

***EST3* GENİNDE TRANSLASYONEL KONTROL
MEKANİZMALARININ MOLEKÜLER ANALİZİ**

Saliha Elif YILDIZHAN



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

***EST3* GENİNDE TRANSLASYONEL KONTROL MEKANİZMALARININ
MOLEKÜLER ANALİZİ**

Saliha Elif YILDIZHAN

Prof. Dr. Sezai TÜRKEL
(Danışman)

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

**BURSA-2015
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ ONAYI

Saliha Elif Yıldızhan tarafından hazırlanan “*EST3* Geninde Translasyonel Kontrol Mekanizmalarının Moleküler Analizi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Sezai Türkel

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

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

Üye: Yrd.Doç.Dr. Tülay Turgut Genç İmza.
Ç.O.M.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali Osman DEMİR
Enstitü Müdürü

17 / 06 / 2015

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.

17 / 06 / 2015

Saliha Elif YILDIZHAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

EST3 GENİNDE TRANSLASYONEL KONTROL MEKANİZMALARININ MOLEKÜLER ANALİZİ

Saliha Elif YILDIZHAN

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Telomerazın düzenleyici altbirimini kodlayan *EST3* geninin ifadesi programlı ribozomal çerçeve kayması tarafından translasyonel seviyede kontrol edilir. Est3p'nin kesintisiz translasyonu +1 çerçeve kayması ile gerçekleşir. Programlı çerçeve kayması yapılmadığında *EST3* mRNA'sının translasyonu dahili bir STOP kodonunda sonlandırılır ve bilinen bir fonksiyonu olmayan kesik bir Est3 peptidi üretilir. Bu çalışmada *EST3* genindeki çerçeve kayması veriminin farklı karbon kaynaklarında üretilen *S. cerevisiae*'da değişkenlik gösterdiği bulunmuştur. Yüksek glukoz konsantrasyonlarında üretilen yaban tip hücrelerdeki verim düşük glukoz ve alternatif karbon kaynağı olan gliserol laktat ile karşılaştırıldığında sırasıyla 2 ve 10 kat yüksek çıkmıştır. *Δsnf1* mutantlarında bu farkın kaybolduğu gösterilerek karbon kaynağı etkisinin glukoz sinyal yolağı aracılığıyla kontrol edildiğine dair bulgular elde edilmiştir. *Δasc1* ve *Δstm1* mutantlarında ise çerçeve kayması oranlarının yaban tip hücrelere oranla azaldığı gösterilerek Asc1 ve Stm1 proteinlerinin *EST3* programlı çerçeve kaymasında rol oynadığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *S. cerevisiae*, Programlı çerçeve kayması, Glukoz sinyal yolağı, Telomeraz, Translasyonel kontrol.

2015, XII + 47 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

MOLECULAR ANALYSIS OF THE TRANSLATIONAL CONTROL MECHANISMS IN THE *EST3* GENE

Saliha Elif YILDIZHAN

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

Supervisor: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

The expression of the *EST3* gene, which encodes the regulatory subunit of telomerase, is regulated by a programmed ribosomal frameshifting mechanism at the translation level. The full length Est3p is synthesized by +1 ribosomal frameshift. In the absence of the programmed ribosomal frameshift, the translation of the *EST3* mRNA is terminated at an internal stop codon and a truncated Est3 peptide with no known functions is produced. In this study, it has been shown that frameshifting efficiency in the *EST3* gene varies in *S. cerevisiae* according to the carbon source in which the cells are grown. When the frameshift efficiency in wild type cells grown in high glucose concentration was compared to that in cells grown in low glucose concentration and that in cells grown in the alternative carbon source glycerol lactate, it was found to be higher by 2-fold and 10-fold respectively. It was shown that in *Δsnf1* mutants, the carbon source effect is lost, which supports that the carbon source effect is controlled by glucose signaling. It was shown that in *Δasc1* ve *Δstm1* mutants, frameshift rates were lower than those in wild type cells and that the Asc1 and Stm1 proteins play a role in *EST3* programmed frameshifting.

Keywords: *S. cerevisiae*, Programmed ribosomal frameshifting, Glucose signaling, Telomerase, Translational control.

2015, XII + 47 pages

TEŐEKKÖR

Çalıőmalarımın her aőamasında destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve akademik hayata umutla bakmamı sağlayan danıőmanım Sayın Prof.Dr. Sezai TÖRKEL'e ve hayatım boyunca bana sonsuz maddi ve manevi destek gösteren, çalıőmalarımı kolaylaőtırmak için ellerinden gelen her őeyi yapan ve eğitime verdikleri yüksek değerle beni akademik çabalarımda motive eden sevgideğer ebeveynlerime ve anneanneme teőekkör ederim.

Saliha Elif YILDIZHAN

17. 06. 2015

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. Model Organizma Olarak <i>S. cerevisiae</i> 'nin Önemi..... | 3 |
| 2.2. Ribozomal Çerçeve Kaymasının Moleküler Mekanizması..... | 4 |
| 2.3. Est3p ve Telomeraz Kompleksi..... | 5 |
| 2.4. Est3p Translasyonunda Çerçeve Kayması..... | 7 |
| 2.5. <i>S. cerevisiae</i> 'da Glukozun Metabolik Etkileri..... | 8 |
| 2.5.1 <i>S. cerevisiae</i> 'da esas glukoz baskılama yolağı..... | 9 |
| 2.5.2 Glukoz Baskılamasında Snf1p'nin Önemi..... | 9 |
| 2.5.3 <i>S. cerevisiae</i> 'da Asc1p'nin Rolü..... | 13 |
| 2.5.4 <i>S. cerevisiae</i> 'da Stm1p'nin Rolü..... | 14 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM..... | 16 |
| 3.1. Araştırmada Kullanılan <i>S. cerevisiae</i> Suşları..... | 16 |
| 3.2. <i>S. cerevisiae</i> Suşlarının Transformasyon İçin Hazırlanması..... | 17 |
| 3.3. Araştırmada Kullanılan Plazmidler..... | 17 |
| 3.4. Plazmidlerin <i>E.coli</i> 'ye Transformasyonu ve Saflaştırılması..... | 18 |
| 3.5. Plazmitlerin <i>S. cerevisiae</i> 'ya Transformasyonu..... | 19 |
| 3.6. <i>S. cerevisiae</i> Transformantlarının Üretilmesi..... | 20 |
| 3.7. Çerçeve Kayması Oranlarının Ölçülmesi..... | 21 |
| 3.8. Farklı Karbon Kaynaklarının <i>S. cerevisiae</i> üreme hızına etkisinin ölçülmesi..... | 22 |
| 4. BULGULAR..... | 24 |
| 4.1. Farklı Karbon Kaynaklarının <i>S. cerevisiae</i> Üreme Hızına Etkileri..... | 24 |
| 4.2. Farklı Karbon Kaynaklarının <i>EST3</i> Çerçeve Kayması Oranına Etkileri..... | 25 |
| 4.3. <i>STMI</i> Geninin <i>EST3</i> Çerçeve Kayması Regülasyonundaki Rolü..... | 26 |
| 4.4. <i>ASC1</i> Geninin <i>EST3</i> Çerçeve Kayması Regülasyonundaki Rolü..... | 28 |
| 4.5. <i>SNF1</i> Geninin <i>EST3</i> Çerçeve Kayması Regülasyonundaki Rolü..... | 29 |
| 4.6. Hücrelerin Üreme Aşamalarının <i>EST3</i> Çerçeve Kayması Oranına Etkileri..... | 31 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 32 |
| KAYNAKLAR..... | 36 |
| EKLER..... | 43 |
| Ek 1: Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması..... | 43 |
| Ek 2: β -gal aktivitesi hesaplanması..... | 46 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 47 |

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

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

Kısaltmalar

Açıklama

| | |
|------------------|---|
| A: | Ribozomal aminoasil-tRNA bölgesi |
| ADP: | Adenozin difosfat |
| AMPK: | Adenozin monofosfat ile aktive edilen kinaz |
| ASC: | "Absence of growth Suppressor of Cyp" |
| asetil-CoA: | Asetil koenzim |
| ATP: | Adenozin trifosfat |
| CAT: | "Catabolite repression" |
| derepres: | Glukoz baskısı altında olmayan, "derepressed" |
| DNA: | Deoksiribonükleik asit |
| DR: | Glukoz baskısı altında olmayan, "derepressed" |
| <i>E. coli</i> : | <i>Escherichia coli</i> |
| E: | Ribozomal boş tRNA bölgesi |
| eEF3: | Translasyonel devam faktörü 3 |
| ELM: | "Elongated morphology" |
| EST: | "Ever shorter telomere" |
| GAL: | "Galactose metabolism" |
| GL: | Gliserol laktat |
| GLC: | "Glycogen" |
| h: | Guanin dışındaki baz |
| HXK: | "Hexokinase" |
| KD: | Katalitik Bölge |
| <i>lacZ</i> : | β -galaktozidaz geni |
| LB: | Luria Bertani sıvı besiyeri |
| Leu: | Lösin |
| M: | Molar |
| MAT: | Mating tipi |
| mg: | Miligram |

| | |
|------------------------|--|
| <i>MIG</i> : | "Multicopy inhibitor of GAL gene expression" |
| ml: | Mililitre |
| mM: | Milimolar |
| mRNA: | Mesajcı ribonükleik asit |
| nmol: | Nanomol |
| OD: | "Optical Density" |
| ONPG: | O-Nitro-Fenil- β -D- Galaktosidaz |
| P: | Ribozomal peptidil-tRNA bölgesi |
| PEG: | Polyetilen glikol |
| pH: | Hidrojen iyonu konsantrasyonu |
| PP1: | Protein fosfataz 1 |
| <i>prfB</i> : | "Peptide chain release factor 2" |
| R: | Glukoz baskılama, "repressed" |
| <i>RACK</i> : | "Receptor for activated C kinase" |
| RD: | Düzenleyici Bölge |
| <i>REG</i> : | "Resistance to glucose repression" |
| repress: | Glukoz baskısı altında olan, "repressed" |
| RF: | "Release factor" |
| RNA: | Ribonükleik asit |
| rpS: | Ribozomal küçük altbirim proteini |
| rRNA: | Ribozomal ribonükleik asit |
| <i>S. cerevisiae</i> : | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| S288C: | <i>S. cerevisiae</i> suşu |
| <i>SAK</i> : | "Snf1 activating kinase" |
| SC- Ura: | "Synthetic complete minus uracil" |
| SGD: | "Saccharomyces Genome Database" |
| <i>SIP</i> : | "SNF1-interacting Protein" |
| <i>SNF</i> : | "Sucrose non-fermenting" |
| <i>SSN</i> : | "Suppressor of SNF1" |
| <i>STM</i> : | "Suppressor of ToM" |
| <i>SUC</i> : | "Sucrose" |
| TE: | Tris-EDTA |
| TLC: | "Telomerase component" |
| <i>TOR</i> : | "Target of rapamycin" |
| <i>TOS</i> : | "Target of SBF" |
| tRNA: | Taşıyıcı ribonükleik asit |
| <i>TUP</i> : | "dTMP-uptake" |
| URA: | "Uracil" |
| Val: | Valin |
| WD: | Triptofan-aspartat |
| YNB: | "Yeast Nitrogen Base" |
| YPD: | "Yeast extract pepton dextrose" |

ŞEKİLLERİN DİZİNİ

| | <u>Sayfa</u> |
|--|---------------------|
| Şekil 2.1. Rf2p sentezinin +1 çerçeve kaymasıyla regülasyonu. | 5 |
| Şekil 2.2. Telomeraz kompleksinin bileşenleri. | 6 |
| Şekil 2.3. <i>EST3</i> geninin ve çerçeve kayması bölgesinin yapısı. | 7 |
| Şekil 2.4. <i>S. cerevisiae</i> 'da esas glukoz baskılama yolağı. | 11 |
| Şekil 2.5. <i>S. cerevisiae</i> 'da 80S ribozomun kriyo-elektron mikroskopuyla oluşturulan haritası. | 13 |
| Şekil 2.6. 40S Ribozomun başıyla 60S'in merkezi çıkıntısının Stm1p ile etkileşimi. | 15 |
| Şekil 3.1. <i>EST3-lacZ</i> gen füzyonlarını içeren plazmitlerin yapısı. | 18 |
| Şekil 4.1. Farklı karbon kaynaklarında <i>S. cerevisiae</i> üreme hızları. | 24 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | <u>Sayfa</u> |
|---|---------------------|
| Çizelge 3.1. Bu araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşlarının genotipleri. | 16 |
| Çizelge 4.1. Farklı karbon kaynaklarının yaban tip suşlarda çerçeve kaymasına etkileri. | 26 |
| Çizelge 4.2. Farklı karbon kaynaklarının $\Delta stm1$ hücrelerde çerçeve kaymasına etkileri. | 27 |
| Çizelge 4.3. Farklı karbon kaynaklarının $\Delta asc1$ hücrelerde çerçeve kaymasına etkileri. | 29 |
| Çizelge 4.4. Farklı karbon kaynaklarının $\Delta snf1$ hücrelerde çerçeve kaymasına etkileri. | 30 |
| Çizelge 4.5 Buldukları üreme aşamasının hücrelerde çerçeve kaymasına etkileri . | 31 |

1. GİRİŞ

S. cerevisiae küçük genom boyutu ve hücre kültürü üretiminin kolaylığı sayesinde gen regülasyonu mekanizmalarının araştırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Maya hücreleri ve daha gelişmiş diğer ökaryotlar arasında yüksek miktarda protein amino asit dizileri korunmuş durumda bulunmaktadır. Bu çalışmada telomeraz kompleksinin bir parçası olan Est3p'nin hücre içi seviyelerinin kontrol mekanizmaları araştırılmıştır.

Telomerler replikasyon sırasında kromozom uçlarının tam olarak kopyalanamaması problemini çözmek için özelleşmiş yapılardır. Telomeraz araştırmaları hem somatik hücrelerde yaşlılığın giderilmesi açısından ümit vadeci sonuçlar ortaya koymuştur, hem de kanser için bir tedavi stratejisi geliştirme potansiyeliyle heyecan uyandırmaktadır.

Maya telomerazının bir alt birimi olan Est3p'nin telomeraz aktivitesinde düzenleyici bir rol oynadığı bilinmektedir. *EST3* açık okuma çerçevesinde bir STOP kodonu bulunmaktadır ve translasyon sırasında tam boyutta ve fonksiyonel protein üretimi için bu stop kodonunun es geçilmesi gereklidir. Bu yüzden translasyonun devamı (elongation) sırasında tek bir nükleotit atlanarak okuma çerçevesinde +1 yönünde çerçeve kayması gerçekleşir. Çerçeve kayması verimi ise hücrel koşullar tarafından kontrol edilen ve bu yüzden protein üretiminin kontrolünde de etkin olabilen bir mekanizmadır. Bu araştırmada hücrel koşulların değişimine göre çerçeve kaymasının *EST3* ifadesinin kontrolünde bir basamak olarak kullanıldığı gösterilmiştir.

