



**AZOT SĖNYAL ĖLETĖM YOLAĞININ EST3 GENĖNDE  
PROGRAMLI ĆERĆEVE KAYMASI ORANINA  
ETKĖLERĖĖNĖN ĖNCELENMESĖ**

**Mahmoud ARAFAT**



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

**AZOT SİNYAL GİLETİM YOLAĞININ EST3 GENİNDE PROGRAMLI  
ÇERÇEVE KAYMASI ORANINA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Mahmoud ARAFAT**

Prof. Dr. Sezai TÜRKEL  
(Danışman)

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

**BURSA-2016  
Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ ONAYI

Mahmoud Arafat tarafından hazırlanan "Azot sinyal iletim yolağının EST3 geninde programlı çerçeve kayması oranına etkilerinin incelenmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Prof. Dr. Sezai Türkel

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

İmza.  



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

İmza.  


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

İmza.  


Yukarıdaki sonucu onaylarım

  
Prof. Dr. Ali Osman DEMİR  
Enstitü Müdürü

20 / 09 / 2016

## Bilimsel Etik Bildirim Sayfası

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

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, iğitsel 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.**

20 / 09 / 2016

**Mahmoud ARAFAT**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### AZOT SİNYAL GİLETİM YOLAĞININ EST3 GENİNDE PROGRAMLI ÇERÇEVE KAYMASI ORANINA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

**Mahmoud ARAFAT**

Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Telomerler ökaryotlarda kromozom uçlarında bulunan özel yapılardır. Telomerlerin replikasyonu DNA polimeraz tarafından değil özel bir enzim kompleksi olan telomeraz tarafından yapılır. Telomerlerin tam olarak replike olması ökaryotlarda genom stabilitesi için önemlidir. Telomeraz enziminin düzenleyici alt birimlerinden birisi de EST3'dür. EST3 geni ifadesi translasyonun devamı sırasında programlı ribozomal frameshift (PRF) ile kontrol edilmektedir. Telomer uzunluklarının çeşitli stres faktörleri ve üreme ortamı koşullarına göre değiştiği bilinmektedir. Bu araştırmada *S. cerevisiae*'de üreme özelliklerine önemli etkisi olan azot sinyal iletim yolu ve bazı stres koşullarının telomeraz alt birimi olan EST3 gen ifadesinde PRF oranına etkileri incelendi. EST'de PRF oranının durağan fazdaki hücrelerde yaklaşık %50 daha az olduğu bulundu. Pseudohifsel üreme aşamasının ise EST3 PRF oranında 4 kat azalmaya yol açtığı bulundu. Normal ortamda %14.78 olan PRF oranının pseudohifsel üremede %4.39'a düştüğü tayin edildi. Farklı azot kaynaklarında üremenin de PRF oranına azot kaynağına bağlı olarak düşük seviyede etki ettiği bulundu. Amonyum gibi tercih edilen azot kaynağında %14.78 olan PRF oranının üre ortamında %11.82'e düştüğü tayin edildi. Etanol stresi uygulanan maya hücrelerinde PRF oranının %10.78'e azaldığı tayin edildi. Kafein'in ise PRF oranını önemli ölçüde azalttığı ve bu oranın %8.9'a indiği bulundu. Karbon kaynağı olarak etanol verilen hücrelerde ise PRF oranının yaklaşık %1'e kadar azaldığı tayin edildi. Elde edilen sonuçlar EST3'de PRF oranının üreme koşullarına göre kontrol edilebildiğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *S. cerevisiae*, Programlı çerçeve kayması, Azot sinyal yolağı, Telomeraz, Translasyonel kontrol, EST3.

**2016, VIII + 41 sayfa**

## ABSTRACT

M.Sc. Thesis

### INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF NITROGEN SIGNALING PATHWAY ON THE PROGRAMMED RIBOSOMAL FRAMESHIFT RATE IN *EST3* GENE

**Mahmoud ARAFAT**

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

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

Telomeres are the special structures located on the ends of the chromosomes. Replication of telomeres is carried out by special enzyme, telomerase complex, not by DNA polymerase. Complete and the full length replication of telomere ends are the crucial factors for genome stability in eukaryotes. *EST3* is one of the regulatory subunits of telomerase enzyme. The expression of *EST3* is regulated by the programmed ribosomal frameshift (PRF) during translation elongation stage. It is known that telomere lengths are regulated by stress factors and the growth conditions. In this research, the effect of nitrogen sources, stress factors and the growth conditions on the PRF rate was investigated. It was found that the PRF rate decreases 50% in the stationary stage. Moreover, PRF rate decreased at least 4-fold in the pseudohyphal growth conditions. While the PRF rate is 14.78% in normal conditions, it decreased to 4.39% in pseudohyphal growth. Growth on different nitrogen sources had low level effects on the PRF rate, depending on the nitrogen sources. While the PRF rate is 14.78% in ammonia containing medium, it decreases to 11.82% in urea medium. PRF rate decreased to 10.78% in ethanol stress applied cells. Furthermore, caffeine had a significant effect on the PRF rate and PRF rate decreased to 8.9% in caffeine applied cultures. When ethanol is present as the sole carbon and energy source PRF rate decreased to 1%. Overall, this result indicated that PRF rate of *EST3* can be controlled depending on the growth conditions.

**Keywords:** *S. cerevisiae*, Programmed ribosomal frameshifting, Nitrogen signaling, Telomerase, Translational regulation, *EST3*.

