka ve ark. 1995a, 1995b).

*NTH1* geni transkripsiyonu ve Nth1p enzimatik aktivitesinin farklı stres koşullarındaki kontrol mekanizmaları ile ilgili olarak çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. *NTH1* transkripsiyonunun ve Nth1p enzimatik aktivitesinin ısı şoku ile aktive edildiği gösterilmiştir (Nwaka ve ark. 1995a, 1995b). *NTH1* geni transkripsiyonunun ısı şoku ile aktivasyonunda bu genin promotor bölgesinde belirlenen ve Stress response Element (STRE) nükleotid dizisi olarak adlandırılan 5'-CCCT-3' nükleotid dizilerinin gerekli olduğu gösterilmiştir (Nwaka ve ark. 1995a, 1995b). Isı stresine ek olarak *NTH1* geni transkripsiyonunun ve Nth1p enzimatik aktivitesinin oksidatif stres ve metal stresi gibi koşullarda da aktive edildiği bulunmuştur (Zahringer ve ark. 1997). Fakat bu streslere yanıt olarak *NTH1* geni transkripsiyonunu aktive eden faktörler henüz belirlenmemiştir. *S. cerevisiae*'da *NTH1* geni anlatımı ile ilgili olarak daha önce

yapılan bu moleküler genetik ve biyokimya çalışmaları *NTH1* geni anlatımının hem transkripsiyonel ve hem de post-translasyonel olarak protein fosforilasyonu ile kontrol edildiğini göstermektedir.

*S. cerevisiae*'da nötral trehalaz'a ek olarak bir de asit trehalaz enzimi (Ath1p) olduğu bulunmuştur. Ath1p'nin optimum pH'nın 4.5-5.0 aralığında olduğu belirlenmiştir (Francois ve Parrou 2001). Asit trehalaz enzimini kodlayan gen klonlanarak *ATH1* (YPR026w) olarak adlandırılmıştır (Nwaka ve ark. 1996, Francois ve Parrou 2001). Ath1p'nin çoğunlukla *S. cerevisiae* vokuolunda bulunmakla birlikte periplazmik alana da salgılandığı bulunmuştur (Jules ve ark. 2004).

#### **2.4. *S. cerevisiae* Azot Sinyal İletim Yolu.**

*S. cerevisiae*'da farklı azot kaynaklarının hücre içine alınması ve kullanımı da bir çeşit sinyal iletim mekanizmasıdır ve bunun sonucu olarak aktive edilen sitoplazmik protein kinazlar ile transkripsiyon faktörlerinin kontrolünde gerçekleşmektedir (Cooper 2002, Magasanik ve Kaiser 2002). *S. cerevisiae* tarafından öncelikli olarak azot kaynağı olarak kullanılan maddeler amonyum tuzları ve glutamin amino asididir. Üreme ortamında bu bileşikler olmadığı zaman *S. cerevisiae*'da azot sinyal iletim yolu aktive edilerek çeşitli azotlu bileşikler de azot kaynağı olarak kullanılmaktadır. Alternatif azot kaynağı olarak kullanılabilen bileşikler serbest amino asitler (öncelikli olarak prolin), allantion ve üre gibi azotlu bileşiklerdir (ter Schure ve ark. 2000). *S. cerevisiae*'da azot sinyal iletim yolu da en az glukoz sinyal iletim yolu kadar metabolik aktivitelere ve gen anlatımına etki etmektedir. Son yıllarda gerçekleştirilmiş olan bir mikroarray analizi sonucu elde edilen bulgulara göre *S. cerevisiae*'daki genlerin yaklaşık %25'inin anlatımı azot sinyal iletim yolu tarafından kontrol edilebilmektedir (Usaite ve ark. 2006). Bu genlerin transkripsiyonları üreme ortamındaki azot kaynaklarına göre aktive edilmekte veya baskılanmaktadır (Usaite ve ark. 2006). *S. cerevisiae*'da protein kodlayan gen sayısının yaklaşık 6200 olduğu kabul edildiğinde en az 1550 genin transkripsiyonunun azot sinyal iletim yolu ile kontrol edildiği var sayılabilir.

*S. cerevisiae*'da azot kaynaklarına göre aktivitesi kontrol edilen ve bu sinyal iletim yolunda sitoplazmik sensör olarak kullanılan protein Ure2p'dir. *S. cerevisiae* üreme ortamında tercih edilen azot kaynakları bulunduğunda Ure2p GATA faktörleri olarak bilinen bir grup transkripsiyon faktörünü aktive ederek alternatif azot kaynaklarının kullanımında işlevi olan genlerin transkripsiyonlarının baskılanmasını sağlar (Cooper 2002). Ure2p işlevsel olmadığı zaman da baskılanan genler aktive edilerek alternatif azot kaynaklarının kullanımı ile ilgili proteinler kodlanır. Azot sinyal iletim yolunda aktivatör olarak kullanılan transkripsiyon faktörleri Gln3p ve Gat1p'dir. Bu faktörler hedef genlerin promotor bölgelerindeki 5'GATAA-3' dizilerine bağlanarak transkripsiyonu aktive etmektedirler. Azot sinyal iletim yolunda represör olarak işlevi olan faktörler ise Dal80p ve Deh1p'dir. Bu represör proteinler de aktivatörler gibi benzer dizilere bağlanmaktadır. GATA faktörleri (transkripsiyon aktivatör ve represörleri) karşılıklı olarak birbirinin aktivitelerini de kontrol etmektedirler (Coffman ve ark. 1997). GATA faktörlerinin homodimer veya heterodimer oluşturdukları ve GATAA dizisine bağlanmalarının dimerizasyon durumlarına göre farklı olabildikleri de belirlenmiştir (Svetlov ve Cooper 1998, Rai ve ark. 1999).

*S. cerevisiae*'da azot sinyal iletim yolunun TOR proteinleri tarafından da kontrol edildiği gösterilmiştir (Cooper 2002, Orlova ve ark. 2006). TOR kinazlar (Tor1p ve Tor2p) *S. cerevisiae*'da genel besin durumunu algılayan protein kinazlar olup bütün eukaryotlarda bulunmaktadır (Hay ve Sonenberg 2004). Tor kinazların azot sinyal iletim yoluna bağlı olarak, Snf1p'nin aktivitesini kontrol ettikleri de gösterilmiştir (Orlova ve ark. 2006). Snf1p'nin glukoz sinyal iletim yolunda gerekli bir protein kinaz olduğu üreme ortamında düşük glukoz veya alternatif karbon kaynağı olarak gliserol laktat gibi bileşiklerin olması durumunda aktive olduğu bilinmektedir (Gancedo 1998).