Araştırmamızda gen ifade kontrolünü yönetip yönetmediği araştırılan etken olarak karbon kaynağı seçilmiş ve farklı karbon kaynaklarında üretilen mayalarda çerçeve kayması oranları ölçülmüştür. *S. cerevisiae*'da glukoz sinyali maya karbon metabolizmasını düzenleyen en önemli öğelerden biridir ve karbon kaynağı seçiminin hücre üremesine doğrudan bir etkisi olduğu bilinmektedir. Yüksek glukoz konsantrasyonundaki hücreler gliserol laktat gibi alternatif karbon kaynaklarında

Üretilen hücelere oranla çok daha hızlı üremektedir. Hücrelerin hızla çoğalması genomun da hızla kopyalanması ihtiyacını doğurmaktadır. Genom kopyalanması için özelleşmiş telomeraz enziminin aktivitesinin de hücre bölünme hızıyla uyumlu olacak şekilde kontrol edilmesi olası görünmektedir. Hücre bölünme hızına doğrudan etki eden karbon kaynağı seçiminin telomerazın düzenleyici altbirimi olan Est3p'nin hücreiçi konsantrasyonuna da etki etmesi bu bağlamda değerlendirilebilir. Araştırmalarımızda karbon kaynağı seçiminin ereve kayması verimine olan etkisinin seçilen karbon kaynağının hücre bölünmesine olan etkisiyle uyumlu olduğu görülmüş ve glukoz sinyalinin bu etkiye sebep olan temel yolak olduğunu destekleyen veriler elde edilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Model Organizma Olarak *S. cerevisiae*'nin Önemi

1996 yılında ilk defa bir ökaryotun, *S. cerevisiae*'nin S288C suşunun genomu dizilenmiştir (Goffeau ve ark. 1996). Dizilenen genom ve hızla gelişen moleküler biyoloji yöntemleri ile birlikte uluslararası araştırma ortaklıklarının ve maya delesyon projesi ("the yeast deletion project") gibi büyük çaplı projelerin önü açılarak maya biyolojisi alanında büyük gelişimler görülmüştür (Winzeler ve ark. 1999). *S. cerevisiae* için çok zengin bir genetik araştırma yöntemi yelpazesi bulunması, organizmanın küçük genom boyutu ve kültür üretmenin kolaylığı sayesinde maya araştırmaları gen regülasyonu mekanizmaları ve başka hücrel süreçlerin keşiflerinde önemli bir rol oynamıştır. Maya araştırmalarından hızla elde edilebilen büyük miktarda veriler işlemsel biyolojide de gelişmelere yol açmış ve ökaryot hücrelerinin çalışmasının anlaşılmasında kapsamlı modellerin oluşturulmasını sağlayan sistemsel yaklaşımlara olanak sunmuştur (Duina ve ark. 2014). Genler hakkında bilgiler, yüksek çıktılı taramalarla üretilen veriler, yayınlar ve dizi bilgilerinin derlendiği SGD (Saccharomyces Genom Veribankası) sayesinde maya hakkında genetik ve biyolojik bilgiler toplu bir halde internet üzerinden kolaylıkla ulaşılabilir (Cherry ve ark. 2012). Ayrıca dünyanın ilk sentetik ökaryot hücresinin oluşturulması için tasarlanan uluslararası işbirliği için de organizma olarak *S. cerevisiae* seçilmiştir ve sentetik maya projesi ("the synthetic yeast project") tamamen sentetik bir *S. cerevisiae* suşu üretimi için kurulmuştur (Dymond ve ark. 2011). Maya ve mayadan büyük diğer ökaryot türleri arasında şaşırtıcı derecede yüksek miktarda protein amino asit dizisi ve görevinin evrimsel olarak korunmuş olması sayesinde *S. cerevisiae* daha gelişmiş ökaryotlar hakkındaki araştırmalarda da çok faydalı olmuştur ve hatta maya delesyon koleksiyonu insan hastalıklarının taramalarında da kullanılmıştır (Steinmetz ve ark. 2002).

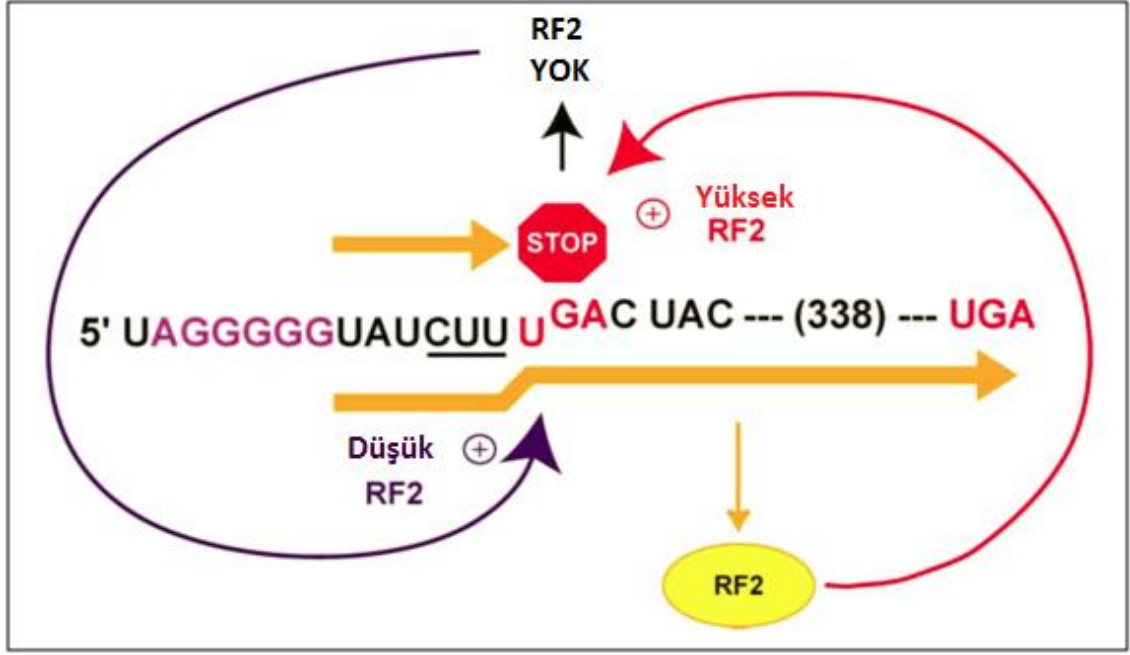
2.2. Ribozomal Çerçeve Kaymasının Moleküler Mekanizması

Programlı ribozomal çerçeve kayması, yani genetik kodun mRNA üzerindeki programlı sinyaller yardımıyla alternatif şekillerde okunması, genetik kodun sabit ve evrensel bir mekanizmayla proteine aktarıldığına dair kanıtı yıkan olaylardan biridir. Standart okuma çerçevesine bir alternatif sunan bu olgu, tek bir mRNA molekülünden birden fazla polipeptidin belirli oranlarda üretilebilmesine olanak sağlamaktadır (Namy ve ark. 2004).

Çerçeve kayması translasyonun devamı (elongation) safhasında, +1 ya da -1 yönlü olarak gerçekleşir (Gesteland ve Atkins 1996, Baranov ve ark. 2002). Çerçeve kayması mekanizmalarının anlaşılmasında özellikle virüs, retrotranspozon ve genomun içine yerleşen insersiyonel unsurların üzerinde yapılan çalışmalar çok önemli olmuştur (Chandler ve Fayet 1993, Plant ve ark. 2003).

Çerçeve kayması mekanizmaları fiziksel olarak mRNA üzerindeki yapılar tarafından uyarılır. Çerçeve kaymasına yol açan genetik nedenler iki çeşittir: tRNA'nın yanlış kodonla etkileşmesinin ihtimalini arttırmak ve ribozomun duraklamasını sağlamak. tRNA'nın mRNA üzerinde hareketliliğini sağlamak için kaygan diziler kullanılır. Ribozomun duraklatılması için de mRNA üzerinde translasyonu yavaşlatabilecek düşük konsantrasyonda bulunan tRNA'lara ait kodonlar ya da sap ilmik ve sahte düğüm gibi yerel ikincil yapılar bulunur. (Kontos ve ark. 2001, Namy ve ark. 2004).

Programlı çerçeve kaymasının hücreler tarafından gen ifadesinin kontrol mekanizması olarak kullanıldığı bilinmektedir. Örneğin *E.coli*'deki UGA STOP kodonunda translasyon bitimini sağlayan Rf2p ("Release Factor 2") üretimi ve sitoplazmik konsantrasyonu programlı çerçeve kaymasıyla kontrol edilir. Rf2p'yi kodlayan *prfB*'nin kendi açık okuma çerçevesinin ortasında tanımakla görevli olduğu bir UGA kodonu bulunur. Tam boyutta ve fonksiyonel Rf2p üretimi için bu stop kodonunun es geçilmesi gerekir ve bu da çerçeve kaymasıyla mümkün olabilmektedir (Namy ve ark. 2004).



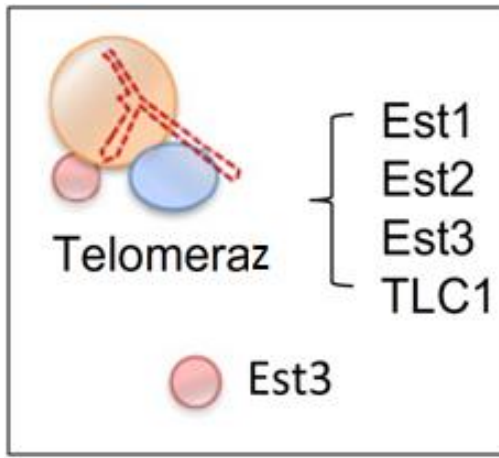
Şekil 2.1. Rf2p sentezinin +1 çerçeve kaymasıyla regülasyonu (Namy ve ark. 2004'ten değiştirilerek alınmıştır).

Hücre içi Rf2p seviyeleri yüksek olduğu zaman UGA kodonunun tanınması kolaylaştığı için Rf2p kendi üretimini durdurur. Seviye yeteri kadar düştüğü zaman ise bu sefer UGA'yı tanıyacak Rf2p bulunmadığı için ribozom kaygan dizi üzerinde bekleme yaparken çerçeve kayması oranı artar ve böylece Rf2p üretimi devam eder (Şekil 2.1). Dolayısıyla çerçeve kayması hücrel koşullar tarafından kontrol edilen ve bu özelliği sayesinde protein üretiminin kontrolünde de etkin olabilen bir mekanizmadır (Adamski ve ark. 1993).

2.3. Est3p ve Telomeraz Kompleksi

Ökaryotlarda kromozomların uçları telomer denen yapılar tarafından korunmaktadır. Telomerlerin en önemli görevi DNA polimerazın primer kullanması sonucu kromozom uçlarını tam olarak kopyalayamamasının oluşturduğu problemi çözmektir. Telomerler çift sarmallı DNA kırıklarının onarma mekanizmalarının yanlışlıkla kromozom uçlarını tamir etmelerini engeller (Watson 1972, Dewar ve Lydall 2012). Telomerlerin uzaması için özel olarak ifade edilen bir ters transkriptaz olan telomeraz enzimi kendine ait bir

RNA kalıbı kullanarak telomerik sekansları kopyalar. Telomerazın ifade edilmediği birçok somatik hücrede hücre yaşlanmanın giderilmesi için fonksiyonel ve aktif bir telomerazın ifadesinin yeterli olduğu görülmüştür (Greider ve Blackburn 1987, Bodnar ve ark. 1998, de Lange 2009). Ayrıca telomeraz artışı insan tümör hücrelerinde ortak bulunan özelliklerden biridir. Telomeraz aktivitesinin engellenmesi kanser araştırmalarında hedef alınan önemli bir stratejidir çünkü yeterli miktarda telomeraza sahip hücrelerin çoğalmaya devam ettiği bilinmektedir (Blackburn 2005).

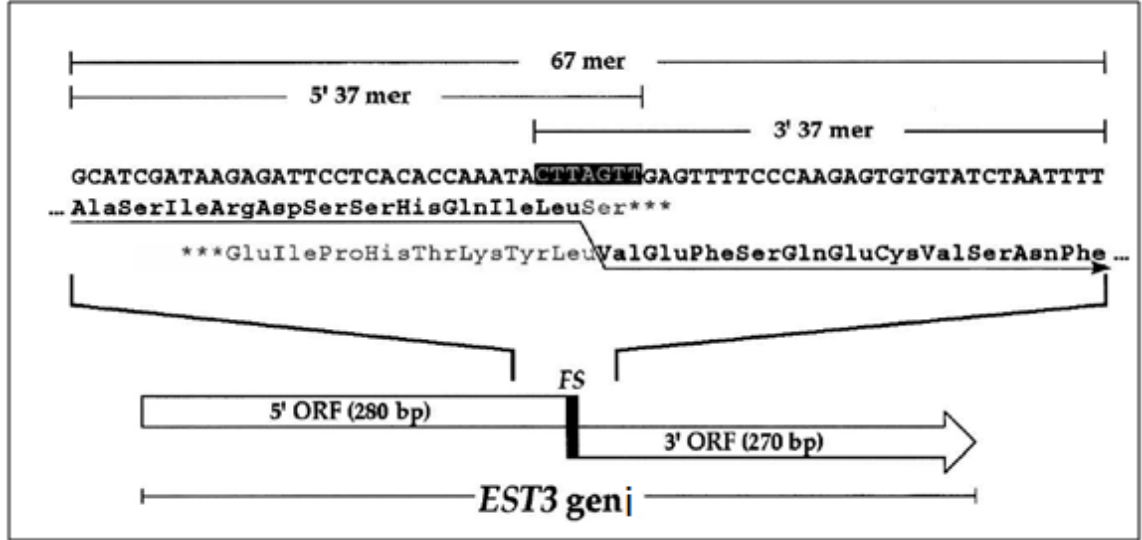


Şekil 2.2. Telomeraz kompleksinin bileşenleri (Harari ve Kupiec 2014'ten değiştirilerek alınmıştır).

Mayada telomeraz üç adet Est ("Ever shorter telomere") proteini ve telomer üretiminde kalıp olarak kullanılacak olan ve *TLC1* geni tarafından kodlanan bir RNA molekülü bulunur (Şekil 2.2). Est2 proteininin telomer üretimindeki enzimatik aktiviteyi içerdiği bilinmektedir (Hughes ve ark. 2000). Est1p ve Est3p'nin rolleri hala tam olarak anlaşılmasa da düzenleyici elemanlar oldukları düşünülmektedir. Genetik taramalarda *est* mutantlarının telomerazlarının aktivitesinde eksiklik olduğu ve Est proteinlerinin eksikliğinde telomer boyutlarının etkilendiği görülmüştür (Lundblad ve Szostak 1989, Lendvay ve ark. 1996, Harari ve Kupiec 2014).