**2016, VIII + 41 pages**

## TEĞEKKÜR

Akademik alışmalarıma Trkiye’de devam etmemi sağlayan aileme, Uludağ niversitesinde bulunduğum srede bana her konuda destek olan danışmanım Prof.Dr. Sezai Trkel’e, tez deneylerim sırasında bana hep destek olan laboratuvar arkadaşlarım Seda, Canan, Tuğçe ve Aylin’e ok teğekkrler ederim,

Mahmoud ARAFAT  
20. 09. 2016



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLERİN DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	2
2.1. <i>S. cerevisiae</i> 'nin Genetik Yapısı.....	2
2.2. Maya Genetiği Terminolojisi.....	3
2.3. Telomerlerin Yapısal Özellikleri.....	4
2.4. EST3 Geninin Yapısı ve EST3 proteinin Sentezi.....	7
2.5. Azot Sinyal İletim Yolu ve Önemi.....	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	12
3.1. Araştırmada Kullanılan <i>S. cerevisiae</i> Suşları.....	12
3.2. <i>S. cerevisiae</i> Suşlarının Üretilmesi.....	12
3.3. EST3 Ekspresyon Vektörlerinin Yapısı.....	12
3.4. <i>S. cerevisiae</i> Suşlarına Transformasyon.....	14
3.5. <i>S. cerevisiae</i> Transformantlarının Üretilmesi.....	15
3.6. $\beta$ -Galaktozidaz Aktivitelerinin Tayini.....	17
4. BULGULAR.....	19
4.1. Üreme Aşamalarının EST3'de Frame Shift'e Etkisi.....	19
4.2. Azot Sinyal İletim Yoluğunun EST3'de Frame Shift'e Etkisi.....	21
4.3. Pseudohifsel Üremenin EST3'de Frame Shift'e Etkisi.....	23
4.4. Etanol ve Kafein Stresinin EST3'de Frame Shift'e Etkisi.....	25
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	28
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	31
EKLER.....	35
Ek 1: Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması.....	35
Ek 2: $\beta$ -gal aktivitesi hesaplanması.....	37
ÖZGEÇMİŞ.....	40



## 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-site:	Ribozomal amino açıl tRNA bölgesi
ADP:	Adenozin difosfat
ATP:	Adenozin trifosfat
DNA:	Deoksiribonükleik asit
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
E-site:	Ribozomal boş tRNA bölgesi
eEF:	Translasyonel devam faktörü
<i>EST</i> :	"Ever shorter telomere"
Gln:	Glutamin
<i>lacZ</i> :	β -galaktozidaz geni
Leu:	Lösin
M:	Molar
MAT:	Mating tipi
mg:	Miligram
ml:	Mililitre
mM:	Milimolar
mRNA:	Mesajcı ribonükleik asit
nmol:	Nanomol
OD:	"Optical Density"
ONPG:	O-Nitro-Fenil-β-D- Galaktosidaz
P-site:	Ribozomal peptidil-tRNA bölgesi
PEG:	Polyetilen glikol
Pro:	Prolin
pH:	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
RNA:	Ribonükleik asit
rpS:	Ribozomal küçük altbirim proteini
rRNA:	Ribozomal ribonükleik asit
<i>S. cerevisiae</i> :	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC- Ura:	"Syntethic complete minus uracil"

SGD:	"Saccharomyces Genome Database"
TE:	Tris-EDTA
TLC:	"Telomerase component"
TOR:	"Target of rapamycin"
tRNA:	TaÇıyıcı ribonükleik asit
URA:	"Uracil"
Val:	Valin
YNB:	"Yeast Nitrogen Base"
YPD:	"Yeast extract pepton dextrose"



## ġEKĠLLERĠN DĠZĠĠĠ

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>ġekil 2.1.</b> <i>S. cerevisia</i> ’nın yaġam dĠngüsü.	2
<b>ġekil 2.2.</b> <i>S. cerevisiae</i> ’da telomer yapısı	4
<b>ġekil 2.3.</b> <i>S. cerevisiae</i> ’da telomer yapısında bulunan faktĠrler	5
<b>ġekil 2.4.</b> <i>S. cerevisiae</i> ’da telomeraz enzim kompleksinin yapısı	6
<b>ġekil 2.5.</b> Farklı tŸrlerde telomer tekrarlarının sekans yapısı	7
<b>ġekil 2.6.</b> <i>EST3</i> geni kodlama bĠlgesi ve amino asit dizisi	8
<b>ġekil 3.1.</b> <i>EST3</i> ekspresyon vektĠrlerinin genel yapısı	13
<b>ġekil 4.1.</b> <i>S. cerevisiae</i> sigma 1278b suġunda pseudohifsel Ÿreme	24

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Çizelge 4.1.</b> Logaritmik aşamadaki <i>S. cerevisiae</i> suşlarında EST3'de frame shift oranları	20
<b>Çizelge 4.2.</b> Durağan aşamadaki <i>S. cerevisiae</i> suşlarında EST3'de frame shift oranları	20
<b>Çizelge 4.3.</b> Normal azot kaynaklarının EST3'de frameshift'e etkisi	22
<b>Çizelge 4.4.</b> Alternative azot kaynaklarının EST3'de frameshift'e etkisi	22
<b>Çizelge 4.5.</b> Pseudohifsel üremenin EST3'de frame shift, e etkisi	25
<b>Çizelge 4.6.</b> Kafein'in EST3'de frame shift, e etkisi	26
<b>Çizelge 4.7.</b> Etanol'ün EST3'de frame shift oranına etkisi	27

## 1. GİRİŞ

*S. cerevisiae* genom yapısı, üretimde sağladığı avantajlar ve kolaylıkla genetik değişim yapılabilmesi gibi teknik üstünlükleri dolayısıyla ökaryotik moleküler genetik araştırmalarında kullanılan önemli bir model organizmadır. Genomu sekanslanan ilk ökaryot olma özelliği taçır. *S. cerevisiae* bu araştırmanın konusu olan telomer yapılarının da araştırıldığı ilk organizmadır. *S. cerevisiae*'nin da model organizma olarak kullanıldığı ökaryotlarda telomer yapılarının aydınlatılması ile ilgili çalışmalar 2009 yılında "Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü" ile ödüllendirilmiştir. Elizabeth Blackburn, Carol W. Greider, ve Jack W. Szostak telomer yapılarının aydınlatılması ve telomerazlar ile ilgili çalışmaları dolayısıyla 2009 yılında Nobel Tıp ödülü alan araştırmacıdır (Szostak ve Blackburn, 1982) .