### 3.MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Araştırmada Kullanılan *S.cerevisiae* Suşları ve Üretilmesi.

Bu araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşlarından YST124 (BY4741), YST125 (BY4743), YST159 (Y14311), Frankfurt Üniversitesi *S. cerevisiae* koleksiyonundan sağlandı. Parantez içindeki kod numaraları bu *S. cerevisiae* suslarının Frankfurt Üniversitesi tarafından verilen kod numaralarını göstermektedir. YST124 suşu araştırmalarımızda normal (yaban tip), standart haploid *S. cerevisiae* suşu olarak kullanıldı. *S. cerevisiae* YST124 suşunun genomu tümüyle sekanslanmıştır ve metabolik yollarla ilgili genlerde herhangi bir mutasyon içermediği bilinmektedir. *S. cerevisiae* YST125 suşu ise standart diploid suş olarak kullanıldı. *S. cerevisiae* YST159 suşu YST124 suşu ile izogenik olup *SNF1* geni delesyonla bu suşun genomundan çıkarılmıştır. Bu suş araştırmalarımızda  $\Delta snf1$  mutant suşu olarak kullanıldı. YST182 ve YST184 suşları da izogenik suşlar olup Dr. E. Dubois'dan (Univ. Libre. Bruxelles, Belcika) sağlandı. YST182 normal suş, YST184 ise transkripsiyon faktörleri Gln3p ve Gat1p içermeyen ( $\Delta gln3/\Delta gat1$ ) mutant suş olarak kullanıldı.

*S. cerevisiae* suşları University of Frankfurt ve Dr. E. Dubois'den YPD besiyeri içeren 2 ml'lik kültür tüplerinde canlı suşlar olarak sağlandı. Bu suşlar araştırmalarımızda standart zengin besiyeri olarak kullanılan YPD (Yeast ekstrakt, Pepton, Dekstroz) petrilere çizgi ekimi yapılarak tekrar üretildi. Uzun süreli stok oluşturmak için YPD petrilere taze üretilmiş *S. cerevisiae* suşlarından 1 ml steril %20 gliserol içeren mikrofuj tüplerine steril kürdanlar ile örnek alınarak  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki derin dondurucuda saklandı. Kısa süreli kullanım amacı ile YPD petrilereindeki *S. cerevisiae* suşları  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki buz dolabında saklandı. Araştırmalarımızda kullanılan besiyerlerinin içerikleri ve hazırlanışları Ek-1'de verildi.

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

<i>S. cerevisiae</i> Suşu	Genotipi ve ilgili mutasyonlar
YST124	MAT a, his3 $\Delta$ 1, leu2 $\Delta$ 0, met15 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0. (Haploid, Yaban tip)
YST125	MAT a/ $\alpha$ , his3 $\Delta$ 1/his3 $\Delta$ 1, leu2 $\Delta$ 0/leu2 $\Delta$ 0, lys2 $\Delta$ 0/LYS2, MET15/met15 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0/ura3 $\Delta$ 0. (Diploid, Yaban tip)
YST159	MAT a, his3 $\Delta$ 1, leu2 $\Delta$ 0, met15 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0, YDR477w::kanMX4 (snf1 mutanı)
YST182	MAT $\alpha$ , ade2 $\Delta$ ::hisG, his3 $\Delta$ 200, leu2 $\Delta$ 0, lys2 $\Delta$ 0, met15 $\Delta$ 0, trp1 $\Delta$ 63, ura3 $\Delta$ 0. (Haploid, Yaban tip)
YST184	MAT $\alpha$ , ade2D::hisG, his3 $\Delta$ 200, leu2 $\Delta$ 0, lys2 $\Delta$ 0, met15 $\Delta$ 0, trp1 $\Delta$ 63, ura3 $\Delta$ 0, gln3::KanMX4, gat1::KanMX4. ( $\Delta$ gln3/ $\Delta$ gat1 mutanı)

### 3.2. Araştırmada Kullanılan Plazmidlerin Yapısı ve Transformasyonu.

Araştırmamızda kullanılan Nth1-lacZ ve Cyc1-lacZ gen füzyonlarını içeren plazmitler farklı araştırmacıardan sağlandı. Bu plazmitler YE<sub>p</sub> plazmitleri (Yeast Episomal plazmit) olup 2 $\mu$ m-URA3 mekik plazmitleri olarak da adlandırılmaktadırlar. Bu plazmitlerde *E. coli*'de replikasyon ve seleksiyon için sırasıyla ColE replikasyon orijini ve Ampisiline direnç sağlayan  $\beta$ -laktamaz geni (bla), *S. cerevisiae*'da replikasyon ve seleksiyon için 2 $\mu$ m replikasyon orijini ve URA3 geni bulunmaktadır (Rose ve ark. 1990). Nth1-lacZ gen füzyonunun içeren plazmit'de *NTH1* geni promotor bölgesinin ilk 770 bç uzunluktaki bölgesi bulunmaktadır (Parrou ve ark. 1997). Bu plazmitteki *NTH1* geni promotor bölgesinin *NTH1* geni transkripsiyonu için gerekli olan bütün kontrol bölgelerini içerdiği bilinmektedir (Parrou ve ark. 1997).



Cyc1-lacZ gen füzyonunu içeren YE<sub>p</sub> plazmiti deneylerimizde kontrol gen füzyonunu içeren plazmit olarak kullanıldı. *CYC1* geni (Cytochrome C-1) transkripsiyonunun glukoz baskılaması ile kontrol edildiği daha önce yapılan araştırmalar ile gösterilmiştir (Guarente ve Ptashne 1981, Guarente 1983). YE<sub>p</sub> plazmitlerinin standart *S. cerevisiae* suşlarında ve seçici üreme ortamı koşullarında *S. cerevisiae* hücrelerinde stabil olarak kaldıkları daha önce yapılan araştırmalarla gösterilmiştir (Liao ve ark. 1993).

Araştırmalarımızda kullanılan Nth1-lacZ ve Cyc1-lacZ plazmitlerinin çoğaltılması için bu plazmitler önce *E. coli* DH5 $\alpha$  hücrelerine CaCl<sub>2</sub>-MgCl<sub>2</sub> metodu kullanılarak transform edildi (Ausubel ve ark. 1993). *E. coli* transformantları LB-Ampisilin petrilere ekildi. Bu petrilere tek koloni seçilerek 5 ml'lik sıvı LB-ampisilin içeren steril 25 ml lik erlenlere ekim yapıldı ve transformant bakteriler 16-18 saat 37 C'de 140 dönüş/dakika hızda çalışan çalkalamalı inkübatörde üretildi. Transformant *E. coli* suşlarından Nth1-lacZ ve Cyc1-lacZ plazmitleri Roche firmasından sağlanan plazmit saflaştırma kiti kullanılarak üretici firma tarafından açıklandığı şekilde saflaştırıldı. Saflaştırılan plazmitler 100  $\mu$ L 1xTE çözeltisinde -20 °C'deki derin dondurucuda saklandı.

Araştırmalarımızda kullanılan Nth1-lacZ ve Cyc1-lacZ gen füzyonu plazmitleri ilgili *S. cerevisiae* suşlarına lityum asetat polietilen glikol (LiOAc + PEG) metodu kullanılarak Rose ve ark. (1990) tarafından açıklandığı şekilde transform edildi (Rose ve ark. 1990). *S. cerevisiae* YST124, YST125 ve YST159 transformantları SC-Urasil (Sc-Ura) besiyeri içeren petrilere ekildi. YST182 ve YST184 transformantları ise okzotrofik oldukları amino asitleri içeren YN + % 0.1 glutamin ve %2 glukoz içeren petrilere ekildi. Transformantlar 30 °C'deki etüvde 3-4 gün bekletilerek kolonilerin oluşumu sağlandı. Transformantlardan tek koloniler seçilerek taze SC-Ura veya ilgili YN petrilere küçük pasajlar (1cm x1cm ebatlarında) yapıldı. Transformantları içeren pasaj yapılmış petrilere de 30 °C'de 3-4 gün inkübe edilerek *S. cerevisiae* transformantlarının petrilere üremeleri sağlandı. *S. cerevisiae* transformantlarını içeren petrilere araştırmalarımız süresince +4 °C'deki buzdolabında saklandı.