2.4. Est3p Translasyonunda Çerçeve Kayması

EST3'ün 280 baz çiftinden oluşan bir 5' okuma çerçevesi ve 270 baz çiftinden oluşan bir 3' okuma çerçevesi vardır. Bu iki okuma çerçevesinin birbiri ile çakışan 7 bazlık bir sekans bölgesinde (Şekil 2.3'de siyah) CUU ve GUU kodonları +1 yönünde çerçeve kayması olayıyla ortalarındaki A esgeçilerek Leu-Val aminoasitleri olarak okunur. Çerçeve kayması oranının verimini ölçmek için heptamerik dizi kullanıldığında %8, yani her 100 translasyon olayının 8'inde çerçeve kayması görüldüğü bulunmuştur (Vimaladithan ve Farabaugh 1994). Daha sonraki çalışmalarda açık okuma çerçevesinin tamamı kullanılarak çerçeve kayması ölçüldüğü zaman bu oranın %47'ye yükseldiği görülmüştür. Bu fark göz önüne alındığında çerçeve kayması bölgesinin etrafındaki bağlam ("context") bölgesinde çerçeve kaymasını tetikleyen etkenler olabileceği düşünülmektedir (Taliaferro ve Farabaugh 2007).



Şekil 2.3. *EST3* geninin ve çerçeve kayması bölgesinin yapısı (Taliaferro ve Farabaugh 2007'den değiştirilerek alınmıştır).

2. 5. *S. cerevisiae*'da Glukozun Metabolik Etkileri

S. cerevisiae da dahil olmak üzere birçok maya türü çeşitli monosakkarit ve disakkarit'i enerji ve yapı taşı kaynağı olarak kullanabilir ama glukoz gibi heksozlar bu organizmalar tarafından en çok tercih edilen karbon kaynaklarıdır. Gliserol, etanol ve asetat gibi diğer karbon kaynakları solunum yoluyla tüketilmekte ve çok daha düşük büyüme oranları sağlamaktadır. Galaktoz gibi bazı şekerler de yavaşça fermente edilir ve kısmi olarak solunuma tabi olur. Glukoz fermentasyonunun hızlı ve verimli bir şekilde gerçekleşmesi için *S. cerevisiae* birçok glukoz sinyali algılama ve sinyal yolağı bulundurmaktadır (Rolland ve ark. 2001, 2002; Santangelo 2006, Peeters ve Thevelein 2014). Üreme ortamında glukozun var olması sonucu ortaya çıkan metabolik olayları kapsayan genetik ve biyokimyasal durum "glukoz baskılaması" olarak adlandırılır. *S. cerevisiae* kültürlerine glukoz ilavesini takip eden 20 dakika içinde 1200 gende, yani *S. cerevisiae* genomundaki genlerin yaklaşık %20'sinde, üç katın üstünde ifade seviyesi değişikliği görülürken, genlerin yaklaşık %40'ında ise en az iki kat ifade seviyesi farkı bulunmuştur (Wang ve ark. 2004, Santangelo 2006).

Glukozun tercih edilmesinin sonuçlarından biri olarak glukozun üreme ortamında bulunduğu durumlarda glukoz dışındaki alternatif karbon kaynaklarının hücre içine alımı ve kullanımı için gerekli olan hücresel mekanizmaların engellenmesi, örneğin alternatif karbon kaynağı kullanımı için gerekli olan enzimlerin düşük seviyede sentezlenmesi gösterilebilir (Hedbacker and Carlson 2008). Glukozun tercih edilmesinin nedeninin glukozun en verimli şekilde fermente edilebilen, yani maya hücrelerinin en hızlı şekilde yüksek miktarlarda etanol biriktirmesini sağlayabilen şeker olduğu düşünülmektedir. Etanol seviyesinin yükselmesi ortamdaki rakip mikroorganizmaların büyümesi için etkili bir engel olmaktadır. Bu yüzden de glukozun solunuma kıyasla çok daha az ATP üretilmesine rağmen esas olarak fermente edilerek metabolize edildiği ve maya hücreleri için en hızlı büyüme oranını sağladığı düşünülmektedir (Peeters ve Thevelein 2014). Glukozun hücre çevresinde bulunmasından dolayı aktive olan büyük miktarda düzenleyici yolak bulunmaktadır ve bunların birçoğu da fermentasyon ve hücre bölünmesini hedef alır (Rolland ve ark. 2002)

Glukoz kendi fermentasyonunun yanında hızlı hücre çoğalmasını da tetikler. Hücrelerin hızlı bölünmesinin fermentasyon açısından avantajı glikolizde üretilen ATP'lerin ADP'ye geri dönüştürülmesidir. Etanol üretiminin hızlandırılması için solunumun azalması esas glukoz baskılama yolağı tarafından sağlanır. Bunun için Snf1 protein kinazı kilit rol üstlenmektedir. Snf1p ortamda glukoz bulunduğu durumlarda defosforile edilerek inaktif duruma getirilir. Ortamda glukoz tükendiği zaman Snf1p aktivasyonu solunum, glukoneogenez ve alternatif karbon kaynaklarının metabolize edilebilmesi ile ilgili genlerin ifadesinde çok önemli bir etkiye sahiptir (Peeters ve Thevelein 2014).

2. 5. 1. *S. cerevisiae*'da esas glukoz baskılama yolağı

Üreme ortamında glukozun var olmasının sonucunda solunumun ve alternatif karbonların kullanılmasının engellenmesinden sorumlu olan esas glukoz baskılama yolağı maya karbon metabolizmasının hücre sel dengesini düzenleyen en önemli öğelerden biridir. Glukozda büyüyen tipik bir aerobik maya kültüründe, mayalar glukozun fermantasyonu sonucu ilk başta hızla büyüyecektir. Solunumun baskılandığı ve etanolün biriktirildiği bu fazda esas glukoz baskılama yolağı aktiftir ve hücreler glukoz baskısı altında ("repressed") olarak adlandırılır. Glukoz konsantrasyonu düşük seviyelere indiğinde hücreler "diauxic değişim" adı verilen, solunum enzimlerinin ve etanol kullanımının üzerindeki baskının kalktığı geçici bir büyüme durgunluğuna girerler. Dolayısıyla baskılanmamış ("derepressed") hücreler solunum yoluyla etanolü kullanmaya başladıkları bu fazda ilk fermantasyon fazına kıyasla çok daha yavaş büyürler. Etanol tükendiği zaman ise hücreler derepres modda devam ettikleri durağan faza girerek trehaloz ve glikojen gibi depo karbohidratları solunum yoluyla kullanırlar (Peeters ve Thevelein 2014).

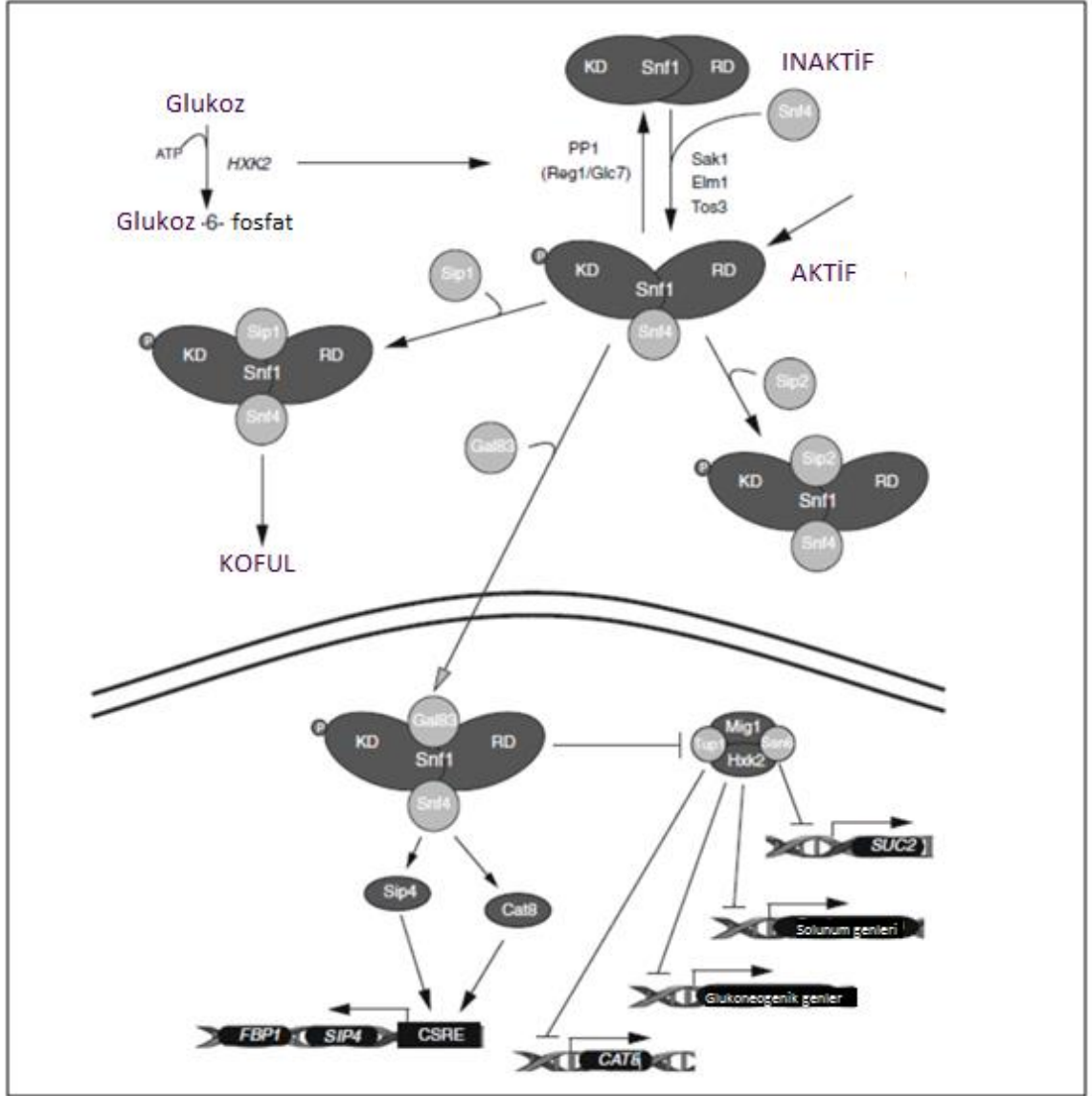
2. 5. 2. Glukoz Baskılamasında Snf1p'nin önemi

Snf1 protein kinaz esas glukoz baskılama yolağındaki en önemli aktörlerden biridir. Memeli hücrelerdeki AMPK kinaz ailesinin ortaloğu olan Snf1p, düşük glukoz

konsantrasyonu ortamlarında (<20 mM) hücrelerin daha az tercih edilen sukroz, galaktoz gibi şekerlerde ya da etanol ve gliserol gibi fermente edilemeyen karbon kaynaklarında büyümesini sağlar (Hedbacker ve Carlson 2008, Zaman ve ark. 2008). "Snf1" ismi glukozu fermente edebildiği halde sükrozu fermente edemediği keşfedilen *snf1* mutant suşunun "Sucrose Non Fermenting" (sükroz fermante edilmeyen) olarak adlandırılmasıyla ortaya çıkmıştır (Carlson ve ark. 1981). *snf1* mutant suşu invertaz enzimini kodlayan *SUC2* ifadesindeki eksiklik nedeniyle sükrozun glukoz ve fruktoza dönüştürülmesini kataliz edemez ve sukrozda üreyemez (Neigeborn ve Carlson 1984).

Snf1'in heterotrimerik bir serin/threonin protein kinaz kompleksine ait katalitik alt birim olduğu bulunmuştur. Snf1 dışında bu komplekste üçü beta (Sip1, Sip2, Gal83) biri gama (Snf4) olmak üzere dört farklı alt birimi vardır. Düzenleyici altbirim olan Snf4'ün aktivasyonu Snf1 aktivesi için gereklidir (Celenza ve Carlson 1984, 1986, 1989, Woods ve ark. 1994).

Snf1 inaktif durumdayken düzenleyici bölgesi (RD) katalitik bölgenin kinaz domenini (KD) kaplayarak oto-inhibasyona sebep olur. Ortamda glukoz olmadığı durumda Snf4 inhibisyonu kaldırarak kompleksin açılmasına sebep olur. Açılmış olan kompleks Snf1'le etkileşen diğer kinazlar olan Sak1, Elm1 ve Tos3 tarafından fosforile edilerek aktif durumdaki Snf1/Snf4 kompleksi haline gelir. Bu kompleks de kendi hedef proteinlerinin fosforile edilmesiyle sinyal iletimini sağlar. Glukoz eklenmesi durumunda Snf1 kompleksi Protein Fosfataz 1 (PP1)'in düzenleyici altbirimi Reg1'in kontrolünde katalitik altbirim olan Glc7 tarafından defosforile edilir. Aktif Snf1 kompleksinin yeri beta altbirimleri olan Sip1, Sip2 ve Gal83 tarafından belirlenir. Sip1 Snf1 kompleksini kofullara doğru lokalize eder, Sip2 Snf1 kompleksini sitoplazmada tutar ve en yüksek miktarda bulunan altbirim Gal83 Snf1 kompleksini nükleusa taşır. Nükleusta iken Snf1 Mig1'i fosforile ederek birçok hedef geni baskılamasını engeller. Ayrıca Snf1 transkripsiyon faktörleri olan Sip4 ve Cat8'i de fosforile ederek aktive olmalarını sağlar (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. *S. cerevisiae*'da esas glukoz baskılama yolağı (Peeters ve Thevelein 2014'den değıştirilerek alınmıştır).

Mig1 glukoz baskılamada Snf1'den sonra gelen temel transkripsyon faktörüdür (Nehlin ve ark. 1991, Nehlin ve Ronne 1990). Snf1 Mig1 transkripsyon represörünü fosforile ederek nükleustan dışarı taşınmasını sağlar ve böylece Mig1 tarafından kontrol edilen genlerin baskılanmasını kaldırır. Mig1 çoğunluğu alternatif karbon kaynaklarının metabolize edilmesiyle ilgili olmak üzere en az 90 farklı genin glukoz tarafından baskılanmasında görev alır (Klein ve ark. 1998, Lutfiyya ve ark. 1998). Mig1 çinko parmak motif yapısındaki bir DNA bağlanma proteindir ve hedef genlerin baskılanması

için Ssn6-Tup1 genel korepresör kompleksiyle etkileşir (Treitel ve Carlson 1995). Snf1'in Mig1'in fosforile edip Mig1'in nükleusun dışına taşınmasına sebep olduğu bölge Mig1'in 311. pozisyonundaki serin amino asididir. Bu bölge ayrıca Mig1 ve Mig1 represör kompleksinin bir parçası olan Hxk2'nin etkileşimi açısından da önem taşımaktadır. Hxk2 Mig1'e bağımlı bir şekilde nükleusa doğru taşınır ve ilgili Mig1 bölgesine bağlanarak Snf1 tarafından gerçekleştirilen fosforilizasyonu engeller (Ahuatzi ve ark. 2007).