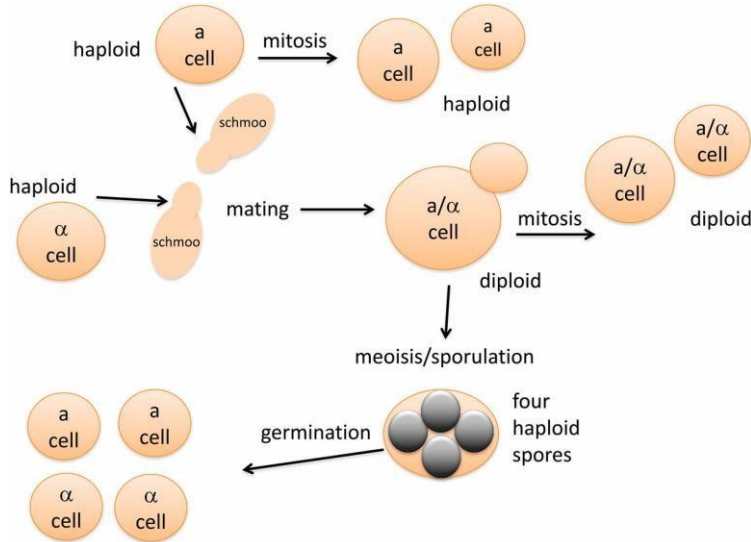
Ökaryotik kromozomlarda telomer replikasyonu ve telomer uzunluklarının korunması kromozomların korunması ve genomun devamlılığı için oldukça önemlidir. Telomerlerdeki kısalma yağanmanın genetik nedenlerinden birisidir. Bu nedenle telomer replikasyonu ile ilgili moleküler çalışmalar önem kazanmaktadır. *S. cerevisiae*'da telomeraz enzimi çok alt birimden oluşur. *S. cerevisiae*'da telomer replikasyonu ve telomerlerin korunması ile ilgili olarak 400 gen bulunur. Bu genlerden telomeraz enzimini oluşturanlarda mutasyon oluştuğunda telomerlerin sürekli kısaldığı görülmüş ve bu nedenle de telomeraz enzim kompleksindeki peptidlerin kodlandığı genler Ever Shorter Telomere (EST) adı verilmiştir. Bu çalışmada kontrol mekanizması incelenen Est3p de telomeraz enziminin düzenleyici alt birimidir, EST3 geninden kodlanmaktadır. *EST3* geni ifadesinin translasyonun devamı sırasında +1 programlı ribozomal çerçeve kayması (PRF) ile kontrol edildiği bulunmuştur. Telomerlerin replikasyonu ve uzunluklarının üreme koşullarına bağlı olarak uzadığı veya kısaldığı bilinmektedir. Bazı stres faktörlerine maruz bırakıldığında telomer uzunluklarında önemli değişiklikler rapor edilmiştir. Bu çalışmada da *EST3* gen ifadesinde PRF'e bazı üreme koşullarının etkileri incelenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar *EST3*'de PRF oranının özellikle durağan fazda ve pseudohifsel üremede çok azaldığı göstermektedir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. *S. cerevisiae*'nin Genetik Yapısı

*S. cerevisiae* tomurcuklanma (budding) ile çoğalan önemli bir ökaryotik model organizmadır. Ökaryotlarda temel genetik ve hüresel olayların moleküler ve biyokimyasal temellerini aydınlatmak için birçok araştırmada yaygın olarak kullanılmaktadır. *S. cerevisiae* üç çeşit hücre olarak bulunabilir, bunlar haploit MATa ve MAT $\alpha$  hücreleri ile diploit MATa/ $\alpha$  hücreleridir. Haploit MATa ve MAT $\alpha$  hücrelerinin uygun koşullarda eşleşmesi ile diploit hücreler meydana gelir. Diploit *S. cerevisiae* hücreleri de olumsuz şartlarda sporulasyona uğrayıp tekrar haploit maya hücrelerini meydana getirir (şekil 2.1) (Feldman, 2012).

*Saccharomyces cerevisiae* haploit *S. cerevisiae* genomunda 16 kromozom bulunur. Kromozomlar Pulse Field elektroforez ile kolayca ayrıştırılabilir. Ayrıca yeast genomunda 2 mikron plazmiti, RNA virüsleri, ve Ty elementleri (Transposon Yeast) bulunmaktadır (Feldman, 2012).



şekil 2.1. *S. cerevisiae*'nin yaşam döngüsü (Duina ve ark. 2014).

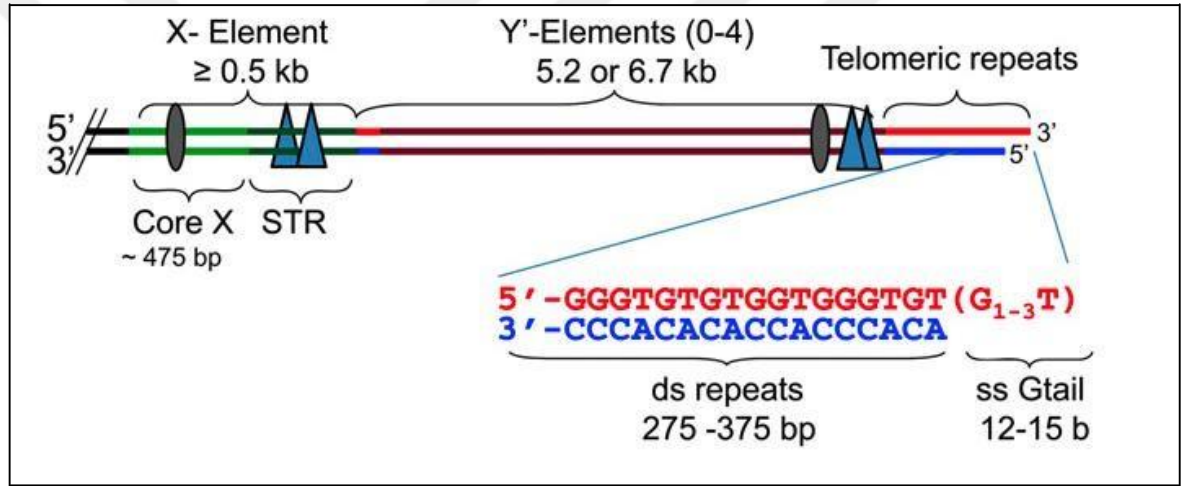
*S. cerevisiae*'nin haploit laboratuvar suşlarının birçoğu tam olarak sekanslanmıştır, 12.500 kbç uzunluğundadır. Protein kodlayan genler yaklaşık 6600 adettir. Bu genlerden yaklaşık %76'nın içlevi bilinmektedir. Genellikle maya genomda daha az intron bulunur, bu da genom yapısının çok yoğun olduğunu (compact genom) göstermektedir. Protein kodlayan genlerinde intron yüzdesi %3.8 olarak belirlenmiştir. Genler arası mesafe de (200-1000 bç) insan genomu ile karşılaştırıldığında çok kısadır (Goffeau ve ark. 1996). *S. cerevisiae*'da bulunan genlerin yapısal özellikleri ve kontrol mekanizmaları ile ilgili kapsamlı araştırma sonuçları Genome Data Base (SGD) adlı veri tabanında bulunur ve kolaylıkla erişilebilir (Cherry ve ark. 2012). SGD veritabanının sağladığı bilgiler ve yapısı ile ökaryotik genetik çalışmalarında önemli yer tutar (Cherry ve ark. 2012; Winzeler ve ark. 1999)