### 3.3. *NTH1* Transformantlarının Farklı Koşullarda Üretilmesi .

*NTH1* geni transkripsiyonuna üreme aşamaları ve ploidy nin etkilerini ölçmek için haploid (YST124) ve diploid (YST125) *S. cerevisiae* suşları transformantları 25 ml'lik erlenlerde 5 ml SC-Ura + %2 glukoz içeren sıvı besiyerinde her bir plazmit için 3'lü olarak standart şartlarda 16-18 saat üretilerek ön kültürler elde edildi. Bu ön kültürlerden 150-200 µl alınarak tekrar 5 ml'lik taze SC-Ura +%2 glukoz içeren 25ml'lik erlenlere ekim yapıldı ve bu maya transformantlarının standart şartlarda logaritmik faza veya durağan faza (48 saat) kadar üremeleri sağlandı. Üreme aşamaları sonunda sonunda maya hücreleri çöktürülerek aşağıda açıklandığı şekilde (bölüm 3.4) β-galaktozidaz aktivitelerinin ölçümü için hazırlandı.

*NTH1* transkripsiyonuna glukoz sinyal iletim yolunun etkileri iki farklı şekilde belirlendi. Önce *S. cerevisiae* transformantları Sc-Ura + %2 gliserol, %2 sodyum laktat (Gly/Lakt) veya %2 etanol içeren üreme ortamlarında standart şartlarda üretilerek hazırlandı ve β-galaktozidaz aktiviteleri belirlendi. Ayrıca *NTH1* geni transkripsiyonuna glukoz baskılamasının etkisini belirlemek için *S. cerevisiae* transformantları Sc-Ura gly/lakt veya etanol içeren ortamda logaritmik faza kadar üretilip bu aşamada üreme ortamlarına son konsantrasyonu %2 olacak şekilde steril glukoz ilave edilerek 4 saat daha üremeye bırakıldı. Üreme periodu sonunda *S. cerevisiae* transformantları çöktürülerek β-galaktozidaz aktiviteleri belirlendi.

*NTH1* geni transkripsiyonuna Snf1p kinazın etkilerini belirlemek için  $\Delta snf1$  mutanti *S. cerevisiae* hücreleri ve yaban tip *S. cerevisiae* transformantları önce standart şartlarda 10 ml Sc-Ura %2 glukoz içeren ortamda logaritmik aşamaya kadar üretildi. Bu aşamada *S. cerevisiae* kültürlerinden 5 ml alınarak santrifüjde 1000 g hızda 5 dakika çöktürüldü. Çöken *S. cerevisiae* hücreleri 5 ml steril saf su ile süspansiyon edilerek tekrar çöktürüldü. Çöktürülen *S. cerevisiae* hücreleri bu kez 5 ml Sc-Ura besiyerinde süspansiyon edilerek 25 ml lik erlenlere aktarıldı. Bu ortamlara da son konsantrasyonları %0.05 olacak şekilde steril glukoz ilave edilerek standart şartlarda 4 saat daha üremeleri beklendi. Üreme periodu sonunda *S. cerevisiae* hücreleri çöktürülerek β-galaktozidaz aktivitelerinin ölçümü için hazırlandı.

*NTH1* geni transkripsiyonuna azot sinyal iletim yolunun etkilerini belirlemek için farklı *S. cerevisiae* suşları (YST182 ve YST184) kullanıldı. SC-Ura ortamı çeşitli aminoasitleri içerdiğinden azot sinyal iletim yolunun etkilerini belirlemek için *S. cerevisiae* transformantları amonyum yerine glutamin veya prolin içeren YN+ %2 glukoz üreme ortamında üretildi (Ek1). Bu üreme ortamına azot kaynağı olarak son konsantrasyonu % 0.1 olacak şekilde steril glutamin veya prolin ilave edildi. *S. cerevisiae* transformantları standart üreme koşullarında glutaminli veya prolinli ortamda logaritmik faza kadar üretildi ve bu aşamaya kadar üretilen *S. cerevisiae* transformantları santrifüjde 1000 g de çöktürülerek  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesinin belirlenmesi için aşağıda açıklandığı şekilde hazırlandı.

#### **3.4. *S. cerevisiae*'da $\beta$ -Galaktozidaz Aktivitesinin Belirlenmesi.**

Yukarıdaki bölümlerde açıklandığı şekilde belirli üreme aşmalarına kadar standart şartlarda üretilen *S. cerevisiae* transformantları masaüstü santrifüjde 1000 g hızda 5 dakika çöktürüldü. Çöken transformantlar 1ml distile suda süspansiyon edildi ve 1.5 ml lik mikrosantrifuj tüplerine aktararak tekrar çöktürüldü. Çöktürülen maya hücrelerine 200  $\mu$ l Breaking Buffer ilave edilerek pipet ve vorteks yardımı ile süspansiyon edildi (Ek-1). Mikrofuj tüplerine alınan *S. cerevisiae* süspansiyonları -70 °C'deki derin dondurucuda  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesi ölçülünceye kadar bekletildi.  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesinin ölçümü için -70 °C'den alınan maya hücrelerinin çözünmesi için oda sıcaklığında 5 dakika beklendi. Daha sonra bu *S. cerevisiae* süspansiyonlarına 20  $\mu$ l Kloroform ve 20  $\mu$ l %0.1 SDS katılarak 10-15 saniye vortekslenildi ve permeabilize edilmiş *S. cerevisiae* lizatları elde edildi. Bu *S. cerevisiae* lizatlarından 20  $\mu$ l alınıp 980  $\mu$ l Z-Buffer (Ek1) içine eklendi ve sıcak su banyosunda 30 °C'de 2 dakika ön inkübasyona bırakıldı. Enzimatik aktivitenin ölçümü için reaksiyon tüplerine  $\beta$ -galaktozidaz enzimi substratı olan 200 $\mu$ l ONPG (Orto Nitro Phenyl Galactoside) ilave edildi ve yavaşça karıştırıldı. Reaksiyon ortamı orta koyulukta sarı renge dönüşünceye kadar 30 °C'de sıcak su banyosunda bekletildi ve reaksiyon süresi kaydedilerek reaksiyon ortamına 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisinden her tüp için 500  $\mu$ l katılarak  $\beta$ -galaktozidaz reaksiyonları durduruldu.  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesi daha önce

tanımlandığı şekilde hesaplandı (Ausubel ve ark. 1993, Guarente ve Ptashe 1981). Enzimatik reaksiyonlarda kullanılan permeabilize edilmiş *S. cerevisiae* lizatlarının protein miktarları da Lowry yöntemi (Ek1) ile belirlendi (Guarente ve Ptashe 1981). Bütün deneyler en az iki kez tekrarlandı. Her gurup deney için standart sapmanın daha önce rapor edildiği gibi %10 - %15 aralığında olduğu bulundu.  $\beta$ -galaktozidaz aktiviteleri dakikada 1 mg toplam protein içeriği tarafından hidroliz edilen nmol ONPG (nmol ONPG / dk/ mg protein) olarak verildi (Ek 2).