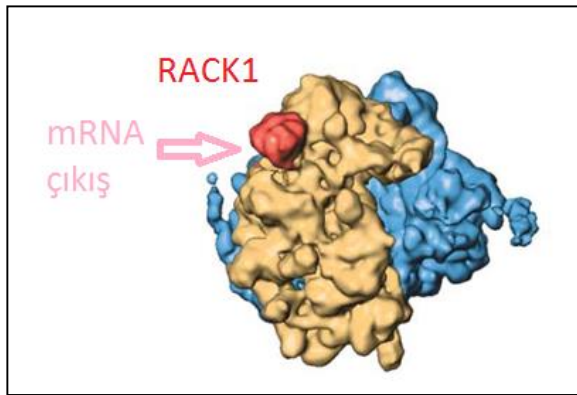
Snf1 ayrıca transkripsiyonel aktivatörler olan Cat8 ve Sip4'ü de aktivitelerini artırıcı şekilde düzenler (Lesage ve ark. 1996, Rahner ve ark. 1999, Hiesinger ve ark. 2001). Bu transkripsiyon aktivatörleri glukoz konsantrasyonunun düşük olduğu çevresel durumlarda karbon kaynağı durumuna cevap veren öğelere spesifik olarak bağlanırlar (Vincent ve Carlson 1998). Cat8p ve Sip4p aktive olduklarında glukoneogenez, solunum ve glioksilat döngüde görev alan genlerin ifade seviyelerini yükseltirler (Santangelo 2006). Cat8 Snf1 tarafından fosforile edilerek aktive olduktan sonra promotör bölgesinde bir adet karbon kaynağı durumuna cevap veren öge bulduran *SIP4* ifade edilir (Vincent ve Carlson 1998). *CAT8* ifadesi Mig1 tarafından baskılanır (Hedges ve ark. 1995, Randez-Gil ve ark. 1997).

Snf1 düzenleyici görevlerini gen transkripsiyonu üzerindeki etkileri yanında ayrıca yağ asitleri metabolizması, karbonhidrat depolama ve taşıma ile ilgili proteinlerin fosforilizasyonunu da sağlayarak da yürütür (Hedbacker ve Carlson 2008). Örneğin, Snf1p glukoz konsantrasyonunun düşük olduğu çevresel koşullarda asetil-CoA karboksilazı fosforile etmek suretiyle etkisiz hale getirerek yağ asidi biyosentezini engeller (Woods ve ark. 1994). Snf1p ayrıca, besinsel yanıt, mayoz bölünme ve sporulasyon gibi hücre gelişimle ilgili işlemler (Honigberg ve Lee 1998) ve yaşlanmada da (Ashrafi ve ark. 2000) rol oynamaktadır.

2. 5. 3. *S. cerevisiae*'da Asc1p'nin rolü

Asc1p memelilerdeki aktive olmuş C-kinazın reseptörü olan Rack1'in *S. cerevisiae*'daki ortaloğudur. 7 adet triptofan-aspartat (WD) tekrarından oluşan ve türler arasında büyük miktarda korunmuş bir proteindir. Asc1p'nin birçok sinyal iletim yolağındaki proteinler için "scaffold" (iskele) görevi yaptığı ve sinyal olaylarının lokalize şekilde gerçekleşmesini sağlayarak geniş bir yelpazedeki biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli roller oynadığı gösterilmiştir (Adams ve ark. 2011).

Asc1p ribozomun 40S'lik altbirimine mRNA çıkış kanalına yakın bir noktada sıkıca bağlanır. *T. thermophila*'da 40S'e bağlanmış olan Rack1'in kristal yapısı görüntülendiğinde Rack1'in fosfat belkemiği, 18S rRNA'nın h39 ve h40 bazları ve ribozomal proteinler olan rpS16e, rpS17e, and rpS3e ile geniş bir temas yüzeyi oluşturarak etkileşime girdiği görülmüştür (Gerbası ve ark. 2004, Sengupta ve ark. 2004, Rabl ve ark. 2011). Ökaryotik ribozomlar üzerinde Rack1'in yerini bulmak için yapılan çalışmalarda Rack1'in yerinin türler arasında korunduğu ve 40S'in arkasında konulduğu bulunmuştur (Sengupta ve ark. 2004). Şekil 2.5'te *S. cerevisiae*'nin 80S ribozomunun kriyo-elektron mikroskopuyla oluşturulan haritasında Rack1'in (kırmızı) küçük altbirim (sarı) üzerindeki yeri gösterilmektedir. mRNA çıkış kanalı ok ile belirtilmiştir (Nilsson ve ark. 2004).



Şekil 2.5. *S. cerevisiae*'da 80S ribozomunun kriyo-elektron mikroskopuyla oluşturulan haritası (Nilsson ve ark. 2004'ten değiştirilerek alınmıştır).

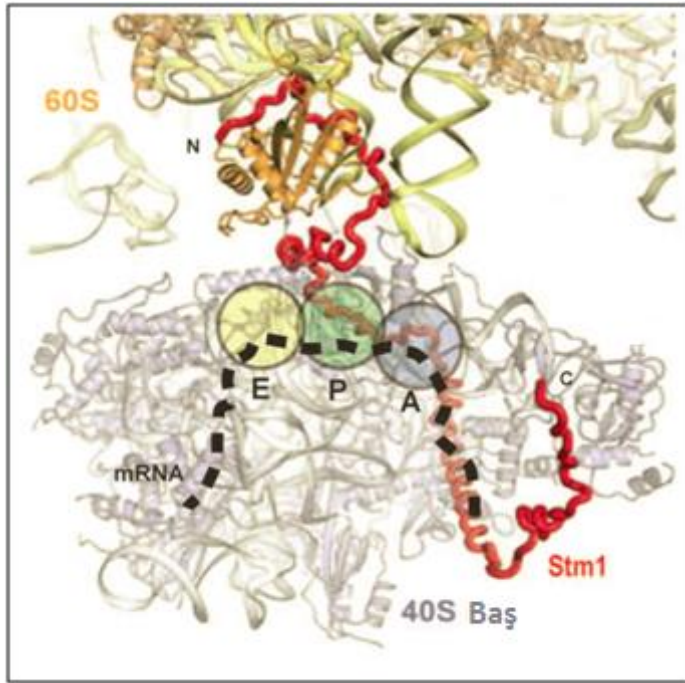
Son araştırmalarda Asc1p'nin tekrarlanan CGA kodonlarında çerçeve kaymasını engellediğine dair kanıtlar bulunmuştur. Translasyon sırasında aminoasit dizisinin oluşumunu sağlayan peptidil transferaz reaksiyonunun verimini etkileyen etkenlerden biri uzamakta olan amino asit zincirinin çıkış tünelindeki durumu ve buna bağlı olarak ribozomun duraklamasına sebep olabilmesidir (Ramu ve ark. 2011, Martinez ve ark. 2014). ıkış kanalının katlanmamış durumda 30-40 amino asit barındırabildiği, α -heliks durumundayken de 72 amino asit sığdırabildiği bilinmektedir (Malkin ve Rich 1967, Blobel ve Sabatini 1970, Kramer ve ark. 2001). Asc1 yokken çerçeve kaymasının devam ettiği anlaşılınca, mRNA üzerinde çerçeve kaymasının gerçekleştiği bölgenin yeri incelendiğinde, bu bölgenin translasyon sırasında uzamakta olan amino asit zincirinin ribozomal çıkış kanalının çoğunu dolduracak bir boyuta ulaştığı bir noktada olduğu tespit edilmiştir (Wolf ve Grayhack 2015).

2. 5. 4. *S. cerevisiae*'da Stm1p'nin rolü

S. cerevisiae'nin Stm1 proteininin apoptozdan telomer biyosentezine geniş bir biyolojik süreç yelpazesinde rol oynadığı bilinmektedir. Besin stresi koşullarında translasyonun gerçekleşmesi için Stm1p'nin gerekli olduğu ve rapamisin (TOR) sinyali yolağıyla Stm1p'nin uyum içinde çalıştığı bulunmuştur (Van Dyke ve ark. 2006). Stm1p'nin eEF3'n (translasyonel devam faktörü 3) 80S kompleksine bağlanmasını etkilediği bilinmektedir; *stm1* mutantlarında eEF3'n ribozomlara daha fazla bağlandığı, Stm1p seviyeleri arttığında ise eEF3'e bağlı ribozomların daha az miktarda olduğu gösterilmiştir (Van Dyke ve ark. 2009). Stm1p'nin 80S ribozom oluşumundan sonra translasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir ve Stm1p'nin translasyonel baskısını 80S kompleksi oluşumundan sonra ribozomları duraklatarak sağladığı düşünülmektedir (Balagopal ve Parker 2011).

S. cerevisiae'da 80S ribozomun ve Stm1'in kristal yapıları görüntülendiğinde Stm1'in ribozomun hem 40S hem de 60S altbitimleriyle etkileştiği ve mRNA bağlanmasını engellediği bulunmuştur. Stm1'in ayrıca mRNA ya da tRNA'ya bağlanarak fonksiyonel kompleksler oluşturan korunmuş yapıdaki rRNA ıkıntılılarıyla da etkileştiği

saptanmıştır. Şekil 2.6' da 40S ribozomun başıyla 60S'in merkezi çıkıntısına yukardan bakıldığında Stm1'in (kırmızı) P bölgesine kadar mRNA'nın yolunu (siyah) takip ettiği görülmektedir. Ribozomal E, P ve A bölgelerinin de yaklaşık yerleri gösterilmiştir (Ben-Shem ve ark. 2011). Stm1'in 40S'in baş bölgesine bağlanarak mRNA giriş kanalına bir alfa heliks soktuğu ve mRNA erişimini engellediği tespit edilmiştir. Ayrıca P bölgesine kadar uzanarak tRNA'nın ribozomal A ve P bölgelerinde bağlanmasının önüne geçtiği ve fonksiyonel ribozom kompleksi oluşumlarını engellediği belirlenmiştir. Protein daha sonra 60S altbirimine geçmekte ve ribozomla etkileşimiyle altbirimlerin ayrılmasını önleyerek 80S'in stabil hale gelmesine sebep olmaktadır (Lenner ve ark. 2012).



Şekil 2.6. 40S ribozomun başıyla 60S'in merkezi çıkıntısının Stm1p ile etkileşimi (Ben-Shem ve ark. 2011'den değiştirilerek alınmıştır).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3. 1. Araştırmada Kullanılan *S. cerevisiae* Suşları

YST124 (yaban tip), YST220 ($\Delta stm1$), YST234 ($\Delta asc1$) ve YST159 ($\Delta snf1$) suşları Frankfurt Üniversitesi Mikrobiyoloji Enstitüsü'ndeki EUROSCARF koleksiyonundan temin edildi. YST124 kodu ile gösterilen *S. cerevisiae* suşu yaban tip standart suş olarak kullanılırken YST220, YST234 ve YST159 suşları ise $\Delta stm1$, $\Delta asc1$ ve $\Delta snf1$ mutasyonları hariç YST124 ile izogenik suşlar olarak mutant etkilerini araştırmak üzere kullanıldı. Araştırmada kullanılan maya suşlarının genotipleri her bir suş için Çizelge 3.1'de verildi.

Çizelge 3.1. Bu araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşlarının genotipleri

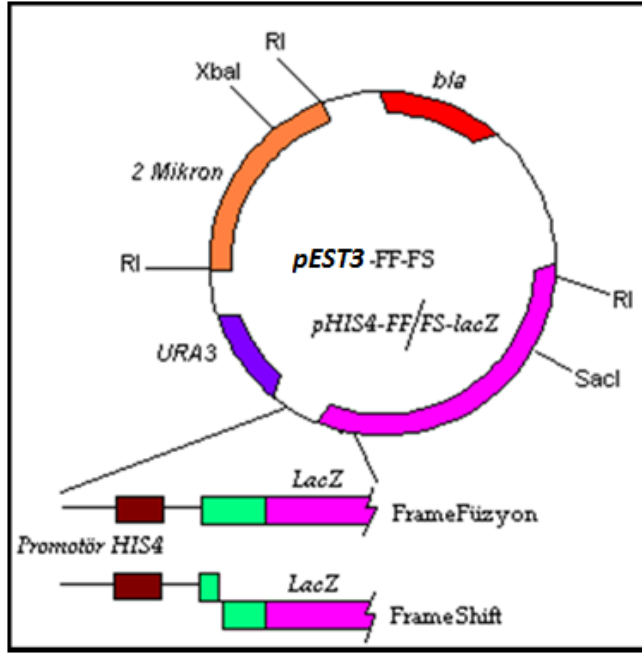
| Maya Suşu Lab Kod Numarası | Genotip |
|----------------------------------|---|
| YST 124 | his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0. |
| YST220 | his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YLR150w::kanMX4 (stm1 mutanı, YST124 ile izogenik) |
| YST234 | ura3 Δ 0; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; YMR116c::kanMX4 (asc1 mutanı, YST124 ile izogenik) |
| YST159 | his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YDR477w::kanMX4 (snf1 mutanı, YST124 ile izogenik) |

3. 2. *S. cerevisiae* Suşlarının Transformasyon İçin Hazırlanması

Bu tez araştırmasında kullanılan besiyerleri ve diğer çözeltilerin bileşimi ve hazırlanmaları tezin ekler bölümünde verildi. Araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşları ilk önce zengin ortam olarak kullanılan YPD üreme ortamı içeren petrilerde üretildi (Ek 1) (Rose ve ark. 1990). Deneylede kullanılmak üzere stoklar oluşturulması için bu *S. cerevisiae* eldelerinden YPD petrilere ekim yapılarak 30°C’de üretildi. Stoklar petrilerde 4°C’de muhafaza edildi. Bunun yanında uzun süreli depolama amacıyla da taze besi yerlerinde üretilen *S. cerevisiae* suşlarından steril kürdan ile alınan maya örnekleri steril 1 ml %20 gliserolda -70°C’de saklandı.

3. 3. Araştırmada Kullanılan Plazmidler

Araştırmamızda kullanılan *EST3-lacZ* FrameShift ve *EST3-lacZ* FrameFusion yapılarını içeren plazmitler daha önceki araştırmalarda hazırlanmıştır (Taliaferro ve Farabaugh 2007). pANU7 plazmidi *S. cerevisiae* *HIS4* geninin ilk 33 kodonunu içermektedir. *HIS4* geni histidin biyosentezinde kullanılan 3 adet enzimi kodlar. Plazmidteki *HIS4* bölgesi kısa bir polilinker dizi ile reporter olarak kullanılan β -galaktosidaz’ı kodlayan *E. coli lacZ* geniyle birleştirilmiştir. Plazmid ayrıca bakteri ve maya için replikasyon orijinlerini, kullanılan maya suşlarının urasil prototrofini telafi eden *S. cerevisiae URA3* genini ve bakterilerde ampisilin direnci sağlayan *bla* genini de bulundurmaktadır (Taliaferro ve Farabaugh 2007). *EST3-lacZ* gen füzyonlarını içeren plazmitlerin yapısı Şekil 3.1’de gösterildi.



Şekil 3. 1. *EST3-lacZ* gen füzyonlarını içeren plazmitlerin yapısı (Bayram 2003'ten değiştirilerek alınmıştır).