## 2.2. Maya Genetiği Terminolojisi

*S. cerevisiae* kromozomları büyüklüklerine göre alfabetik olarak sıralanmıştır. 16 kromozomdan en kısa kromozomu 240 Kbç olup en uzun kromozom da yaklaşık 2000 Kbç kadardır. *S. cerevisiae* genlerinin adlandırılmasında 3 harf sistemi kullanılır. Her genin hem geleneksel, fenotip ile ilgili bir veya birden çok adlandırılması ve bir de sistematik adı vardır. Örnek olarak araştırmamızda incelenecek olan *EST3* geninin adlandırılması verilecektir. *EST3* geni mutasyon sonucu telomerlerde sürekli kısalma olduğundan Ever Shorter Telomere 3 geni (*EST3*) olarak adlandırılmıştır. Sistematik adı ise YIL009C'dir. Y: Yeast'in kısaltılmasıdır. I: I-kromozomu (Kromozom 9), L veya R: Kodlama bölgesinin sentromere göre sağ veya sol tarafta olduğunu, C veya W: ilgili genin Watson veya Crick zincirinde olup olmadığını (*EST3* Crick zincirindedir). 009 ise ilgili genin sentromerden sonra kaçınıcı gen olduğunu gösterir (<http://www.yeastgenome.org>). Gen adları italik verilir, *EST3* gibi. Genlerden kodlanan proteinleri gen isimlerinden ayırt etmek için ise "p" kullanılır. Örnek: *EST3*, gen ismini ifade eder, *Est3p* ise proteini ifade eder. Gen delesyonları Δ ile gösterilir, örnek Δ*est3*, *EST3* geni delesyonu demektir. Gen füzyonları da *EST3::HIS4* şeklinde verilir. Burada verilen *EST3::HIS4* ifadesi *EST3* geni ile *HIS4* gen füzyonunu gösterir ve her iki gen de aktif ve fonksiyonel demektir. (Sherman, 2002).

### 2.3. Telomerlerin Yapısal Özellikleri

Ökaryotlarda kromozom uçları “Telomer” olarak adlandırılır. Telomerlerin replikasyonu da DNA polimeraz değil Telomeraz enziminin yapılıdır. Telomer dizileri uzun tekrarlı nükleotidlerden meydana gelir ve çok sayıda protein tarafından da kapatılırlar (Wellinger ve Zakian, 2012). Tekrarlanan nükleotid içeriği ve tekrar sayısı organizmaya göre değişiklik gösterir. *S. cerevisiae* telomer yapısı C1-3A/TG1-3 yapısında olup heterojen özelliktedir, 300 bç uzunluğundaki tekrarlı dizilerden oluşur (Şekil 2.2 ve 2.3) (Wellinger ve Zakian, 2012)



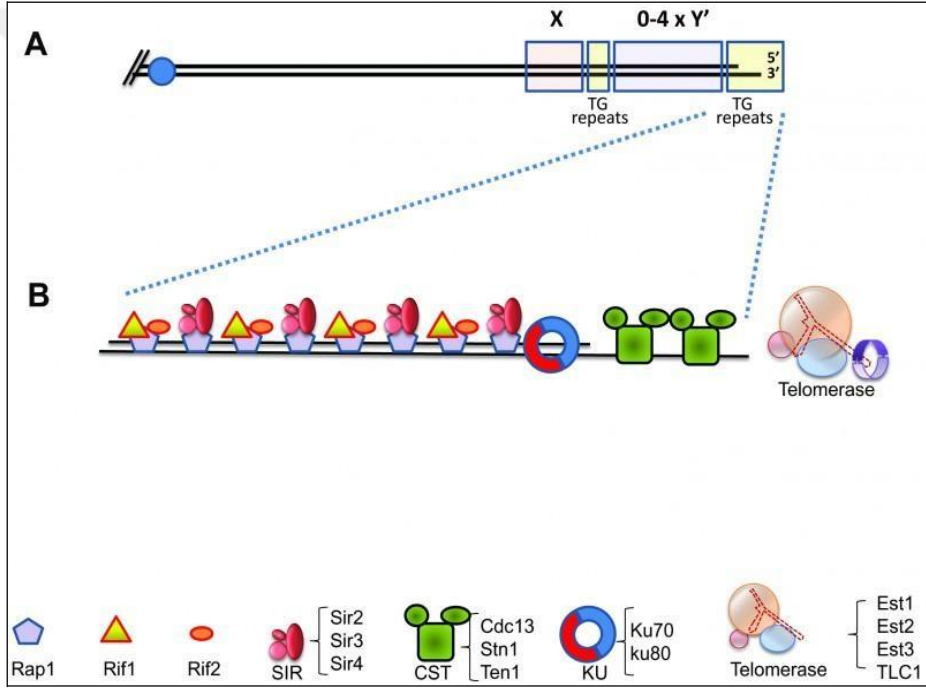
Şekil 2.2. *S. cerevisiae*'de telomer yapısı (Wellinger ve Zakian, 2012).

Telomerik DNA bölgeleri çıplak DNA bölgeleri olmayıp bu bölgelere bağlı çok sayıda protein bulunmaktadır. Bu proteinlerden özellikle Rap1p *S. cerevisiae*'de çok bol bulunan ve çok fonksiyonlu bir proteindir (Şekil 2.3). Bu proteinlerin de telomeraz enzimine ek olarak *S. cerevisiae*'de telomer yapılarının korunmasında ve replikasyonda görevleri vardır. Ayrıca bu proteinler telomer uçlarında rekombinasyonu da önler.