## 4. BULGULAR

### 4.1. *NTH1* Transkripsiyonuna Üreme Aşamalarının Etkileri.

*NTH1* geni trehaloz metabolizmasının kontrolü için *TPS1* geni ile birlikte önemli işlevi olan bir genidir. Trehaloz, *S. cerevisiae* hücrelerinde bazı stres koşulları ve besin eksikliğine yanıt olarak sentezlenmektedir. Araştırmamızın başlangıç aşamasında *NTH1* geninin *S. cerevisiae* üremesinin logaritmik ve durağan fazlarında nasıl kontrol edildiğini belirlemek için *Nth1-lacZ* gen füzyonunu içeren *S. cerevisiae* transformantları standart üreme koşullarında logaritmik veya durağan faza kadar üretildi. Bu transformantlarda *NTH1* promotoruna bağlı olarak transkripsiyonu yapılan *Nth1-lacZ* gen füzyonu transkriptinin hücresel seviyesi enzimatik olarak  $\beta$ -galaktozidaz aktiviteleri ölçülerek belirlendi. *Nth1-lacZ* transkripsiyonunun haploid *S. cerevisiae* hücrelerinin logaritmik üreme fazında 3497 ünite olarak gerçekleştiği bulundu. Fakat aynı genin haploid hücrelerin durağan faz aşamasındaki transkript seviyesinin yaklaşık olarak 2 kat artış ile 8118 ünite olarak gerçekleştiği bulundu (Çizelge 4. 1). *S. cerevisiae*'da gen dozunun veya ploidy'nin *NTH1* geni transkripsiyonuna etkileri bilinmemektedir. Ploidy'nin *NTH1* geni transkripsiyonuna etkilerini belirlemek için *NTH1* geni transkripsiyonu diploid *S. cerevisiae* hücrelerin farklı üreme aşamalarında da belirlendi. Diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde logaritmik fazda 2800 ünite olarak gerçekleşen *Nth1-lacZ* transkripsiyonunun durağan fazda da yaklaşık 2.5 katlık artışla 7656 ünite olarak gerçekleştiği bulundu.

Araştırmamızda kontrol gen füzyonu olarak da *Cyc1-lacZ* gen füzyonu kullanıldı. *Nth1-lacZ* gen füzyonu transformantları ile aynı koşullarda üretilen *Cyc1-lacZ* transformantlarında da *Cyc1* promotoruna bağlı olarak yapılan transkripsiyon seviyeleri enzimatik olarak belirlendi. Hem haploid hem de diploid hücrelerde logaritmik faz veya durağan fazda *Cyc1-lacZ* transkripsiyon seviyesinde önemli bir farklılık belirlenemedi. *Cyc1-lacZ* transkript seviyeleri diploid hücrelerde daha düşük seviyede olmakla birlikte 160-250 ünite aralığında ölçüldü.

**Çizelge 4.1.** Üreme aşamalarının *NTH1* geni transkripsiyonuna etkileri.

Gen Füzyonları	Haploid <i>S. cerevisiae</i>		Diploid <i>S. cerevisiae</i>	
	Log Faz*	Duragan Faz	Log Faz	Duragan Faz
Nth1-lacZ	3497 ± 214	8118 ± 512	2800 ± 155	7656 ± 401
Cyc1-lacZ	209 ± 13	196 ± 24	163 ± 12	193 ± 5

\*β-Galaktozidaz aktiviteleri (± standart sapma) dakikada hidroliz edilen nmol ONPG/mg toplam protein olarak verilmiştir.

#### 4.2. Farklı Karbonhidratların *NTH1* Geni Transkripsiyonuna Etkileri.

*S. cerevisiae*'da farklı üreme koşulları ve ploidy'nin *NTH1* geni transkripsiyonuna etkileri belirlendikten sonra haploid *S. cerevisiae* suşunda *NTH1* transkripsiyonuna farklı karbon kaynaklarının ve dolayısıyla glukoz sinyal iletim yolunun etkileri araştırıldı. Araştırmamızın bu bölümü için Nth1-lacZ ve Cyc1-lacZ gen füzyonlarını içeren yaban tip *S. cerevisiae* transformantları karbonhidrat kaynağı olarak glukoz, gliserol laktat veya etanol içeren sentetik tam üreme ortamında (Sc-Ura + %2 karbon kaynağı) logaritmik faza kadar üretildi. *S. cerevisiae* kültürleri logaritmik faza ulaştığında (yaklaşık OD<sub>600</sub>=1.0) hücreler çöktürüldü ve bu hücrelerde lacZ gen füzyonlarından yapılan transkript seviyeleri β-galaktozidaz aktiviteleri ölçülerek belirlendi.

Haploid *S. cerevisiae* hücreleri %2 glukoz içeren ortamda üretildiklerinde ortalama 3497 ünite olarak gerçekleşen transkripsiyonun fermente edilemeyen karbon kaynakları olan gliserol-laktat veya etanol ortamında önemli artış gösterdiği belirlendi (Çizelge 4. 2). Karbon kaynağı olarak %2 gliserol-laktat içeren üreme ortamında Nth1-lacZ transkripsiyonunun ortalama 3-kat artışla 11498 ünite olarak gerçekleştiği bulundu. Benzer şekilde etanol ortamında üretilen *S. cerevisiae* hücrelerinde de Nth1-lacZ

transkripsiyonunun glukoz ortamına göre ortalama 2-kat daha fazla yapılarak 7233 ünite olduğu belirlendi. (Çizelge 4. 2). Araştırmamızda kontrol gen füzyonu olarak kullanılan ve karbon kaynağına göre transkripsiyonunun düzenlendiği bilinen *Cyc1* geni transkripsiyonunun da beklendiği şekilde glukozlu ortamda düşük seviyede (209 ünite), gliserol-laktat veya etanol içeren ortamlarda ise önemli derecede aktive edilerek çok yüksek seviyelerde (sırasıyla 11498 ünite ve 7233 ünite) yapıldığı gözlemlendi (Çizelge 4. 2).

**Çizelge 4.2.** Farklı karbon kaynaklarının *NTH1* geni transkripsiyonuna etkileri.

<i>Gen Füzyonları</i>	% 2 Glukoz*	Gliserol-Laktat	Etanol
Nth1-lacZ	3497 ± 214	11498 ± 1962	7233 ± 141
Cyc1-lacZ	209 ± 13	11195 ± 337	4932 ± 98

\*β-Galaktozidaz aktiviteleri (± standart sapma) dakikada hidroliz edilen nmol ONPG/mg toplam protein olarak verilmiştir.