Farklı karbon kaynaklarının *EST3* çerçeve kayması oranına etkisini ölçmek için iki farklı plazmit kullanıldı. *EST3-lacZ* FrameShift (*EST3-FS*) yapısında *EST3* okuma çerçevesi mutasyona uğramamış halinde bulunurken *EST3-lacZ* FrameFusion (*EST3-FF*) yapısında heptamerik çerçeve kayması bölgesinde (bkz. Şekil 2.3) tek bir nükleotit eksik olduğu için açık okuma çerçevesi +1 çerçeve kayması etkisiyle translate edilir (Şekil 3.1). Bu plazmitlerin seçici ortamda seleksiyon devam ettiği sürece hücrede kaybolmadan stabil olarak kaldıkları, kopya sayılarının sabit olduğu ve hücreden hücreye çok değişmediği daha önceki araştırmalarda gösterilmiştir (Liao ve ark. 1987).

3. 4. Plazmidlerin *E.coli*'ye Transformasyonu ve Saflaştırılması

Araştırmada kullanılan *EST3-FS* ve *EST3-FF* yapılarını içeren plazmitler *E. coli* DH5 α suşuna transformasyon ile aktararak çoğaltıldı. *E. coli* hücrelerine DNA'yı içine alabilme yetkinliğine (*competence*) kazandırmak için MgCl₂/CaCl₂ yöntemi daha önce açıklandığı şekilde uygulandı ve hücreler transformasyonda kullanıldı (Ausubel ve ark.

1987). *E. coli*'ye transformasyon için önce bakteri hücreleri -80°C'deki stoktan alınıp 37°C'de LB petriyelerinde üretildi. Petride aktif olarak üreyen bakteri kolonileri 10 ml LB sıvı ortamda bir gece boyunca üretildi. Daha sonra sıvı bakteri kültürden 100 µl alınıp 10 ml LB'ye eklenerek logaritmik faza kadar 37°C'de üretildi. Transformasyon sonrası bakteriler LB-ampicillin petriyelerinde büyütüldükten sonra seçilerek LB-ampicillin sıvı ortamda bir gece boyunca üretildi (Ek 1).

E.coli'ye transforme edilip çoğaltılan *EST3-FS* ve *EST3-FF* plazmitleri ticari olarak sağlanan plazmit saflaştırma kiti kullanılarak izole edildi. *E. coli*'den plazmit saflaştırma işleminde üretici firma tarafından verilen yöntem izlendi. *EST3-FS* ve *EST3-FF* plazmitleri 100 µl 1X pH=7.4 TE çözeltilisi içinde -70°C'de saklandı (Ek 1).

3. 5. Plazmitlerin *S. cerevisiae*'ya Transformasyonu

Yaban tip ve mutant *S. cerevisiae* hücreleri daha önce tanımlanan lityum asetat-poli etilen glikol (PEG) yöntemi kullanılarak *EST3-FS* ve *EST3-FF* yapılarını içeren *URA3* 2µm plazmitleri ile transforme edildi (Rose ve ark. 1990). Bunun için önce 5 ml YPD ortamlarına steril kürdan kullanılarak 4°C'de saklanan stok *S. cerevisiae* suşlarından ekim yapıldı ve çalkalamalı inkübatörde 130 devir/dakika hızda ve 30°C'de bir gece boyunca üretildi. Sıvı kültürdeki *S. cerevisiae* suşlarının 250 µl'si taze 25 ml YPD ortamına eklendi ve aynı şartlarda logaritmik aşamaya ($OD_{600}=0.8-1.0$) kadar üretildi. Logaritmik fazdaki *S. cerevisiae* hücreleri santrifüjde 3000g'de 5 dakika çöktürüldü. Çöken *S. cerevisiae* hücreleri süpernatant atıldıktan sonra 25 ml steril saf su eklenip vortexlendikten sonra tekrar santrifüj ile 3000g'de 5 dakika çöktürülerek yıkandı. Süpernatant atılıp çöken *S. cerevisiae* hücreleri taze 1 ml 0.1M lityum asetat çözeltilisinde çözüldü. Sıvı faz atılıp çöken *S. cerevisiae* hücreleri taze hazırlanmış 1ml steril 0.1 M lityum asetat çözeltilisinde süspansiyon edildi. Mikrofüj tüplerindeki süspansiyon 10 sn boyunca mikrosantrifüj cihazında en yüksek hızda çöktürüldü. Sonrasında lityum asetat *S. cerevisiae* süspansiyonundan pipet aracılığıyla uzaklaştırıldı ve 450 µl 0.1 M lityum asetat eklenerek hücreler ile tekrar bir süspansiyon oluşturuldu. Bu süspansiyondan 50 µl miktarlık kısım steril mikrofüj tüplerine alındı ve en yüksek

hızda tekrar 10 sn boyunca mikrosantrifüj cihazında çöktürüldükten sonra lityum asetat pipetle uzaklaştırıldı. Daha sonra mikrofüj tüplerindeki *S. cerevisiae* çökeltilerinin üstüne 5-6 µg denatüre edilmiş herring sperm DNA'sı, 4-5 µg plazmid DNA'sı, 36 µl 1 M lityum asetat, 240 µl PEG ve 60 µl steril saf su ilave edildi. Bu plazmit-maya hücresi karışımları 30°C'de etüvde 30 dakika bekletildi. Daha sonra bu hücre plazmit karışımı 42°C'lik su banyosunda 30 dakika ısı şokuna maruz bırakıldı. Ardından mikrosantrifüjde 8000 rpm'de 15 sn çöktürüldü ve transformasyon karışımı mikropipetle uzaklaştırıldı. Çöken *S. cerevisiae* hücreleri 400-500 µl steril saf suda süspansiyon edildi. Bu hücre süspansiyonundan 75-100 µl miktarlık kısmı urasil içermeyen sentetik tam minimal üreme ortamı (SC-Ura + %2 glukoz) petrilere ekildi ve 30°C'deki etüve bırakıldı (Ek 1). *S. cerevisiae* transformantlarının üremeleri için petriler 30°C'de 3-4 gün bekletildi. *S. cerevisiae* transformantlarını içeren petriler araştırmalarımız süresince +4°C'de saklandı ve β-galaktozidaz ölçümlerine hazırlık için sıvı kültürlerle ekilmek üzere 6-8'er adet koloni seçilip yeni minimal petrilere pasajlandı.

3. 6. *S. cerevisiae* Transformantlarının Üretilmesi

Farklı karbon kaynaklarının Est3p translasyonu üzerindeki etkisini ölçmek için *EST3-FS* ve *EST3-FF* plazmitlerini içeren *URA⁺ S. cerevisiae* transformantları -Ura SC'ya farklı miktarlarda şeker eklenmesiyle elde edilen farklı üreme ortamlarında üretildi. Seçilen karbon kaynakları %0.05 glukoz (glukoz derepres), %2 glukoz (glukoz baskılama) ya da %2 gliserol laktat (alternatif karbon kaynağı) olmak üzere üç farklı ortam oluşturdu.

S. cerevisiae hücreleri 5'er mL'lik Sc-Ura + % 2 glukoz içeren sıvı besiyerlerine ikili set olarak ekildikten sonra çalkalamalı etüvde 30°C'de 140 devir/dakika hızda bir gece boyunca durağan faza kadar üretildi. Daha sonra bu durağan faz *S. cerevisiae* kültürlerinden 200'er µl alınıp 15 ml taze Sc-Ura + % 2 glukoz besiyerine ekim yapılarak aynı şartlarda logaritmik faza kadar (4 saat) üretildi. Bu aşamada *S. cerevisiae* kültürlerinin 5 ml'si glukoz baskılama koşullarının Est3p translasyonu üzerindeki etkisini ölçmek üzere ayrılarak Bölüm 3.7'de açıklandığı gibi enzimatik deneye

hazırlandı. *S. cerevisiae* kültürünün diğer 10 mL'lik bölümü ise santrifüjde çöktürüldü ve 5 ml steril su ile yıkandıktan sonra glukoz derepres ve alternatif karbon üreme koşullarına aktarılmak üzere ikiye ayrılarak 5 ml'lik Sc-Ura + % 0.05 glukoz ve Sc-Ura + %2 gliserol laktat içeren besi yerlerine aktarıldı. Bu koşullarda üreme için *S. cerevisiae* kültürleri tekrar 4-5 saat süresince üremeye bırakıldı.

Bu üreme süreci sonunda *S. cerevisiae* hücreleri santrifüj ile 3000g'de çöktürüldü. Çöktürülen *S. cerevisiae* kültürleri 1 ml'lik steril saf su ile bir kez yıkanıp tekrar çöktürüldü. Son olarak hücre çökeltisinin üzerine 200 µl lizis tampon çözeltisi eklendi ve hücreler bu şekilde -70 °C'de donmaya bırakıldı (Ek 1).

Hücrelerin büyüme aşamasının Est3p translasyonu üzerindeki etkisini ölçmek için durağan faz *S. cerevisiae* kültürlerinden 200'er µl alınıp 5 ml taze Sc-Ura + % 2 glukoz besiyerine ekim yapılan hücreler aynı şartlarda 24 ve 48 saat olmak üzere iki farklı zaman dilimi boyunca durağan faza kadar üretildi. Üçüncü bir kültürdeki hücreler ise 48 saat üretim sonunda toplu olarak taze Sc-Ura + % 2 glukoz besi yerine aktarıldı ve 4 saat boyunca inkübe edildi. Üreme süreçleri sonunda hücreler çerçeve kayması oranlarının ölçümü için enzimatik deneye hazırlandılar.

3. 7. Çerçeve Kayması Oranlarının Ölçülmesi

Lizis tampon çözeltisi içinde dondurulan *S. cerevisiae* hücreleri β-Galaktozidaz aktivitelerinin ölçümünden önce oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek çözüldü. Çözünen hücre süspansiyonlarının 20 µl saf kloroform ve %0.1'lik 20 µl SDS eklendikten sonra 10-15 saniye süreyle en yüksek hızda vortekslenmesiyle permeabilize olmuş hücre lizatları elde edildi. *S. cerevisiae* süspansiyonlarından 20 µl'lik bir miktarı 980 µl'lik β-galaktozidaz tampon çözeltisi (Z tampon çözeltisi) içine ilave edildi. Daha sonra çözelti β-Galaktozidaz aktivitesi için optimum olan sıcaklığa ulaşabilmesi adına su banyosunda 30°C'de 2 dakika ön inkübasyona tabi tutuldu ve bu süre sonunda hücre karışımına yüksek miktarda (200 µl) substrat olarak kullanılacak ONPG (Orto Nitro

Phenyl Galactoside) eklenerek 30°C'de karışımın renksiz halden post-it sarısı renk alana kadar ihtiyaç duyduğu süre ölçüldü. Bekleme süresi sonunda β -Galaktozidaz reaksiyonları 500 μ l 1M sodyum karbonat ilave edilerek durduruldu. Reaksiyon tüpleri 1000g'de santrifuj edilerek hücreler çöktürüldü. Çözeltilerin soğurumları 420 nm'de spektrofotometre kullanılarak ölçüldü (Ek 1) (Guarente 1983).

Permeabilize edilen *S. cerevisiae* süspansiyonlarının toplam protein konsantrasyonlarını ölçmek için daha önce açıklandığı şekilde Lowry metodu kullanıldı (Lowry ve ark. 1951). 10 ml'lik cam tüplere 180 μ l'lik steril steril su konulduktan sonra permeabilize edilmiş hücre lizatlarından 20 μ l suyun içine eklendi. 1 ml Lowry C çözeltisi eklenerek elde edilen karışım vortex ile kısa süre çalkalandı. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra karışıma 1N folin fenol (Sigma F 9252) çözeltisinden 100 μ l eklenerek vorteks edildi (Ek 1). Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra oluşan mavi renkli protein komplekslerinin soğurumları OD₇₅₀'de belirlendi.

β -galaktozidaz aktiviteleri daha önce açıklandığı şekilde hesaplandı (Ek 2) (Ausubel ve ark. 1987). Sonuçlar dakikada 1 mg protein tarafından hidroliz edilen nmol ONPG (nmol ONPG/dk/ mg protein) olarak elde edildi. *EST3*-FF yapısından elde edilen enzim aktivitesi translasyon olaylarının tümünü temsil ederken *EST3*-FS yapısından elde edilen enzim aktivitesi çerçeve kayması gerçekleşen translasyon olaylarını temsil ettiği için çerçeve kayması oranı *EST3*-FS'in *EST3*-FF'e oranı olarak hesaplandı ve sonuçlar yüzde olarak verildi. Sonuçların çoğunda standart sapmanın %10'nun altında olduğu bulundu.

3. 8. Farklı Karbon Kaynaklarının *S. cerevisiae* üreme hızına etkisinin ölçülmesi

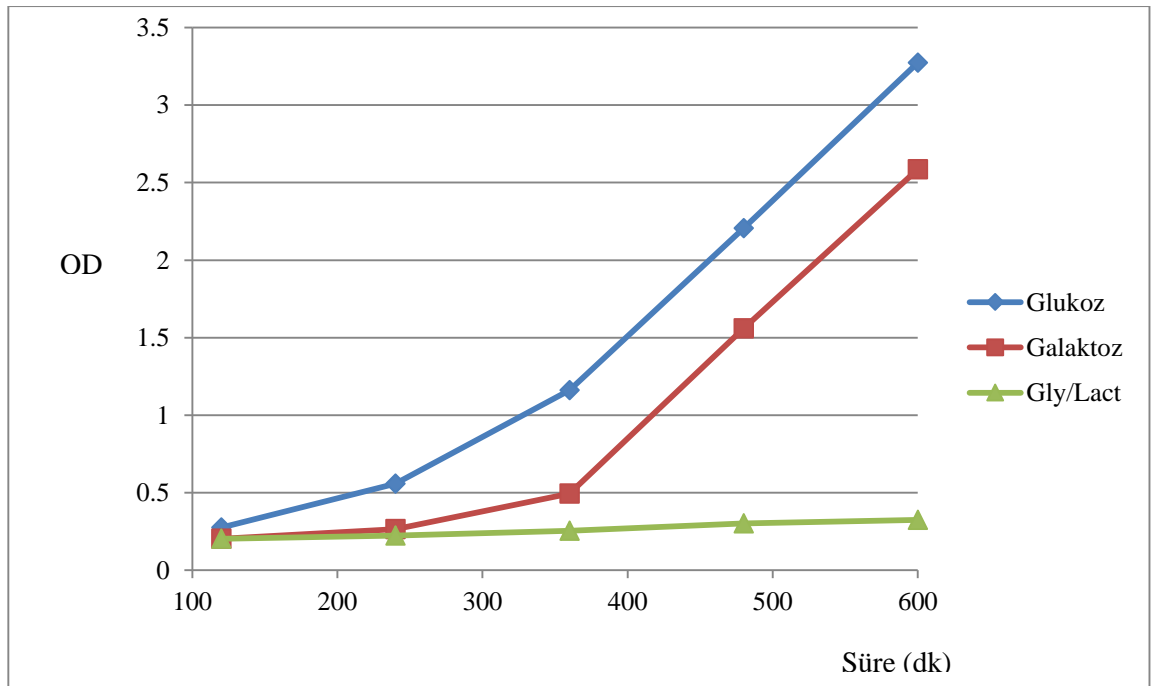
Bu araştırmada karbon kaynağı olarak kullanılan glukoz ve gliserol laktatın yanında yavaşça fermente edilen ve kısmi olarak solunuma tabi olan galaktozun *S. cerevisiae* hücrelerinin üreme hızına olan etkilerini karşılaştırmak için bu üç farklı karbon kaynağından büyüme eğrileri oluşturuldu. Bunun için durağan faz *S. cerevisiae*

kültüründen $OD_{600}=0,2$ olacak miktarda alınıp 5'er ml'lik Sc-Ura + % 2 glukoz, Sc-Ura + %2 galaktoz ve Sc-Ura + %2 gliserol laktat besi yerlerine ekim yapıldıktan sonra 30°C'de inkübe edilen hücrelerin 120 dakikada bir 600nm'de soğurumları ölçüldü ve 10'ar saatlik büyüme eğrileri oluşturuldu.