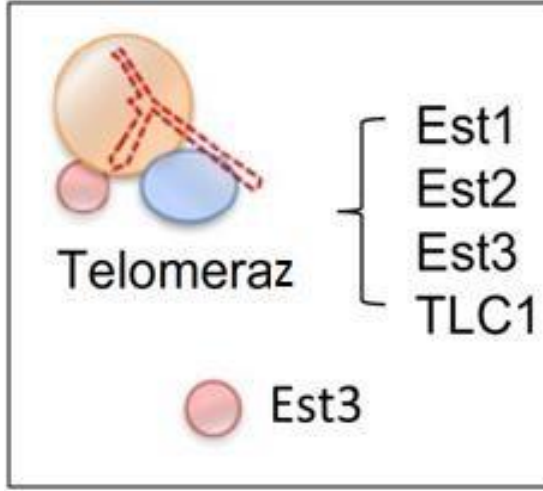
Telomer uzunlukları hücre veya organizmaların hayatı boyunca değişiklik gösterir. Çeşitli çevresel faktörlerin telomer uzunluklarına etki ettiği bazıların telomerlerde kısalma, bazı faktörlerin de telomerlerde uzamaya yol açtığı çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Bu konuda en kapsamlı çalışmalar da *S. cerevisiae*'nin model organizma olarak kullanıldığı çalışmalardır (Romano ve ark. 2013; Harari ve



Kupiec, 2014). Üreme ortamında sub-letal seviyede kafein, hidrojen peroksit, hidroksiüre gibi maddelerin bulunması telomerlerde önemli kısalmalara yol açar. Asetik asit, bakır sülfat, ve etanol"ün de konsantrasyonlarına bağlı olarak telomerlerde önemli sayıda uzamaya yol açtığı gösterilmiştir (Romano ve ark. 2013). Spor, fiziksel etkinlik, bazı vitaminler, omega 3,6 ve Vitamin-D'nin telomer uzunluğunu stimüle ettiği de gösterilmiştir (Wolkowitz, ve ark. 2008). Kalp-damar hastalığı, bazı metabolik bozukluklar, sigara tüketimi gibi faktörlerin de telomerlerde kısalmaya yol açtığı rapor edilmiştir (Freitas-Simoes, ve ark., 2016).



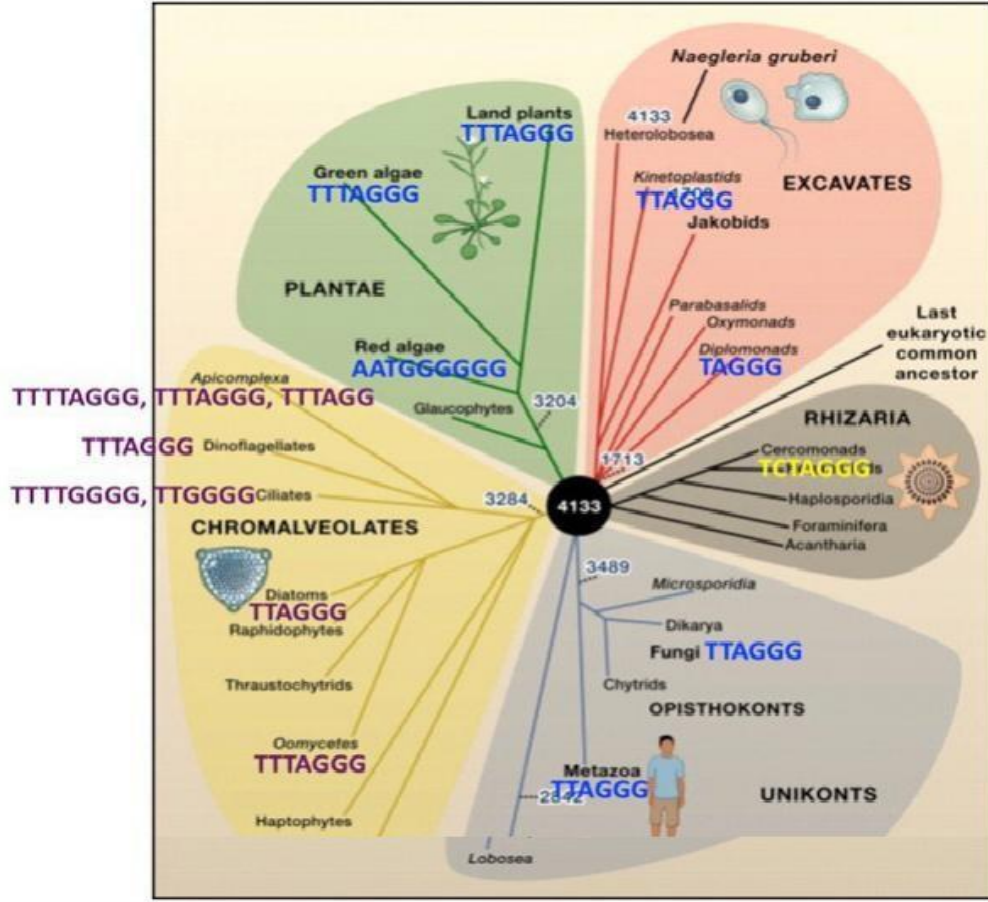
**Şekil 2.3.** *S. cerevisiae*'da telomere yapısında bulunan faktörler (Harari ve Kupiec, 2014).