#### 4.3. Glukoz sinyalinin *NTH1* Geni Transkripsiyonuna Etkileri.

*NTH1* geni transkripsiyonunun fermente edilemeyen karbon kaynağı içeren üreme ortamında aktive edilmesi bu genin transkripsiyonunun glukoz sinyal iletimi ile kontrol edildiğini göstermektedir. *NTH1* geni transkripsiyonunun glukoz baskılaması ile kontrol edilip edilmediğini test edebilmek için gliserol laktat veya etanol de üretilen Nth1-lacZ gen füzyonu transformantları önce gliserol laktat veya etanol içeren ortamlarda logaritmik faza kadar üretildiler. Logaritmik fazda *S. cerevisiae* kültürlerine son konsantrasyonu %2 olacak şekilde glukoz ilave edildi. Daha sonra *S. cerevisiae* kültürleri standart şartlarda 4 saat daha üretilerek hücreler çöktürüldü ve Nth1-lacZ gen füzyonundan yapılan transkript seviyeleri belirlendi. Gliserol-laktat içeren ortamda üretilen *S. cerevisiae* transformantlarına %2 glukoz ilave edildiğinde Nth1-lacZ transkripsiyonunun ortalama 3 katlık bir düşüşle 11498 üniteden 4123 üniteye azaldığı bulundu (Çizelge 4. 2 ve 4. 3). Benzer bir şekilde logaritmik faza kadar etanol

ortamında üretilen *S. cerevisiae* kültürlerine son konsantrasyonu %2 olacak şekilde glukoz eklenmesi sonucu Nth1-lacZ transkripsiyonunun glukoz baskılaması sonucu önemli seviyede azalarak 7233 üniteden 4181 üniteye azaldığı belirlendi (Çizelge 4. 2 ve 4. 3). Araştırmamızda kontrol gen füzyonu olarak kullanılan Cyc1-lacZ gen füzyonu transkripsiyonunun glukoz baskılaması ile kontrol edildiği bilinmektedir. Cyc1-lacZ gen füzyonu transkripsiyonunun üreme ortamına glukoz ilave edilmesi ve bunun sonucu olarak oluşan glukoz baskılaması nedeniyle önemli derecede azalarak 4 saatlik süre sonunda ortalama 1500-2000 üniteye düştüğü belirlendi (Çizelge 4. 2, ve 4. 3).

**Çizelge 4.3.** Glukoz sinyalinin *NTH1* geni transkripsiyonuna etkileri.

<i>Gen Füzyonları</i>	<b>Gliserol laktat`dan Glukoza*</b>	<b>Etanol'den Glukoza</b>
Nth1-lacZ	4123 ± 212	4181 ± 313
Cyc1-lacZ	2221 ± 74	1574 ± 264

\*β-Galaktozidaz aktiviteleri (± standart sapma) dakikada hidroliz edilen nmol ONPG/mg toplam protein olarak verilmiştir.

#### **4.4. Snf1p Kinazın *NTH1* Geni Transkripsiyonuna Etkileri.**

*S. cerevisiae*'da glukoz sinyal iletiminde kullanılan en önemli protein kinaz Snf1p'dir (Sucrose non-fermenting) (Hong ve Carlson 2007). Snf1p alternatif karbonhidrat kaynakları veya düşük oranda glukoz varlığında aktive olarak hedef proteinleri fosforlayıp karbonhidrat metabolizmasına göre hücrel işlevlerin yeniden programlanmasını sağlar. *NTH1* geninin glukoz baskılaması ve dolayısıyla glukoz sinyali ile kontrol edildiği belirlendikten sonra Snf1p'nin bu işlemde fonksiyonu araştırıldı. Bunun için Nth1-lacZ gen füzyonunu içeren plazmit yaban tip ve  $\Delta snf1$  mutanlığı *S. cerevisiae* suşlarına ayrı ayrı transform edildi. Düşük ve yüksek konsantrasyonlarda glukoz içeren ortamlarda üretilen *S. cerevisiae* transformantlarında Nth1-lacZ geninden yapılan transkript miktarları enzimatik olarak β-galaktozidaz aktiviteleri ölçülerek belirlendi. Yaban tip *S. cerevisiae* suşunda maya hücreleri yüksek



glukozdan düşük glukoz içeren üreme ortamına aktarıldıklarında *NTH1* geni transkripsiyonunda yaklaşık 2.5 katlık bir artış olduğu bulundu (çizelge 4. 4). Yüksek glukozda 3235 ünite olan Nth1-lacZ geni transkripsiyonunun düşük glukoz içeren ortamda 4 saatlik bir inkübasyon süresi sonunda 8381 üniteye yükseldiği belirlendi. Aynı deney  $\Delta snf1$  mutanlığı *S. cerevisiae* hücreleri ile tekrarlandığında ise Nth1-lacZ geni transkripsiyonunun yüksek veya düşük glukoz içeren üreme ortamlarında yaklaşık olarak aynı miktarda (ortalama olarak 2418-2733 ünite) gerçekleştiği bulundu (Çizelge 4. 4).

Araştırmamızın bu bölümünde *S. cerevisiae* hücrelerinde glukoz sinyalinin işleyip işlemediğini belirlemek amacıyla pozitif kontrol olarak kullanılan Cyc1-lacZ gen füzyonu da kullanıldı. Bu gen füzyonundan yapılan transkripsiyonun beklendiği şekilde yaban tip *S. cerevisiae* hücrelerinde düşük glukoz içeren ortamda aktive edildiği ve transkripsiyonun 209 üniteye 749 üniteye yükseldiği görüldü.  $\Delta snf1$  mutanlığı *S. cerevisiae* hücrelerinde ise Cyc1-lacZ transkripsiyonunun Snf1p'nin eksikliği nedeniyle hem düşük ve hem de yüksek glukozda aynı seviyede gerçekleştiği belirlendi (Çizelge 4. 4). Bu sonuçlar araştırmamızda kullanılan yaban tip *S. cerevisiae* suşunda glukoz sinyal iletim yolunun işlevsel olduğunu, mutanlığı suşta bu sinyal iletim yolunun çalışmadığını göstermektedir.

**Çizelge 4.4.** Protein Kinaz Snf1p'nin *NTH1* transkripsiyonuna etkileri.

Gen Füzyonları	$\Delta snf1$ mutanlığı <i>S. cerevisiae</i>		Yaban tip <i>S. cerevisiae</i>	
	%2 Glukoz*	%0.05 Glukoz	%2 Glukoz	%0.05 Glukoz
Nth1-lacZ	2733 ± 271	2418 ± 720	3235 ± 50	8381 ± 284
Cyc1-lacZ	61 ± 7	63 ± 2	209 ± 13	749 ± 102

\* $\beta$ -Galaktozidaz aktiviteleri ( $\pm$  standart sapma) dakikada hidroliz edilen nmol ONPG/mg toplam protein olarak verilmiştir.