4. BULGULAR

4.1. Farklı Karbon Kaynaklarının *S. cerevisiae* Üreme Hızına Etkileri

Bölüm 2'de bahsedildiği üzere fermente edilemeyen karbon kaynaklarında üretilen *S. cerevisiae* hücrelerinin glukoz gibi fermente edilebilir olanlarda üretilenlere oranla daha yavaş ürediği bilinmektedir. Bu araştırmada kullanılan glukoz ve alternatif karbon kaynağı olarak kullanılan gliserol laktatın maya hücrelerinin üreme hızı üzerindeki etkilerini karşılaştırıldığında Şekil 4.1'de görüldüğü üzere glukozda üretilen hücrelerin çok daha hızlı çoğaldığı görüldü. Bu iki karbon kaynağı yanında yavaşça fermente edilen ve kısmi olarak solunuma tabi olan galaktozun da üreme hızına etkisi ölçüldüğünde hücrelerin glukozdakinden daha yavaş, gliserol laktattakinden ise daha hızlı bir büyüme gösterdikleri gözlemlendi.



Şekil 4.1. Farklı karbon kaynaklarında *S. cerevisiae* üreme hızları.

4.2. Farklı Karbon Kaynaklarının *EST3* Çerçeve Kayması Oranına Etkileri

Farklı karbon kaynaklarının *EST3* çerçeve kayması oranlarına etkisini hesaplamak için *EST3-lacZ* FS yapısından elde edilen enzimatif aktivitenin FF yapısından elde edilen enzim aktiviteye oranı hesaplandı ve sonuçlar yüzde olarak verildi.

Est3p üretimi sırasında farklı karbon kaynaklarının çerçeve kayması oranlarına etkileri karşılaştırıldığı zaman hücre bölünme hızıyla korelasyon bulundu. Bölüm 2'de bahsedildiği üzere çerçeve kayması çevresel koşullardan etkilenebilen, hatta çevresel koşullar tarafından programlı olarak yönetilebilen bir mekanizmadır. Çerçeve kaymasının gen ifadesi kontrol basamaklarından biri olarak kullanıldığı hücrenel süreçler tanımlanmıştır. Bu araştırmada yüksek glukoz içeren üreme ortamında üretilen glukoz baskılama koşullarına maruz kalmış hücrelerin Est3p üretimi sırasında her yüz translasyon olayının 8,83'ünde çerçeve kayması gerçekleştiği görülürken düşük glukoz içeren üreme ortamında glukoz baskılamanın kalktığı ve derepres koşullar olduğu durumda bu oranın %4,88'e inerek yaklaşık 2 kat azaldığı görüldü. *S. cerevisiae* hücreleri tarafından tercih edilen karbon kaynağı olan glukozun yüksek konsantrasyonda bulunduğu üreme ortamlarında hücre üreme hızının da arttığı bilinmektedir. Üreme ortamında glukoz bulunmadığı zaman alternatif karbon kaynağı olarak kullanılan gliserol laktat ile üretilen hücrelerde ise çerçeve kayması oranı %0,89 olarak ölçüldü. Glukoz baskılamasına maruz kalan hücrelerle kıyaslandığında yaklaşık 10 kat daha az *EST3* translasyonuna rastlandı (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Farklı karbon kaynaklarının yaban tip suşlarda çerçeve kaymasına etkileri

| Üreme Koşulları | Çerçeve Kayması Oranı ¹ | Karbon Kaynağı Farkı ² |
|--|------------------------------------|-----------------------------------|
| Glukoz Baskılama (R, %2 Glukoz) | 8,83 ± 0,84 | |
| Glukoz Derepres (DR, %0.05 Glukoz) | 4,88 ± 0,68 | -1,81 |
| Alternatif Karbon (GL, %2 Gliserol Laktat) | 0,89 ± 0,04 | -9,92 |

¹*EST3* çerçeve kayması oranları her yüz adet translyasyon olayında meydana gelen çerçeve kayması miktarı olarak verilmiştir.

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

4.3. *STM1* Geninin *EST3* Çerçeve Kayması Regülasyonundaki Rolü

EST3 çerçeve kayması oranlarını düzenlemede görev alabilecek potansiyel protein aktörlerin tespiti için bazı aday proteinler belirlendi ve bu proteinleri içermeyen maya suşları kullanarak yaban tip suşta olduğu gibi karbon kaynağı deneyleri yapıldı. Bölüm 2'de bahsedildiği üzere *Stm1p* uzun süreli besin açlığı sonrası maya hücresinin iyileşmesinde rol oynayan bir proteindir. Ayrıca translyasyonu inhibe ettiği bilinmektedir. Ribozom ve *Stm1p*'in kristal yapıları görüntülendiğinde *Stm1p*'in mRNA'nın yolunu takip ettiği belirlenmiştir.

Glukoz içeren üreme ortamında üretilen glukoz baskılama koşullarına maruz kalmış *Δstm1* hücrelerde *EST3* üretimi sırasında çerçeve kayması oranı %5,72 olarak ölçüldü. Düşük glukoz içeren üreme ortamında glukoz baskılamanın kalktığı ve derepres koşullar olduğu durumda bu oranın %1,82'ye inerek 2 kattan daha fazla azaldığı görüldü. Alternatif karbon kaynağı olarak kullanılan gliserol laktatta üretilen hücrelerde ise çerçeve kayması oranı %1,00 olarak ölçüldü. Bu miktar glukoz baskılamasına maruz

kalan hücrelerle kıyaslandığında yaklaşık 6 kat daha az EST3 translasyonunu anlamına gelmektedir (Çizelge 4.2). Yani *Δstm1* hücrelerinde de, yaban tip hücrelerde olduğu gibi Est3p üretimi sırasında farklı karbon kaynaklarının çerçeve kayması oranlarına etkileri ile hücre bölünme hızı arasında korelasyon bulundu.

Yaban tip suş ile çerçeve kayması oranları karşılaştırıldığında glukoz baskılama koşullarına maruz kalmış *Δstm1* hücrelerinin çerçeve kayması oranının yaban tip hücrelere göre 1,5 kattan daha fazla azaldığı görüldü. Derepres koşullar altında *Δstm1* hücreleri yaban tip hücrelere kıyasla 1,7 kat daha az Est3p ürettiler. Alternatif karbon kaynağında üretilen hücrelerde ise çerçeve kayması oranı bazal seviyelerde kaldı (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Farklı karbon kaynaklarının *Δstm1* hücrelerde çerçeve kaymasına etkileri

| Üreme Koşulları | Çerçeve Kayması Oranı ¹ | Karbon Kaynağı Farkı ² | Suş Farkı ³ |
|--|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| Glukoz Baskılama (R, %2 Glukoz) | 5,72 ± 0,72 | | -1,54 |
| Glukoz Derepres (DR, %0.05 Glukoz) | 2,82 ± 0,19 | -2,02 | -1,73 |
| Alternatif Karbon (GL, %2 Gliserol Laktat) | 1,00 ± 0,43 | -5,72 | +1,12 |

¹EST3 çerçeve kayması oranları her yüz adet translasyon olayında meydana gelen çerçeve kayması miktarı olarak verilmiştir.

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

³Değişim oranları aynı karbon kaynağında yetişen yaban tip suşa göre kat azalma (-) veya artış (+) olarak verilmiştir.

4.4. *ASC1* Geninin *EST3* Çerçeve Kayması Regülasyonundaki Rolü

Bölüm 2'de bahsedildiği üzere *Asc1p* çeşitli sinyal molekülleriyle etkileşen ve glukoz sinyalinde rol aldığı bilinen bir proteindir. Ayrıca ribozomun mRNA çıkış kanalında yer aldığı bilinmektedir. Ribozoma başka proteinleri getiren scaffold işlevi vardır.

Glukoz baskılama koşullarına maruz kalmış *Δasc1* hücrelerde *Est3p* üretimi sırasında çerçeve kayması oranı %2,60 olarak ölçüldü. Düşük glukoz içeren üreme ortamında glukoz baskılamanın kalktığı ve derepres koşullar olduğu durumda bu oranın %1,69'a inerek 1,5 kattan daha fazla azaldığı görüldü. Alternatif karbon kaynağı olarak kullanılan gliserol laktat ile üretilen hücrelerde ise çerçeve kayması oranı %0,33 olarak ölçüldü. Gliserol laktatta üretilmiş hücrelerdeki çerçeve kayması oranı glukoz baskılamasına maruz kalan hücrelerle kıyaslandığında neredeyse 8 kat azalma gösterdi (Çizelge 4.3). Bu demek oluyor ki *Δasc1* hücrelerinde de, yaban tip ve *Δstm1* hücrelerde olduğu gibi *Est3p* üretimi sırasında farklı karbon kaynaklarının çerçeve kayması oranlarını yaptıkları etki ile hücre çoğalma hızı arasında korelasyon bulundu.

Yaban tip suş ile çerçeve kayması oranları karşılaştırıldığında, *Δasc1* hücrelerindeki çerçeve kayması seviyelerinde *Δstm1* hücrelerdekinden daha dramatik bir azalma gözlemlendi. Glukoz baskılama koşullarında *Δasc1* hücrelerinin çerçeve kayması oranının yaban tip hücrelere göre neredeyse 3,5 kat azaldığı görüldü. Derepres koşullar altında *Δasc1* hücreleri yaban tip hücrelere kıyasla neredeyse 3 kat daha az *Est3p* ürettiler. Alternatif karbon kaynağında büyütülen hücrelerde ise çerçeve kayması oranı yine bazal seviyelerde kaldı (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Farklı karbon kaynaklarının *Δasc1* hücrelerde çerçeve kaymasına etkileri

| Üreme Koşulları | Çerçeve Kayması Oranı ¹ | Karbon Kaynağı Farkı ² | Suş Farkı ³ |
|--|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| Glukoz Baskılama (R, %2 Glukoz) | 2,60 ± 0,28 | | -3,40 |
| Glukoz Derepres (DR, %0.05 Glukoz) | 1,69 ± 0,12 | -1,54 | -2,89 |
| Alternatif Karbon (GL, %2 Gliserol Laktat) | 0,33 ± 0,15 | -7,88 | -2,70 |

¹*EST3* çerçeve kayması oranları her yüz adet translasyon olayında meydana gelen çerçeve kayması miktarı olarak verilmiştir.

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

³Değişim oranları aynı karbon kaynağında yetişen yaban tip suşa göre kat azalma (-) veya artış (+) olarak verilmiştir.

4.5. *SNF1* Geninin *EST3* Çerçeve Kayması Regülasyonundaki Rolü

Bölüm 2'de bahsedildiği üzere *Snf1p* derepressed koşulların oluşmasında çok önemli bir faktördür. Glukozun kısıtlı olduğu ortamlarda veya glukozdan daha az tercih edilen karbon kaynaklarının kullanımında gereklidir. Büyük bir gen grubunun transkripsiyonunu regüle eder. Enzim aktivitelerini modifiye eder. Çok çeşitli çevresel koşula cevapta görev aldığı bilinmektedir. *Δsnf1* maya suşunda, bu araştırmada kullanılan ve her biri *Snf1p* üreten diğer suşların aksine karbon kaynağındaki değişimin çerçeve kayması oranlarına etki etmediği görüldü.

Glukoz baskılama koşullarında üretilen *Δsnf1* hücrelerde *Est3p* üretimi sırasında çerçeve kayması oranı %6,28 olarak ölçüldü. Derepres koşullarda bu oranın %5,03'e indiği görüldü. Alternatif karbon kaynağı olarak kullanılan gliserol laktatta üretilen hücrelerde ise çerçeve kayması oranı %6,32 olarak ölçüldü. Yüksek glukoz

konsantrasyonunda üretilmiş hücelere nazaran çerçeve kayması oranlarındaki azalma oranı hem düşük glukoz hem de gliserol laktatta büyümüş hücelerde 1:1'e yakın (sırasıyla 1,25 ve 1,01) olarak hesaplandı (Çizelge 4.4). Bütün diğer suşlardan farklı olarak karbon kaynağındaki değişimlerin çerçeve kayması oranlarına büyük miktarda etki etmedikleri görüldü.

Yaban tip suş ile çerçeve kayması oranları karşılaştırıldığında, glukoz baskılama koşullarında üretilmiş *Δsnf1* hücelerindeki çerçeve kaymasında yaklaşık 1,5 kat azalma görülürken derepres koşullar neredeyse 1:1 oranı (1,03 azalma) gösterdi. Alternatif karbon kaynağında üretilen diğer suşlarda çerçeve kayması oranları bazal seviye olduğu anlaşılan %1 oranları etrafında seyrederken *Δsnf1* hücelerinde yaban tip hücelere nazaran 7 kattan daha büyük bir çerçeve kayması artışı görüldü (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Farklı karbon kaynaklarının *Δsnf1* hücelerde çerçeve kaymasına etkileri

| Üreme Koşulları | Çerçeve Kayması Oranı ¹ | Karbon Kaynağı Farkı ² | Suş Farkı ³ |
|--|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| Glukoz Baskılama (R, %2 Glukoz) | 6,28 ± 0,29 | | +1,41 |
| Glukoz Derepres (DR, %0.05 Glukoz) | 5,03 ± 0,06 | -1,25 | -1,03 |
| Alternatif Karbon (GL, %2 Gliserol Laktat) | 6,32 ± 0,05 | -1,01 | +7,10 |

¹*EST3* çerçeve kayması oranları her yüz adet translasyon olayında meydana gelen çerçeve kayması miktarı olarak verilmiştir.

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

³Değişim oranları aynı karbon kaynağında yetişen yaban tip suşa göre kat azalma (-) veya artış (+) olarak verilmiştir.