**Şekil 2.4.** *S. cerevisiae*'da telomeraz enzim kompleksinin yapısı (Harari ve Kupiec 2014'ten değitirilerek alınmığtır)

*S. cerevisiae*'da telomeraz enzim kompleksi her birisi tek kopya olarak bulunan 3 farklı polipeptid ve kalıp RNA olarak kullanılan TLC1 RNA molekülünden meydana gelir (Şekil 2.4). Bu telomeraz kompleksinde Telomeraz enzim kompleksini kodlayan genlerin delesyonu hücre döngüsünde önemli yavağlama ve telomerlerde kısalmaya yol açtığı genetik çalışmalar ile gösterilmiğtir (Lundblad ve Szostak, 1989). Telomeraz kompleksindeki polipeptidlerin iğlevleri de belirlenmiğtir. Est2p telomeraz enziminin katalitik alt birimidir, TLC1 RNAsına bağlanıp revers transkriptaz benzeri aktivite ile telomer replikasyonunu sağlar (Lingner ve ark., 1997; Singer ve Gottschling, 1994). Est1p ve Est3p ise düzenleyici alt birimlerdir. Est1p'nin Est2p-TLC1 RNA kompleksinin oluşumu için gerekli olduğu, Est3p'nin de Est2p'nin N-ucuna bağlanıp katalitik aktiviteyi kontrol ettiği rapor edilmektedir (Sharanov ve ark., 2006; Yang ve ark., 2006). Telomerik DNA'daki tekrarlı dizilerde türlere göre farklılıklar görülebilir (Şekil 2.5).

*EST3* geninin kontrol mekanizmalarından birisi programlı ribozomal frameshift'tir. *EST3* mRNA'sından iki farklı polipeptid kodlanmaktadır. Telomer yapısında bulunan tam uzunluktaki Est3p +1 PRF ile transle edilir. Kısa peptidin iğlevi ise henüz aydınlatılmamığtır.



Şekil 2.5. Farklı türlerde telomer tekrarlarının sekans yapısı (Frydrychova ve ark. 2013).

#### 2.4. EST3 Geninin Yapısı ve EST3 proteinin Sentezi

*EST3* geni *S. cerevisiae*'da 9. kromozomda bulunur, sistematik adı YIL009C-A'dır. Telomer yapısına etki eden genlerin taranması sırasında klonlanmıştır.  $\Delta est3$  mutant fenotipi için SGD kayıtlarına çok sayıda özellik tanımlanmıştır. Bu mutant fenotiplerden bazıları; koloni yapılarında anormallik, telomerlerde kısalma, neomycin ve higromisin dirençliliğinde azalma, üreme hızında azalma olarak verilmektedir. Bu negatif fenotipik özelliklere rağmen  $\Delta est3$  mutasyonu letal değildir, mutant *S. cerevisiae* suşlarında üreme hızında önemli düşüş olmasına rağmen  $\Delta est3$  mutantı maya hücreleri için letal değildir (<http://www.yeastgenome.org/locus/S000006432/phenotype>).

Tam uzunluktaki fonksiyonel Est3p 181 amino asitten oluşur ve bu tam uzunluktaki Est3p'nin translasyonu +1 PRF gerektirir. Başlangıç kodonuna göre 0-çerçevde yapılan translasyonda ise kısa (93 amino asitlik) ve iğlevi henüz bilinmeyen peptid sentezi ile sonuçlanır. İğlevsel Est3p'nin translasyonu için ise frameshift bölgesinde belirli oranda +1 yönünde ribozomların +1 çerçeve yönünde kayma yapmaları gerekir. Bu kayma sonucu yeni bir translasyon çerçevesinde tam uzunlukta ve iğlevsel olan, telomeraz yapısında bulunan Est3p sentezlenir. *EST3* geni kodlama bölgesi ve proteininin amino asit dizisi Şekil 2,6'da verilmiştir.

**EST3 Geni Kodlama Bölgesi Sekansı (Genomik DNA).**

```
1 ATGCCGAAAG TAATTCTGGA GTCTATTCA AAGCCAACAG ACTCAGTTTT TCTACAACCA
61 TGGATAAAGG CATTAAATTGA AGACAACCTCG GAGCATGATC AATATCATCC CTCTGGCCAT
121 GTAATTCTTA GCTTGACCAA GCAGGACTTA GCGCTACCGC ATATGAGCCC GACAATTTTA
181 ACCAATCCGT GCCATTCGC CAAAATTACA AAATTTTATA ACGTTTGCGA CTACAAGGTA
241 TACGCATCGA TAAGAGATTC CTCACACCAA ATACCTTAGTT GAGTTTTCCC AAGAGTGTGT
301 ATCTAATTTT GAAAGGACTC ATAATTGCAG GATCACATCT GAGACGACCA ATTGCTTAAT
361 GATCATTGGC GATGCTGACT TAGTCTACGT AACAAATTCT CGAGCAATGT CTCACTTCAA
421 AATTTGCCTA AGCAACATTT CGTCCAAAGA AATAGTGCCC GTTCTCAATG TAAACCAGGC
481 CACGATATTT GATATTGATC AAGTCGGATC GTTAAGTACT TTCCATTG TATATAAATA
541 TTTATGA
```

**Est3 Protein :**

```
1 MPKVILESHS KPTDSVFLQP WIKALIEDNS EHDQYHPSGH VIPSLTKQDL ALPHMSPTIL
61 TNPCHFAKIT KFYNVCDYKV YASIRDSSHQ ILVEFSQECV SNFERTHNCR ITSETTNCLM
121 IIGDADLVYV TNSRAMSHFK ICLSNISKE IVPVLNVNQA TIFDIDQVGS LSTFPFVYKY
181 L
```

**Şekil 2.6:** *EST3* geni kodlama bölgesi ve amino asit dizisi. Frameshift bölgesi alt çizgili olarak gösterilmiştir. (Kaynak <http://www.yeastgenome.org>).

Tam uzunluktaki Est3p'nin translasyonu için translasyonun devamı sırasında belirli oranda/sayıda ribozomun mRNA okuma çerçevesinde +1 yönünde kayma yapması gerekir. Bu translasyonel kaymanın olduğu bölgeye frameshift-site (FS) denir ve EST3 mRNA'sı üzerinde CCU AGU U sekansının olduğu bölgede gerçekleşir (ğekil 2.6). FS'in meydana gelebilmesi için FS bölgesinin 3' tarafında yaklaşık 27-30 nükleotid uzunlukta bir uyarıcı dizinin (stimulatory sequence) de olması gerektiği gösterilmiştir (Talieferro ve Farabaugh, 2007). EST3 mRNA'sındaki bu uyarıcı sekansın moleküler işlevi de halen bilinmemektedir.