#### 4.5. Azot Sinyal İletim Yolunun *NTH1* Transkripsiyonuna Etkileri.

*S. cerevisiae*'da trehaloz metabolizmasına etki eden faktörlerden birisi de azot açlığıdır. Amonyum ve glutamin gibi azot kaynakları *S. cerevisiae* tarafından tercih edilen kaynaklardır. Bu bileşiklerin yokluğunda *S. cerevisiae* farklı azotlu bileşikleri de azot kaynağı olarak kullanır. Araştırmamızın bu bölümünde azot sinyal iletim yolunun *NTH1* geni transkripsiyonuna etkileri incelendi. Bunun için farklı bir yaban tip (YST182) ve azot sinyal iletimi yolunda hedef genleri aktive eden  $\Delta gln3-\Delta gat1$  transkripsiyon faktörlerini içermeyen izogenik mutant *S. cerevisiae* (YST184) suşları kullanıldı. Yaban tip ve izogenik mutant *S. cerevisiae* suşlarına Nth1-lacZ gen füzyonunu içeren plazmit ayrı ayrı transform edildi. Transformant *S. cerevisiae* hücreleri zengin azot kaynağı olarak glutamin ve azot açlığı sinyalini aktive eden prolin içeren üreme ortamlarında ayrı ayrı üretilerek Nth1-lacZ gen füzyonundan yapılan transkript seviyeleri enzimatik olarak belirlendi.

Yaban tip *S. cerevisiae* suşunda Nth1-lacZ gen füzyonundan yapılan transkripsiyonun azot açlığını uyaran prolinli üreme ortamında normal (glutaminli ortam) ortamda üretilen transformantlara göre yaklaşık %40 daha fazla gerçekleştiği bulundu (Çizelge 4. 5). Normal, glutamin içeren üreme ortamında 5678 ünite olarak gerçekleşen transkripsiyonun prolinli ortamda 8392 ünite olarak gerçekleştiği bulundu.

$\Delta gln3/\Delta gat1$  mutanti *S. cerevisiae* hücrelerinde ise azot sinyal iletim yolunun Nth1-lacZ gen füzyonundan yapılan transkripsiyona önemli miktarda bir etkisinin olmadığı belirlendi. Ayrıca, bu mutant *S. cerevisiae* suşunda hem normal ve hem de prolin içeren üreme ortamında Nth1-lacZ gen füzyonundan yapılan transkripsiyonda yaban tip suşa göre ortalama 2-2.5 kat bir azalma olduğu görüldü. Normal ortamda yaban tip suşda 5678 ünite olan Nth1-lacZ transkripsiyonunun aynı içerikli besiyerinde üretilen mutant suşta 2715 üniteye azaldığı belirlendi (Çizelge 4. 5). Prolinli ortamda üretilen mutant suşta Nth1-lacZ gen füzyonunda normal ortama göre az miktarda bir aktivasyon olduğu da belirlendi. Normal ortamda 2715 ünite olan transkripsiyonun prolinli ortamda yaklaşık %25 kadar artarak 3423 ünite olduğu bulundu (Çizelge 4. 5).

**Çizelge 4.5.** Azot sinyal iletiminin *NTH1* transkripsiyonuna etkileri.

<b>Gen Füzyonları</b>	<b>Yaban tip <i>S. cerevisiae</i></b>		<b><i>Δgln3/Δgat1</i> mutanlığı <i>S. cereveisiae</i></b>	
	<b>Glutamin*</b>	<b>Prolin</b>	<b>Glutamin</b>	<b>Prolin</b>
<b>Nth1-lacZ</b>	5678 ±563	8392 ±378	2715 ±476	3423 ±307

\*β-Galaktozidaz aktiviteleri (± standart sapma) dakikada hidroliz edilen nmol ONPG/mg toplam protein olarak verilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Trehaloz *S. cerevisiae*'da stres koşullarında sitoplazmada biriken ve koruyucu özelliği de olan bir metabolittir. Trehaloz aynı zamanda *S. cerevisiae*'da heksokinaz enzimlerine etki ederek glukozun hücrede glikolitik yola girişini de kontrol etmektedir. Bu işlevleri nedeni ile hem logaritmik ve hem de durağan faz ve olumsuz koşullarda sentez edilmektedir (Blasquez ve ark. 1993, Francois ve Parrou 2001). Trehaloz biyosentezi trehaloz enzim kompleksince (TPS) yapılırken hidrolizi de nötral ve asidik trehalaz enzimlerince yapılmaktadır. *S. cerevisiae*'da trehaloz miktarının belirli bir seviyede tutulabilmesi için her hem TPS ve hem de trehalaz enzimlerinin belirli oranlarda sürekli olarak aktif durumda olması gerekir.

Araştırmalarımızdan elde edilen sonuçlar nötral trehalaz enzimini kodlayan *NTH1* geninin bazal seviyedeki transkripsiyonunun oldukça yüksek seviyede yapıldığını göstermektedir. Trehaloz birikiminin en yüksek seviyede yapıldığı durağan faz da dahi *NTH1* transkripsiyonunun logaritmik fazdan daha fazla yapıldığı bulunmuştur. Bu sonuçlar *NTH1* geni transkripsiyonunun daha önce rapor edilen *TPS1* geni transkripsiyonuna paralel olarak yapıldığını göstermektedir. Böylece TPS tarafından sentez edilen trehalozun belirli bir hızla nötral trehalaz enzimi tarafından hidroliz edilerek trehalozun sitoplazmada fazla birikimi önlenmiş olabilir. Trehalozun hidrolizi ile açığa çıkan glukozun önemli bir bölümü de başka bir depo karbonhidratı olan glikojen biyosentezinde kullanılabilir. Bu şekilde fazla trehaloz ve bunun hidrolizi ile açığa çıkan sitoplazmik fazla glukozun metabolizmaya olumsuz bir etkisi olmadan başka bir depo karbonhidratı olan glikojene geri-dönüşümü sağlanmaktadır (Parrou ve ark. 1997).

Araştırmalarımız sırasında elde edilen bulgular *NTH1* geni transkripsiyonunun glukoz ve azot sinyal iletim yolları ile kontrol edildiğini göstermektedir. *NTH1* geni transkripsiyonunun düşük glukoz veya gliserol-laktat içeren ortamda aktive edildiği bulunmuştur. Düşük glukoz sinyali sitoplazmik protein kinaz olan Snf1p'yi aktive eder (Gancedo 1998). Elde ettiğimiz sonuçlar *NTH1* geni transkripsiyonunun  $\Delta snf1$  mutanı

hücrelerde düşük glukoz sinyaline yanıt olarak aktive edilmediğini göstermiştir. Bu mutant *S. cerevisiae* suşu ile elde edilen bu genetik sonuç *NTH1* geni transkripsiyonel aktivasyonunun önemli oranda Snf1p tarafından yapıldığını öne sürmektedir. Bununla birlikte bir protein kinaz olan Snf1'in hangi transkripsiyon faktörlerine etki ederek *NTH1* geni transkripsiyonunu aktive ettiği henüz tam olarak gösterilmemiştir. Daha önce yayımlanmış olan bir araştırmada *NTH1* geni promotor bölgesinde transkripsiyon faktörleri Msn2p ve Msn4p'nin bağlanma dizisi olan STRE dizisinin (5'-CCCCT-3') bazı stres koşullarında *NTH1* transkripsiyonu için gerekli olduğu bulunmuştur (Zahringer ve ark. 1997, 2000). Bu nedenle Snf1p tarafından aktive edilen ve *NTH1* geni transkripsiyonu için gerekli olan faktörlerden bazıları Msn2p ve Msn4p olabilir.