4.6. Hücrelerin Üreme Aşamalarının *EST3* Çerçeve Kayması Oranına Etkileri

S. cerevisiae'da büyüme aşamasının Est3p translasyonu üzerindeki etkisini ölçmek için hücreler durağan fazda uzun süre bekletildi. Çizelge 4.5'te durağan faz hücrelerinin çerçeve kayması oranları logaritmik faza kadar üretilmiş hücrelerinkine karşılaştırıldı. Karşılaştırma yapılırken başlangıç karbon kaynağı konsantrasyonu durağan fazdakilerle aynı olan %2 glukozda üretilmiş logaritmik faz sonuçları seçilerek karşılaştırmanın aynı üreme şartları üzerine dayandırılması hedeflendi. Hücreler 24 saat boyunca üretildiklerinde çerçeve kaymasında logaritmik faza oranla neredeyse 2 kat azalma görüldü. Üreme süresi 48 saate çıkarıldığında azalma 2,5 kata ulaştı. 48 saat üretildikten sonra taze besi yerine aktarılıp inkübe edilen hücrelerde ise çerçeve kaymasında tekrar bir artış gözlemlendi ve logaritmik faza oranla fark 2 katına indi.

Çizelge 4.5. Buldukları üreme aşamasının hücrelerde çerçeve kaymasına etkileri

| Üreme Koşulları | Çerçeve Kayması Oranı ¹ | Üreme aşaması farkı ² |
|---------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| 24 saat | 4,48 ± 0,81 | -1,97 |
| 48 saat | 3,53 ± 0,41 | -2,50 |
| 48 saat + 4 saat Taze besi yeri | 4,40 ± 0,63 | -2,01 |

¹*EST3* çerçeve kayması oranları her yüz adet translasyon olayında meydana gelen çerçeve kayması miktarı olarak verilmiştir.

²Değişim oranları aynı karbon kaynağında logaritmik faza kadar büyütülen hücrelere oranla kat azalma (-) veya artış (+) olarak verilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Araştırmalarımızda glukoz sinyalinin Est3p üretilirken gerçekleşen çerçeve kayması oranı üzerinde etkin olduğu bulunmuştur. *S. cerevisiae*'da glukoz sinyali maya karbon metabolizmasını düzenleyen en önemli öğelerden biridir ve karbon kaynağı seçiminin hücre büyümesine doğrudan bir etkisi olduğu bilinmektedir. Yüksek glukoz konsantrasyonundaki hücrelerin gliserol laktat gibi alternatif karbon kaynaklarına oranla çok daha hızlı bölünmelerinin sebebinin glukozun en verimli şekilde fermante edilebilen ve maya hücrelerinin en hızlı şekilde yüksek miktarlarda etanol biriktirmesini sağlayabilen ve böylece çevredeki rakip mikroorganizmaların ortamında barınmasını engellemesiyle hücrelere evrimsel bir avantaj sağlayan şeker olduğu düşünülmektedir. Hücrelerin hızla çoğalması etanol birikiminin artmasına sağlanan katkının bir başka kaynağıdır.

Hücrelerin hızla çoğalması genomun da hızla kopyalanması ihtiyacını doğurur. Her yavru hücreye tam bir set genom gitmesi için genetik materyalin kopyalanma hızı hücrelerin bölünme hızıyla orantılı olmalıdır. DNA replikasyonu sırasında DNA polimerazın kromozom uçlarında primer kullanmasından ötürü ortaya çıkan uç kopyalama sorununun çözülmesi için telomerlerin üretilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu görev için özelleşmiş telomeraz enziminin aktivitesinin de hücre bölünme hızıyla uyumlu olacak şekilde kontrol edilmesi olası görünmektedir. Hücre bölünme hızına doğrudan etki eden karbon kaynağı seçiminin telomerazın düzenleyici altbirimi olan Est3p'nin hücre içi konsantrasyonuna da etki etmesi bu bağlamda değerlendirilebilir. Araştırmalarımızda karbon kaynağı seçiminin çerçeve kayması verimine olan etkisinin seçilen karbon kaynağının hücre bölünmesine olan etkisiyle orantılı olduğu görülmüştür.

EST3 çerçeve kayması oranlarını belirlemek için bu araştırmada β -galaktosidaz enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Bunun yanında ayrıca Köln Genetik Enstitüsü'nde de paralel bir araştırma yürütülmüş ve Est3p seviyeleri myc-tag içeren plazmitler yardımıyla western blot yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Protein seviyeleri düşük olduğu için flüorışma

ile görüntülenememiştir. Deney düzeneği *EST3* genindeki çerçeve kayması seviyelerini ölçmek üzere optimize edilmelidir. Bu amaçla başka bir proje tasarlanabilir.

EST3 çerçeve kayması üzerinde karbon kaynağı kaynaklı değişimlerin glukoz sinyaline mi yoksa hücrelerin büyüme hızını etkileyen başka bir duruma mı bağlı olduğunu anlamak için durağan fazda uzun süre bekletilen hücreler ile çerçeve kayması ölçümleri yapıp oranlar logaritmik faza kadar üretilmiş hücrelerinkiyle karşılaştırılmıştır. Çerçeve kayması oranlarının karbon kaynağı aynı olmasına rağmen uzun süre üremeye bırakılan hücrelerde yarıya indiği görülmüştür. Karşılaştırma yapılırken başlangıç karbon kaynağı konsantrasyonu durağan fazdakilerle aynı olan yüksek glukoz konsantrasyonunda üretilmiş logaritmik faz sonuçları seçilmiştir. Çerçeve kayması oranlarına bakıldığı zaman 24 ve 48 saat boyunca üretilen hücrelerindeki oranların logaritmik faza kadar üretilmiş yüksek glukoz konsantrasyonu seviyelerinde değil, logaritmik faza kadar üretilmiş düşük glukoz seviyelerinde olduğu görülmüştür. İnkübasyon sırasında hücrelere besin takviyesi yapılmadığından dolayı ortamdaki glukoz konsantrasyonunun düşmesi beklendiği için bu sonuç glukoz sinyal yolağıyla *EST3* çerçeve kayması veriminin arasında bir ilişki olduğuna dair kanıyı destekler niteliktedir. 48 saat büyütülen hücreler taze besi yerine aktarılıp yüksek glukoz konsantrasyonunda inkübe edildiği zaman çerçeve kayması oranının tekrar yükseldiği gözlemlenmiştir. Fakat elde edilen çerçeve kayması oranı logaritmik faz hücreleriyle karşılaştırıldığında düşüktür. Bunun sebebinin uzun süreli durağan fazdan sonra taze besi yerine hücrelerinin tamamı aktarıldığı için hücre miktarının logaritmik faz için ekilen hücre miktarından çok daha fazla olması ve aynı süre boyunca yüksek glukoz konsantrasyonunda inkübe edilmelerine rağmen durağan faz hücrelerinin ortamındaki glukozun çabuk tükenmiş olması olduğu tahmin edilmektedir. Hücreler uzun süre durağan fazda bekledikten sonra yıkılarak ayırma ("elutriation") yöntemiyle yeni üreyen hücreler ile yaşlı hücrelerin birbirinden ayrılması ve deneyin tekrarlanması bu konuda daha net bir sonuç çıkmasını sağlayabilir.

EST3 çerçeve kaymasının glukoz sinyaliyle düzenlendiğini destekleyen en önemli bulgu karbon kaynağının hücreler üzerinde yaptığı etkinin *SNF1* mutant hücrelerde etki

göstermemiş olmasıdır. Snf1p'nin, düşük glukoz konsantrasyonu ortamlarında hücrelerin alternatif ya da fermente edilemeyen karbon kaynaklarında büyümelerini sağladığı bilinmektedir. Snf1p, Mig1p'nin aktivitesini engelleyerek çoğunluğu alternatif karbon kaynaklarının metabolize edilmesiyle ilgili olmak üzere en az 90 farklı genin baskılanmasını kaldırır. Ayrıca Cat8p ve Sip4p aktivitelerini arttırarak glukoneogenez, solunum ve glioksilat döngüde görev alan genlerin ifade seviyelerinin yükselmesini sağlar. Glukozun varlığında Snf1p inaktif durumda olur, yani *Δsnf1* hücreler karbon kaynağından bağımsız olarak glukoz baskılama etkisi altında büyürler. Araştırma sonuçlarımıza bakıldığında yaban tip hücrelerde gliserol laktat etkisiyle %0,89 oranında çerçeve kayması görülürken *Δsnf1* hücrelerin çerçeve kaymasının %6,32'ye yükselerek 7 kat oranında artmış olması Snf1p'nin eksikliğinin hücre açısından anlamı göz önüne alınarak değerlendirildiğinde çerçeve kayması üzerinde glukoz sinyalinin etki ettiğini göstermektedir. Snf1p'nin aktive olduğu glukoz yoksunu durumlarda çerçeve kayması düşük seviyede görülürken Snf1p'nin inaktive olduğu glukoz baskılama koşullarında ya da Snf1p'ne sahip olmayan mutant hücrelerde çerçeve kayması yüksek seviyelerdedir. Çerçeve kaymasında Snf1p'nin aktive ettiği yolaklardan birinin baskılayıcı etkisi olabileceği gibi glukoz sinyalinin aktive edici bir etkisi de söz konusu olabilir.

Glukoz baskılaması olarak adlandırılan durumda büyüyen hücrelerde organizmanın tüm genomundaki genlerin neredeyse yarısının etkilendiği bilinmektedir. Karbon kaynağının *EST3* çerçeve kayması üzerinde etkisinin moleküler mekanizmasını anlamak için kullanılan diğer mutantların seçiminde hem besin yolaklarıyla ilişkisi hem de ribozomla etkileşimi olduğu bilinen Asc1p ve Stm1p seçilmiştir.

Asc1p'nin çerçeve kayması üzerinde etkili olduğuna dair yakın zamanlı başka araştırmalar da yapılmıştır. Wolf ve Grayhack (2015) Asc1p'nin spesifik olarak CGA kodonlarında çerçeve kaymasını baskıladığını bulmuştur. Bu etkinin translasyon sırasında uzamakta olan amino asit zincirinin çıkış tünelineki durumuna göre peptidil transferaz reaksiyonunu veriminin etkilenecek ribozomun duraklamasına sebep olabilmesiyle bağlantılı olabileceğini belirtmişlerdir. *ASCI* mutanları hücrelerde çerçeve kayması baskısı kalktığında mRNA üzerindeki çerçeve kayması noktasının uzamakta

olan amino asit zincirinin çıkış kanalını çoğunlukla kapladığı bir noktada gerçekleşmesi dikkat çekicidir. Bizim araştırmamızda ise Asc1p'nin çerçeve kayması üzerinde aktive edici bir etki yaptığına dair bulgular elde edilmiştir. *Δasc1* hücrelerde çerçeve kayması oranlarının 3 kat civarında azaldığı görülmüştür. Wolf ve Grayhack'in (2015) araştırmalarında ortaya koydukları model *EST3* çerçeve kayması için de geçerli olabilir. Yalnız, *EST3* çerçeve kayması bölgesinde CGA kodonu olmadığı için Asc1p'nin etkisinin baskılayıcı değil aktive edici bir sonuç doğurması mümkün olabilir. Stm1p hakkında benzer bir araştırma henüz yapılmamış olsa da bizim araştırmamız sonucunda *Δstm1* hücrelerde yaban tip hücrelere oranla 1.5 kat civarı daha az çerçeve kayması gerçekleştiği bulunmuştur. Stm1p'nin ribozomla etkileşimleri göz önüne alındığında gelecekteki araştırmalarda çerçeve kayması üzerinde Asc1p gibi daha genel etkilerinin bulunması mümkün görünmektedir.

KAYNAKLAR

- Adams, D.R., Ron, D., Kiely, P.A. 2011.** RACK1, A multifaceted scaffolding protein: structure and function. *Cell Commun. Signal.*, 9: 22.
- Adamski, F.M., Donly, B.C., Tate, W.P. 1993.** Competition between frameshifting, termination and suppression at the frameshift site in the *Escherichia coli* release factor-2 mRNA. *Nucleic Acids Res.*, 21: 5074–5078.
- Ahuatzi, D., Riera, A., Pelaez, R., Herrero, P., Moreno, F. 2007.** Hxk2 regulates the phosphorylation state of Mig1 and therefore its nucleocytoplasmic distribution. *J. Biol. Chem.*, 282(7): 4485–4493.
- Ashrafi, K., Lin, S.S., Manchester, J.K., Gordon, J.I. 2000.** Sip2p and its partner Snf1p kinase affect aging in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.*, 14: 1872–1885.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. 1987.** Current protocols in molecular biology. Green Publ. Assoc. and Wiley Interscience, New York, s. 1.6.1-1.6.6.
- Balagopal, V., Parker, R. 2011.** Stm1 modulates translation after 80S formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, 17: 835-842.
- Baranov, P.V., Gesteland, R.F., Atkins, J.F. 2002.** Recoding: translational bifurcations in gene expression. *Gene*, 286: 187–201.
- Bayram, Ö. 2003.** Ortam Şartlarının Ty2 Retrotranspozonu Transkripsiyonuna Ve Frame Shift Oranına Etkilerinin Analizi. *Yüksek Lisans Tezi*, UÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Bursa.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., Yusupov, M. 2011.** The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*, 334: 1524-1529.
- Blackburn, E.H. 2005.** Telomerase and Cancer. *Mol. Cancer Res.*, 3(9): 477-482.
- Blobel, G., Sabatini, D.D. 1970.** Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fractions. I. Location of the polypeptides within ribosomes. *J. Cell Biol.*, 45: 130–145.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., Wright, W.E. 1998.** Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279(5349): 349-52.
- Carlson, M., Osmond, B.C., Botstein, D. 1981.** Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics*, 98(1): 25–40.

- Celenza, J.L., Carlson, M. 1984.** Cloning and genetic mapping of SNF1, a gene required for expression of glucose-repressible genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 4(1): 49–53.
- Celenza, J.L., Carlson, M. 1986.** A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science*, 233(4769): 1175–1180.
- Celenza, J.L., Carlson, M. 1989.** Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol. Cell Biol.*, 9(11): 5034–5044.
- Chandler, M., Fayet, O. 1993.** Translational frameshifting in the control of transposition in bacteria. *Mol. Microbiol.*, 7: 497–503.
- 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 Res.*, 40: 700–705.
- de Lange, T. 2009.** How telomeres solve the end-protection problem. *Science*, 326(5955): 948-52.
- Dewar, J.M., Lydall, D. 2012.** Similarities and differences between "uncapped" telomeres and DNA double-strand breaks. *Chromosoma*, 121(2): 117-30.
- Duina, A.A., Miller, M.E., Keeney, J.B. 2014.** Budding Yeast for Budding Geneticists: A Primer on the *Saccharomyces cerevisiae* Model System. *Genetics*, 197: 33–48.
- Dymond, J.S., Richardson, S.M., Coombes, C.E., Babatz, T., Muller, H., Annaluru, N., Blake, W.J., Schwerzmann, J.W., Dai, J., Lindstrom, D.L., Boeke, A.C., Gottschling, D.E., Chandrasegaran, S., Bader, J.S., Boeke, J.D. 2011.** Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design. *Nature*, 477: 471–476.
- Gerbasi, V.R., Weaver, C.M., Hill, S., Friedman, D.B., Link, A.J. 2004.** Yeast Asc1p and mammalian RACK1 are functionally orthologous core 40S ribosomal proteins that repress gene expression. *Mol. Cell. Biol.*, 24: 8276–8287.
- Gesteland, R.F., Atkins, J.F. 1996.** Recoding: dynamic reprogramming of translation. *Annu. Rev. Biochem.*, 65: 741–768.
- 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.