EST3 mRNA'sının normal translasyonunda ribozomun P-bölgesindeki peptidil tRNA (tRNA-Ser-GCU) CUU kodonu ile etkileşir ve A-bölgesi kodonuna da tRNA-Ser-UCG bağlanır. Normal kodon-antikodon etkileşimi sonucu bir sonraki kodon stop kodon olduğundan translasyon bu bölgede sona erer ve kısa, fonksiyonu bilinmeyen Est3p sentezlenir (Talieferro ve Farabaugh, 2007). Fakat translasyon yapan ribozomlarda belirli bir sıklıkta/oranda EST3 mRNA'sının bu bölgesinde (FS-Site) yavaşlama olur. Translasyondaki bu yavaşlama ile FS bölgesinde +1 yönünde 1 nükleotid kayması ile meydana gelir. Normal translasyon sırasında CUU kodonu ile etkileşen tRNA-Ser-GCU +1 kayma sonucu UUA kodonu ile etkileşir (ğekil 2.6). Bunun sonucu olarak da okuma çerçevesinde ribozomda A- bölgesi de normalde bulunan kodon AGU kodonu iken 1 nükleotid kayarak GUU kodonu olarak yer alır. GUU kodonu da tRNA val-CAI tarafından kodlanır ve translasyon kodlama bölgesi sonuna kadar devam eder (Talieferro ve Farabaugh, 2007).

Programlı ribozomal frameshift'in her zaman sabit bir hızda yapıldığı var sayılıyordu. Fakat laboratuvarımızda daha önce Ty virüslerinde PRF ile ilgili yapılan çalışmalarda, Ty virüslerinde PRF oranının glukoz sinyali ve üreme koşullarına göre artış veya azalma gösterebildiği rapor edilmiştir (Türkel ve ark. 2011).

## 2.5. Azot Sinyal İletim Yolu ve Önemi

*S. cerevisiae*'de azot metabolizması üreme ve gen ifadesinin kontrolü için en az glukoz kullanımı ve glukoz sinyali kadar önemlidir. *S. cerevisiae* azot kaynağı olarak çok farklı azotlu bileşikler kullanabilir. Tercih edilen azot kaynakları amonyum ve glutamindir. Üre, allantoin ve prolin gibi azotlu bileşiklerin kullanımı ise tercih edilmez (Magasanik ve Kaiser, 2002). Üreme ortamında amonyum veya glutamin bulunduğunda Nitrogen Catabolite Repression (NCR) olarak adlandırılan sinyal iletim sistemi alternatif azot kaynaklarının hücreye girişi ve kullanımı ile ilgili genleri baskılar. Amonyum veya glutamin yerine üreme ortamında üre, allantoin ve zayıf amino asitler bulunduğunda ise bu azotlu bileşiklerin kullanımı ile ilgili genler aktive edilir. Azot metabolizması ile ilgili genlerin aktivasyonu veya baskılanmasını gerçekleştiren transkripsiyon faktörleri *S. cerevisiae*'de topluca GATAA faktörleri olarak adlandırılırlar. Bu faktörler ilgili genlerin promotör bölgelerinde GATAA dizisine tekli, homodimer veya heterodimer olarak bağlanarak azot metabolizması genlerini aktive eder veya baskırlar. Aktivator olarak işlevi olan bağılıca GATA faktörü Gln3p'dir. Amonyumlu ortamda Gln3p-Ure2p ile kompleks oluşturmuş şekilde ve fosfo protein olarak sitoplazmada inaktif kompleks olarak bulunur. Azot kısıtlaması olduğunda, Gln3p defosforile olarak Ure2p'den ayrılıp sitoplazmadan nükleusa geçerek Gat1p ile heterodimer oluşturup hedef genlerin aktivasyonunu sağlar (Magasanik ve Kaiser, 2002).

Azot sinyali iletiminde asıl sensörün sitoplazmik protein kinaz olan TOR kompleksi olduğu rapor edilmiştir. TOR kompleksi *S. cerevisiae*'de TOR1 ve TOR2 olarak iki ayrı kompleks olarak bulunur. Metabolizma kontrolü için önemli olan TOR1 kompleksidir (Rohde ve ark., 2008). TOR kinaz kompleksi *S. cerevisiae*'de genel besin sensörü gibi çalışarak üreme ortamı koşulları optimum olduğunda bağıta transkripsiyon ve translasyon olmak üzere genel metabolizma ile ilgili çok sayıda genin aktivasyonunu sağlar, otofajiyi de engeller. Ayrıca, üreme ortamı koşulları optimum olduğunda ribozom biyogenezini ve dolayısıyla translasyonu da aktive eder (Rohde ve ark., 2008; Reiling ve Sabatini, 2006). TOR kinaz optimum şartlarda aktif olmasına rağmen üreme ortamında azot kısıtlaması olduğu durumda, veya üreme ortamına Rapamycin veya

kafein ilave edildiğinde inaktive olur ve TOR'un kontrol ettiği genlerin iğleyiğinde önemli değiğiklikler olur, translasyonda yavağlama görülür. TOR1 kompleksinin translasyon bağlama faktörü eIF2 aktivitesini kontrol ederek translasyonu da kontrol ettiği tayin edilmiğtir (De Virgilio ve Loewith, 2006). TOR kompleksinin Snf1 aracılığı ile *S. cerevisiae*'da pseudohifsel üremeyi de kontrol ettiği öne sürölmektedir (Orlova ve ark., 2006)



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Araştırmada Kullanılan *S. cerevisiae* Suçları

Bu tez araştırmasında standart yaban tip *S. cerevisiae* suçu olarak BY4741 suçu kullanıldı. Bu *S. cerevisiae* suçu bazı amino asitler ve urasil için okzotrofik olup bilinen genotipi: MATa, his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0 olarak verilmektedir. Bu maya suçu Frankfurt Üniversitesi Mikrobiyoloji Enstitüsü'ndeki EUROSCARF koleksiyonundan temin edildi (Brachmann ve ark, 1998). Araştırmamızda özellikle azot sinyal iletim yolu ve pseudohifsel üreme çalışmaları için amino asitler için prototrof olan *S. cerevisiae* suçuna ihtiyaç duyulduğundan bu araştırmalar için de *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b suçu kullanıldı. *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b suçunun içerdığı *ras2* mutasyonu dolayısıyla diğer *S. cerevisiae* suçlarına göre daha kolay pseudohif oluşturduğu bilinmekte olup bu suğun bilinen genotipi ise MATa, ura3-52, olarak verilmektedir (Zurita-Martinez ve Cardenas, 2005). Bu *S. cerevisiae* suçu ise Prof.Dr. Maria E. Cardenas'dan (Duke Üniversitesi, Moleküler Hücre Biyolojisi Programı, Durham. North Caroline, ABD) temin edildi.