Araştırmalarımız sırasında *NTH1* geni transkripsiyonunun azot sinyal iletim yolu ile de kontrol edildiği ve azot açlığının *NTH1* geni transkripsiyonunu aktive edildiği bulunmuştur. Azot sinyal iletim yolunun aktivasyonu sonucu hedef genlerin transkripsiyonel kontrolü GATA faktörleri olarak bilinen transkripsiyon faktörlerince yapılmaktadır (Cooper 2002, Magasanik ve ark. 2002). Elde ettiğimiz sonuçlar GATA faktörleri olan Gln3p ve Gat1p'yi içermeyen *S. cerevisiae* suşunda azot açlığı durumunda *NTH1* geni transkripsiyonunun aktive edilmediğini göstermiştir. Bu sonuç da *NTH1* geni transkripsiyonunun azot sinyal iletim yolu ile de GATA faktörleri tarafından kontrol edilebildiğini öne sürmektedir. *NTH1* geni promotor bölgesinde yaptığımız incelemede GATA faktörlerinin bağlanma dizisi olan 5'-GATAA-3'nin çok sayıda bulunduğu görülmüştür.

*S. cerevisiae*'da *NTH1* geni anlatımının çoğunlukla translasyon sonrası fosforilasyon ile kontrol edildiği öne sürülmüştür (App ve Holzer 1989). Bu tez araştırmasından elde ettiğimiz sonuçlar ise *NTH1* gen anlatımının transkripsiyon seviyesinde de kontrol edildiğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

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

**App, H., Holzer, H. 1989.** Purification and characterization of neutral trehalase from the yeast ABYS1 mutant. *J. Biol. Chem.*, 264: 17583-17588.

**Argüelles, J.C. 2000.** Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: A comparative analysis. *Arch. Microbiol.*, 174: 217- 224.

**Belinchon, M.M., Gancedo, J.M. 2007.** Glucose controls multiple processes in *Saccharomyces cerevisiae* through diverse combinations of signalling pathways. *FEMS Yeast Research*, 7: 808-818.

**Bell, W.W., Sun, W., Hohmann, S., Wera, S., Reinders, A., DeVirgilio, C., Wiemken, A., Thevelein, J.M. 1998.** Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *J. Biol. Chem.*, 273: 33311-33319.

**Blazquez, M.A., Lagunas, R., Gancedo, C., Gancedo, J.M. 1993.** Trehalos-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Lett.*, 329: 51-54.

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

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

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

**Coffman, J.A., Rai, R., Loprette, D.M., Cunningham, T., Svetlov, V., Cooper, T.G. 1997.** Cross regulation of four GATA factors that control nitrogen catabolite gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 179: 3416-3429.

- Cooper, T.G. 2002.** Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: Connecting the dots. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26: 223-238.
- DeRisi, 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.
- Eastmond, P.J., Graham, I.A., 2003.** Trehalose metabolism: A regulatory role for trehalose-6-phosphate. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6: 231-235.
- François, J., Parrou, J.L. 2001.** Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25: 125-145.
- Gancedo, J.M. 1998.** Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 334-361.
- Gancedo, J.M. 2008.** The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32: 673-704.
- Guarente, L., Ptashne M. 1981.** Fusion of *Escherichia coli* lacZ to the cytochrom c gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78: 2199-2203.
- Guarente, L. 1983.** Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol.*, 101: 181-191.
- Hardie, D.G. 2007.** AMP-activated/SNF1 protein kinase: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 8: 774-785.
- Hay, N., Sonenberg, N. 2004.** Upstream and downstream of mTOR. *Genes and Dev.*, 18: 1926-1945.
- Hong, S.-P., Carlson, M. 2007.** Regulation of Snf1 protein kinase in response to environmental stress. *J. Biol. Chem.*, 23: 16838-16845.
- Jules, M., Guillou, V., François, J., Parrou, J.L. 2004.** Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 2771- 2778.
- Kopp, M., Müller, H., Holzer, H. 1993.** Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 268: 4766-4774.
- Liao, X.-B., Clare, J.J. Farabaugh, P.J. 1987.** The upstream activation site of a Ty2 element of yeast is necessary but not sufficient to promote maximal transcription of the element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 8520-8524.

- Magasanik, B., Kaiser, C.A. 2002.** Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 290: 1-18.
- Nwaka, S., Kopp, M., Holzer, H. 1995a.** Expression and function of the trehalase genes *NTH1* and *YBR0106* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 270: 10193-10198.
- Nwaka, S., Mechler, B., Destruelle, M., Holzer, H. 1995b.** Phenotypic features of trehalase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 360: 286-290.
- Nwaka, S., Mechler, B., Holzer, H. 1996.** Deletion of the *ATH1* gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose. *FEBS Lett.* 386: 235-238.
- Orlova, M., Kanter, E., Krakovich, D., Kuchin, S. 2006.** Nitrogen availability, and TOR regulate the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Euk. Cell*, 5: 1831-1837.
- Özcan, S., Dover, J., Johnston, M. 1998.** Glucose sensing and signaling by two Glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 17: 2566-2573.
- Parrou, J.L., Teste, M.A., François, J. 1997.** Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: Genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology*, 143: 1891-1900.
- Parrou, J.L., Enjalbert, B., Plourde, L., Bauche, A., Gonzales, B., François, J. 1999.** Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *YEAST*, 15: 191-203.
- Plourde-Owobi, L., Dunder, S., Goma, G., François, J. 2000.** Trehalose reserve in *Saccharomyces cerevisiae*: Phenomenon of transport, accumulation and role in cell viability. *Int. J. Food Microbiol.*, 55: 33-40.
- Rai, R., Daugherty, J.R., Cunninham, T.S., Cooper, T.G. 1999.** Overlapping positive and negative GATA factor binding sites mediate inducible *DAL7* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 274: 28026-28034.
- Ronne, H. 1995.** Glucose repression in fungi. *Trends Genet.*, 11: 12-17.
- Rose, M.D., Winston, F., Heiter, P. 1990.** *Methods in Yeast Genetics. A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.



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

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

**Svetlov, V.V., Cooper, T.G. 1998.** The *Saccharomyces cerevisiae* GATA factors Dal80p and Deh1p can form homo- and heterodimeric complexes. *J. Bacteriol.*, 180: 5682-5688.

**TerSchure, E.G., Natal, A.W.R., Verrips, C.T. 2000.** The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.*, 24: 67-83.

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

**Usaite, R., Patil, K.R., Grotkjaer, T., Nielsen, J., Regenber, B. 2006.** Global transcriptional and physiological responses of *Saccharomyces cerevisiae* to Ammonium, L-Alanine, or L-Glutamine limitation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 6194-6203.

**Wang, Y., Pierce, M., Schneper, L., Güldal, C.G., Zhang, X., Tavazoie, S., Broach, J.R. 2004.** Ras and Gpa2 mediate one branch of a redundant glucose signaling pathway in yeast. *Plos Biol.*, 2: E128.