- Greider, C.W., Blackburn, E.H. 1987.** The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell*, 51(6): 887-98.
- Guarente, L. 1983.** Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol.*, 101: 181-191.
- Harari, Y., Kupiec, M. 2014.** Genome-wide studies of telomere biology in budding yeast. *Microbial Cell*, 1(3): 70-80.
- Hedbacker, K., Carlson, M. 2008.** SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front Biosci.*, 13: 2408-2420.
- Hedbacker, K., Carlson, M. 2008.** SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front. Biosci.*, 13:2408–2420.
- Hedges, D., Proft, M., Entian, K.D. 1995.** CAT8, a new zinc cluster-encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 15(4): 1915–1922.
- Hiesinger, M., Roth, S., Meissner, E., Schuller, H.J. 2001.** Contribution of Cat8 and Sip4 to the transcriptional activation of yeast gluconeogenic genes by carbon source-responsive elements. *Curr. Genet.*, 39(2): 68–76.
- Honigberg, S.M., Lee, R.H. 1998.** Snf1 kinase connects nutritional pathways controlling meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 18: 4548–4555.
- Hughes, T.R., Evans, S.K., Weilbaecher, R.G., Lundblad, V. 2000.** The Est3 protein is a subunit of yeast telomerase. *Current biology*, 10(13): 809-12.
- Jenner, L., Melnikov, S., Garreau de Loubresse N., Ben-Shem, A., Iskakova, M., Urzhumtsev, A., Meskauskas, A., Dinman, J., Yusupova, G., Yusupov, M. 2012.** Crystal structure of the 80S yeast ribosome. *Current Opinion in Structural Biology*, 22: 759–767.
- Klein, C.J., Olsson, L., Nielsen, J. 1998.** Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Mig1 in metabolic functions. *Microbiology*, 144(Pt 1): 13–24.
- Kontos, H., Naphine, S., Brierley, I. 2001.** Ribosomal pausing at a frameshifter RNA pseudoknot is sensitive to reading phase but shows little correlation with frameshift efficiency. *Mol. Cell. Biol.*, 21: 8657–8670.
- Kramer, G., Ramachandiran, V., Hardesty, B. 2001.** Cotranslational folding — omnia mea mecum porto? *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 33: 541–553.

- Lendvay, T.S., Morris, D.K., Sah, J., Balasubramanian, B., Lundblad, V. 1996.** Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics*, 144(4): 1399-412.
- Lesage, P., Yang, X., Carlson, M. 1996.** Yeast SNF1 protein kinase interacts with SIP4, a C6 zinc cluster transcriptional activator: a new role for SNF1 in the glucose response. *Mol. Cell Biol.*, 16(5): 1921–1928.
- 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.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randal, R.J. 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Lundblad, V., Szostak, J.W. 1989.** A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell*, 57(4): 633-43.
- Lutfiyya, L.L., Iyer, V.R., DeRisi, J., DeVit, M.J., Brown, P.O., Johnston, M. 1998.** Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 150(4): 1377–1391.
- Malkin, L.I., Rich, A. 1967.** Partial resistance of nascent polypeptide chains to proteolytic digestion due to ribosomal shielding. *J. Mol. Biol.*, 26: 329–346.
- Martinez, A.K., Gordon, E., Sengupta, A., Shirole, N., Klepacki, D., Martinez-Garriga, B., Brown, L.M., Benedik, M.J., Yanofsky, C., Mankin, A.S. Vasquez-Laslop, N., Sachs, M.S., Cruz-Vera, L.R. 2014.** Interactions of the TnaC nascent peptide with rRNA in the exit tunnel enable the ribosome to respond to free tryptophan. *Nucleic Acids Res.*, 42: 1245–1256.
- Namy, O., Rousset, J.P., Naphine, S., Brierley, I. 2004.** Reprogrammed Genetic Decoding in Cellular Gene Expression. *Molecular Cell*, 13: 157–168.
- Nehlin, J.O., Carlberg, M., Ronne, H. 1991.** Control of yeast GAL genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. *EMBO J.*, 10(11): 3373–3377.
- Nehlin, J.O., Ronne, H. 1990.** Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. *EMBO J.*, 9(9): 2891–2898.
- Neigeborn, L., Carlson, M. 1984.** Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 108(4): 845–858.
- Nilsson, J., Sengupta, J., Frank, J., Nissen, P. 2004.** Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO reports*, 5(12): 1137-1141.

Peeters, K., Thevelein, J.M. 2014. Glucose Sensing and Signal Transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism, Editörler: Piskur, J., Compagno, J. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, s. 21-56.

Plant, E.P., Jacobs, K.L., Harger, J.W., Meskauskas, A., Jacobs, J.L., Baxter, J.L., Petrov, A.N., Dinman, J.D. 2003. The 9A° solution: How mRNA pseudoknots promote efficient programmed -1 ribosomal frameshifting. *RNA*, 9: 168–174. *PLoS Biol.*, 2(5): 128.

Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S.F., Haag, A., Ban, N. 2011. Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science*, 331: 730–736.

Rahner, A., Hiesinger, M., Schuller, H.J. 1999. Deregulation of gluconeogenic structural genes by variants of the transcriptional activator Cat8p of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, 34(1): 146–156.

Ramu, H., Vazquez-Laslop, N., Klepacki, D., Dai, Q., Piccirilli, J., Micura, R., Mankin, A.S. 2011. Nascent peptide in the ribosome exit tunnel affects functional properties of the A-site of the peptidyl transferase center. *Mol. Cell*, 41: 321–330.

Randez-Gil, F., Bojunga, N., Proft, M., Entian, K.D. 1997. Glucose derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with phosphorylation of the gene activator Cat8p. *Mol. Cell Biol.*, 17(5): 2502–2510.

Rolland, F., Winderickx, J., Thevelein, J.M. 2001. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.*, 26(5):310–317.

Rolland, F., Winderickx, J., Thevelein, J.M. 2002. Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res.*, 2(2):183–201.

Rose, M.D., Winston, F., Heiter, P. 1990. *Methods in Yeast Genetics -- A Laboratory Course Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, s. 119-195.

Santangelo, G.M. 2006. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70(1): 253–282.

Sengupta, J., Nilsson, J., Gursky, R., Spahn, C.M., Nissen, P., Frank, J. 2004. Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11: 957–962.

Steinmetz, L.M., Scharfe, C., Deutschbauer, A.M., Mokranjac, D., Herman, Z.S., Jones, T., Chu, A.M., Giaever, G., Prokisch, H., Oefner, P.J., Davis, R.W. 2002. Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat. Genet.*, 31: 400–404.

Taliaferro, D., Farabaugh, P.J. 2007. An mRNA sequence derived from the yeast EST3 gene stimulates programmed +1 translational frameshifting. *RNA*, 13: 606–613.

Van Dyke, N., Baby J., Van Dyke, M.W. 2006. Stm1p, a Ribosome-associated Protein, is Important for Protein Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* under Nutritional Stress Conditions. *J. Mol. Biol.* 358: 1023–1031.

Van Dyke, N., Pickering, B.F., Van Dyke, M.W. 2009. Stm1p alters the ribosome association of eukaryotic elongation factor 3 and affects translation elongation. *Nucleic Acids Res.* 37: 6116–6125.

Vimaladithan, A., Farabaugh, P.J. 1994. Special peptidyl–tRNA molecules promote translational frameshifting without slippage. *Mol. Cell. Biol.*, 14: 8107–8116.

Vincent, O., Carlson, M. 1998. Sip4, a Snf1 kinase-dependent transcriptional activator, binds to the carbon source-responsive element of gluconeogenic genes. *EMBO J.*, 17(23): 7002–7008.

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.

Watson, J.D. 1972. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature: New biology*, 239(94): 197–201.

Winzler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., Chu, A.M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S.W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S.H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J.H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Liebundguth, N., Lockhart, D.J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N., Menard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J.L., Riles, L., Roberts, C.J., Ross-MacDonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Véronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T.R., Wysocki, R., Yen, G.S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M., Davis, R.W. 1999. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 285: 901–906.

Wolf, A.S., Grayhack, E.J. 2014. Asc1, homolog of human RACK1, prevents frameshifting in yeast by ribosomes stalled at CGA codon repeats. *RNA*, 21:935–945.

Woods, A., Munday, M.R., Scott, J., Yang, X., Carlson, M., Carling, D. 1994. Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo. *J. Biol. Chem.*, 269(30): 19509–19515.

Zaman, S., Lippman, S.I., Zhao, X., Broach, J.R. 2008. How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu. Rev. Genet.*, 42: 27–81.

EKLER

Ek 1: Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması

1: YPD (Yeast Ekstrakt, Pepton, Dekstroz)

YPD besiyeri *S. cerevisiae* için üreme ortamı olarak kullanılan zengin besiyeridir. YP besiyeri için 10 gram Yeast Ekstrakt ve 20 gram Pepton kullanıldı. Toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlandı. Bu karışım 121°C'de 25 dakika otoklavda steril edildi. YPD petrilerini hazırlamak için sıvı besiyerine 20 gram/litre olacak şekilde agar agar eklendi ve 121°C'de 25 dakika otoklavda steril edildi.

Karbon kaynağı olarak kullanılan glukoz %20'lik stok çözelti halinde hazırlandı ve 121°C'de 25 dakika otoklavda steril edildi. Kullanımdan hemen önce üreme ortamına son konsantrasyonu %2 olacak şekilde ilave edildi.

2: LB (Luria-Bertani sıvı besiyeri)

10 gram Bacto tripton, 5 gram Yeast Ekstrakt ve 10 gram NaCl toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlandı. 121°C'de 25 dakika otoklavda sterilize edildi.

LB-Ampisilin üreme ortamı için ampisilin filtrede sterilize edildikten sonra son konsantrasyonu 100 mg/litre olacak şekilde kullanımdan önce taze olarak üreme ortamına eklendi.

LB petrileri hazırlamak için LB sıvı besiyerine 15 gram/litre agar agar eklendi ve daha sonra 121°C'de 25 dakika otoklavda steril edildi. LB-Ampisilin petrileri için filtrede sterilize edilmiş ampisilin son konsantrasyonu 100 mg/litre olacak şekilde üreme ortamına eklendi.

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

Sc-Ura *S. cerevisiae* transformantları için seçici besiyeri olarak kullanıldı. 6.7 gram YNB (%0.5 amonyumlu, aminoasitsiz) 1 litre distile suda çözüldü ve 121°C'de 25 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi. Sc-Ura katı besiyeri için son konsantrasyon 20 gram/litre olacak şekilde agar agar eklenerek 121°C'de 25 dakika

süreyle otoklavlandı. Aminoasit kaynağı olarak filtre sterilizasyon yöntemiyle sterilize edilmiş urasil içermeyen aminoasit karışımı (Sigma Y-1501) son konsantrasyon 1.92 gram/litre olacak şekilde kullanımdan hemen önce üreme ortamına ilave edildi. Karbon kaynağı olarak steril glukoz veya gliserol laktat üreme ortamına son konsantrasyonu Bölüm 3'te verildiği şekilde ilave edildi.

4: 1X TE (pH:7.4)

10 mM Tris.HCl (pH: 7.6) ve 1 mM EDTA (pH: 8.0) stok çözeltilerden seyreltilip otoklavda sterilize edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

5: Lityum Asetat-TE

3.5 ml 250 mM Lityum asetat; 10 mM Tris pH:8.0, 1 mM EDTA pH:8.0 ile çözülerek hazırlandı. Karışım 0.45 µm por çaplı membran disk filtre ile steril edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

6: %50 Polietilen Gilikol (PEG)

Polietilen Glikol (4000) distile suda %50'lik stok çözelti olarak hazırlandı, 121°C'de 25 dakika otoklavda steril edildi.

7: Lizis tampon çözeltisi

Bu tampon çözelti *S. cerevisiae* transformantlarını süspanse etmek için kullanıldı. 100 mM Tris.HCl (pH: 8), 1 mM DTT (1,4-Dithio-DL-threitol), %20 Gliserol ve 4 mM PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride) çözeltisi steril distile su ile hazırlandı ve +4°C'de saklandı.

8: Z tampon çözeltisi (Z Buffer)

β -galaktosidaz enzimatiik aktivitesi boyunca tampon çözelti olarak kullanıldı. 60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mM KCl, 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve 50 mM β -Merkepto etanol çözeltisi steril distile su ile hazırlandı ve $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

9: Lowry Çözeltisi

Hücre lizatlarındaki protein konsantrasyonunu belirlemek için kullanıldı.

- Lowry A çözeltisi: 20g Na_2CO_3 ve 4g NaOH toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü.

- Lowry B1 çözeltisi: 1 gram CuSO_4 toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile suda çözüldü.

- Lowry B2 çözeltisi. 2 gram Sodyum potasyum tartarat toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile suda çözüldü.

Lowry C her deneyde taze olarak stok çözeltilerden hazırlandı: 24.5 ml Lowry A, 250 μl Lowry B1, 250 μl Lowry B2 karıştırıldı ve hemen kullanıldı.

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

Konsantrasyonu 4 mg/ml olacak şekilde Z tampon çözeltisi içinde hazırlandı. $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

Ek 2: β - Galaktozidaz aktivitesi hesaplanması

S. cerevisiae transformantlarının ifadesi sonucu ortaya çıkan *lacZ* geninin ürünü β -galaktosidaz enzimi aktiviteleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

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

OD₄₂₀: Sarı rengin absorbansı

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

0.0045: ONPG'nin molar absorpsiyon katsayısı

t: β -galaktozidaz reaksiyon süresi (dakika)

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

P: Hücre lizatlarının protein konsantrasyonları (mg/ml)

β -galaktozidaz aktiviteli hesaplanmasında yukarıdaki formül excel tablosuna dönüştürülerek kullanılmıştır. Aktivite dakikada 1 mg protein tarafından hidroliz edilen nmol ONPG (nmol ONPG/dk/ mg protein) cinsinden verilmiştir

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Saliha Elif YILDIZHAN
Doğum Yeri ve Tarihi : Kayseri, 30.11.1988
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lise : İstanbul, Özel Amerikan Robert Lisesi/ 2007
Lisans : Boğaziçi Üniversitesi/ 2012
Yüksek Lisans : Uludag Üniversitesi/ 2015
Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : U.Ü. Moleküler Biyoloji ve Genetik ABD/
2013-2015
İletişim (e-posta) : salihayildizhan@gmail.com
Yayımları :

Sözlü Sunum

Yıldızhan, S.E., Türkel, S. 2014. Glucose signaling controls the programmed frameshift efficiency of the EST3 gene in *S. cerevisiae*. 3rd International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, 10-12 Eylül 2015, IYTE, İzmir