**Zahringer, H., Burgert, B.M., Holzer, H., Nwaka, S. 1997.** Neutral trehalase Nth1p of *Saccharomyces cerevisiae* encoded by the *NTH1* gene is a multiple stress responsive protein. *FEBS Lett.*, 412: 615-620.

**Zahringer, H., Thevelein, J.M., Nwaka, S. 2000.** Induction of neutral trehalase Nth1 by heat and osmotic stress is controlled by STRE elements and Msn2/Msn4 transcription factors variations of PKA effect during stress and growth. *Mol. Microbiol.*, 35: 397-406.

## EKLER

### Ek 1: Araştırmada Kullanılan Besi Yerleri ve Çözeltilerin Hazırlanması.

#### 1: YPD (Yeast Ekstrakt, Pepton, Dekstroz)

Bu üreme ortamı araştırmalarımızda kullanılan *S. cerevisiae* suşlarını üretmek için zengin besiyeri (Seçici olmayan üreme ortamı) olarak kullanıldı. Bu üreme ortamını hazırlamak için 10 gram yeast ekstrakt, 20 gram pepton toplam 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü ve karışım 121 °C’de 25 dakika otoklavda steril edildi.

Katı, zenginbesiyeri olarak kullanılan YPD petrilerini hazırlamak için yukarıda belirtilen şekilde hazırlanan YPD sıvı besiyerine 20 gram/litre olacak şekilde agar eklendi ve 121 °C’de 25 dakika otoklavda steril edildi.

Bu üreme ortamına karbonhidrat kaynağı olarak glukoz ilave edildi. Glukoz % 20’lik stok çözelti olarak hazırlandı ve 121 °C’de 25 dakika otoklavda steril edildi. Steril glukoz kullanımdan hemen önce üreme ortamına son konsantrasyon %2 olacak şekilde besiyerine ilave edildi.

#### 2: Sentetik tam –Ura Üreme Ortamı (SC-ura )

Bu üreme ortamı *S. cerevisiae* transformantlarının üretilmesinde seçici besiyeri olarak kullanıldı. Bu besiyerini hazırlamak için 6.7 gram YNB (% 0.5 amonyumlu ve aminoasitsiz) 1 litre distile suda çözüldü. 121 °C’de 25 dakika otoklavda steril edildi. YNB katı besiyerini hazırlamak için, 20 gram/litre olacak şekilde sterilizasyondan önce agar ilave edildi. Aminoasit kaynağı olarak urasil içermeyen aminoasit karışımı (Sigma Y-1501) 1.92 gram/litre olacak şekilde kullanımdan hemen önce hazırlandı ve filtre ile steril edilerek YNB ortamına eklendi.

#### 3: LB (Luria-Bertani Broth)

Bu üreme ortamı E. Coli suşunu üretmek için zengin besi yeri olarak kullanıldı. LB ortamını hazırlamak için 10 gram tripton, 5 gram yeast ekstrakt, 10 gram NaCl toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü. Besiyeri 121 °C’de 25 dakika otoklavda steril edildi.

Transformant E. Coli hücrelerinin seçiminde kullanılacak LB-Ampisilin üreme ortamını hazırlamak için, filtre ile sterilize edilmiş ampisilin 100 mg/litre olacak şekilde bakteri transformantlarını ekim yapılmadan önce taze olarak üreme ortamına eklendi.

Katı besiyeri olarak LB petrilerini hazırlamak için ise LB sıvı besiyerine 15 gram/litre agar eklendi ve 121 °C'de 25 dakika otoklavda steril edildi. Ampisilin 100mg/litre olacak şekilde üreme ortamına sterilizasyondan sonra ilave edildi.

#### **4: Lityum Asetat-TE**

Bu karışım *S. cerevisiae* hücrelerinin transformasyonunda kullanıldı. 3.5 ml 250 mM Lityum asetat; 10 mM Tris pH:8.0, 1 mM EDTA pH:8.0 ile çözülerek hazırlandı.

#### **5: YN Minimal Üreme Ortamı**

Bu üreme ortamı *S. cerevisiae* da azot sinyal iletim yolu etkilerini incelemek için kullanıldı. Bunun için 1.7 g/l Yeast Nitrogen Base (amonyumsuz ve aminoasitsiz) distile suda çözüldü ve otoklavda steril edildi. Azot kaynağı olarak son konsantrasyonu %0.1 olacak şekilde filtre ile steril edilmiş glutamin veya prolin eklendi. Karbonhidrat kaynağı olarak da son konsantrasyonu %2 olacak şekilde steril %20lik stok çözültiden glukoz ilave edildi. YN minimal katı besiyeri hazırlamak için ortama son konsantrasyonu %2 olacak şekilde agar agar ilave edildi.

#### **6: Lizis Tampon Çözeltisi**

Bu çözelti üreme periodları sonunda *S. cerevisiae* transformantlarını süspense etmek için kullanıldı.

100 mM tris HCl pH:8.0

1 mM DL-Dithiothreitol

%20 (V/V) Gliserol

4mM Fenil Metil Sülfonil Fulorid

#### **7: Z-Buffer**

Bu tampon çözelti *S. cerevisiae* transformantlarında  $\beta$  galaktozidaz aktivitesini belirlemek için kullanıldı.

60mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

40 ml  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$   
10mM KCl  
1mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
50mM 2-Merkapto Ethanol

**8: a) Lowry A Çözeltisi**

% 2'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.1 N NaOH ' da çözülmüş)

**b) Lowry B Çözeltisi**

% 0.5 'lik  $\text{CuSO}_4$  (% 1' lik NaK-tartarat' da çözülmüş)

## Ek 2: $\beta$ - Galaktosidaz Aktivitesinin Hesaplanması.

*S. cerevisiae* transformantlarından transkribe edilen lacZ füzyonlarından sentezlenen  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktiviteleri aşağıda verilen formüle göre oluşturulan excel programı kullanılarak hesaplandı.

$\beta$ -Gal Unitesi:  $[\text{OD}_{420} \times 1.7] / [0.0045 \times \text{Protein Konsantrasyonu} \times \text{reaksiyondaki lizat hacmi} \times \text{zaman}]$

OD<sub>420</sub>: sarı rengin absorbansı

1.7: sarı rengin bulunduğu tüpün hacmi: 980  $\mu$ l Z buffer

20  $\mu$ l lizat

200  $\mu$ l ONPG

500  $\mu$ l NaCO<sub>3</sub>

0.0045 → ONPG'nin molar absorpsiyon katsayısı

Protein konsantrasyonu: mg/ml

Lizat hacmi: Değişken (ml)

Zaman → Sarı rengin oluştuğu zaman (dk)

$\beta$ -Galaktozidaz Unitesi dakikada hidroliz edilen nmol ONPG/mg toplam protein olarak verilmiştir.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Türkan TURAN  
Doğum Yeri ve Tarihi : Eskişehir, 21. 11. 1978  
Yabancı Dili : İngilizce  
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)  
Lise : Bursa Atatürk Lisesi/1995  
Lisans : Uludağ Üniversitesi/2000  
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi/2011  
Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Osmangazi Küçükdelliler İ.Ö.Ö/2010  
İletişim (e-posta) : tturkan\_t@yahoo.com  
Yayımları : ---