#### 3.2. *S. cerevisiae* Suğlarının Üretilmesi

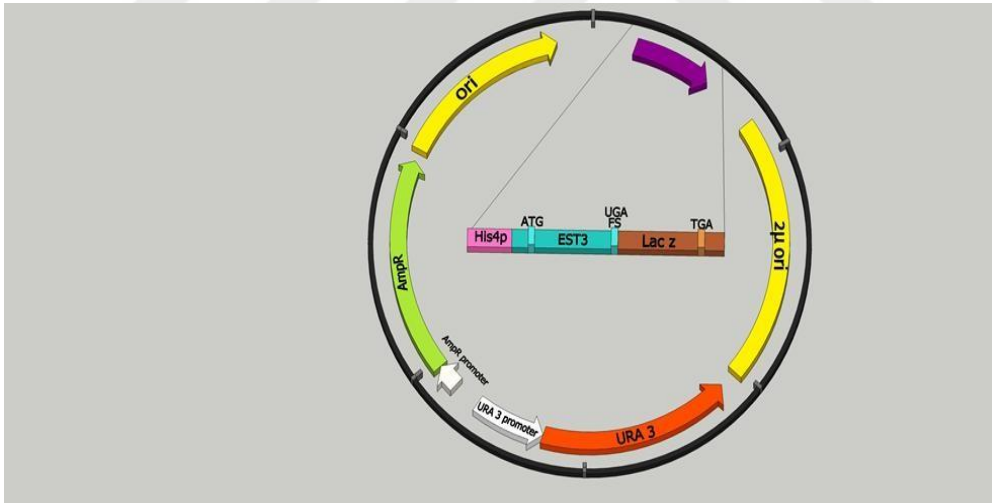
Araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suğlarının üretilmesinde kullanılan besiyerlerinin bileğenleri ve hazırlanması tezin ekler bölümünde verildi. *S. cerevisiae* suçları kısa süre +4 C'de depo etmek ve transformasyon için ön kültür hazırlamak için zengin ortam olarak kullanılan YPD üreme ortamı içeren petrilerde üretildi (Ek 1) (Rose ve ark. 1990). Maya suçları deneyler süresince petrilerde 4°C'de muhafaza edildi. Ayrıca, *S. cerevisiae* suğlarını uzun süreli olarak depo etmek için taze YPD besi yerlerinde üretilen *S. cerevisiae* suğlarından steril kürdan ile alınan maya örnekleri steril 1 ml %20 gliserolda süspanse edildi ve 70°C'de saklandı.

#### 3.3. EST3 Ekspresyon Vektörlerinin Yapısı

Bu tez araştırmasında *EST3* geninde frame shift oranını tayin etmek için kullanılan ekspresyon vektörleri olan EST3-lacZ Frame Shift (EST3-FS) ve EST3-lacZ



FrameFusion (EST3-FF) yapılarını içeren plazmitler daha önceki araştırmalarda hazırlanmıştır (Taliaferro ve Farabaugh 2007). EST3-FS vektöründe EST3 geninin frame shift bölgesi lacZ genine normal şekilde bağlanmıştır. Bu vektörde EST3-lacZ hibrit mRNA'sının translasyonu için +1 frame shift olması gerekir. EST3-FF vektöründe ise frame shift bölgesinden 1 nükleotid çıkarıldığı için EST3-lacZ mRNA'sının translasyonu frame shift'e uğramadan direkt olarak yapılır. Bu ekspresyon vektörleri YE<sub>p</sub> (Yeast Episomal plazmit) tipi maya vektörü olup shuttle vektör özelliğini de taşımaktadırlar. Bu nedenle hem *E. coli* ve hem de *S. cerevisiae*'da replikasyon için orijin bölgeleri ve seleksiyon için de markör gen içerirler. *E. coli*'de seleksiyon için ampisiline direnç sağlayan β-laktamaz geni, *S. cerevisiae*'da seleksiyon için ise *URA3* geni yapılarında bulunmaktadır (Taliaferro ve Farabaugh 2007). EST3-FS ve EST3-FF gen füzyonlarını içeren ekspresyon vektörlerinin yapısı şekil 3.1'de verildi. YE<sub>p</sub> vektörlerinin seçici üreme ortamında üretilen *S. cerevisiae* transformantlarında kopya sayılarının değişmediği ve maya hücrelerinde stabil olarak kaldıkları gösterilmiştir (Liao ve ark. 1987).



Şekil 3. 1. EST3 ekspresyon vektörlerinin genel yapısı

### 3.4. *S. cerevisiae* Suçlarına Transformasyon

EST3 FS veya EST3-FF ekspresyon kasetlerini içeren plazmitler *S. cerevisiae* BY4741 ve *S. cerevisiae* S1278b suçuna daha önce açıklandığı şekilde lityum asetat-polietilen glikol yöntemi ile transform edildi (Rose ve ark. 1990). Bu yöntem göre transformasyon yapabilmek için maya suçları önce 5 ml'lik YPD sıvı besiyerinde standart şartlarda bir gece üretildi. Ertesi sabah bu ön kültürler kullanılarak bu kez 25 ml'lik taze YPD besiyerlerine bağılangıç OD<sub>600</sub> değerleri 0.2 olacak şekilde ekim yapıldı. Bu maya kültürleri standart şartlarda (30 C, 140 devir/dk dönüş) logaritmik aşamaya kadar (OD<sub>600</sub>: 1.5-2.0) üretildi.

Logaritmik aşamaya kadar üretilen maya kültürleri transformasyon için kompetent hale getirebilmek için daha önce açıklanan yöntem değişikliği yapılmadan aşağıda kısaca açıklandığı şekilde uygulandı (Rose ve ark. 1990).

Logaritmik aşamadaki maya kültürleri masa üstü santrifüjde 3000 g'de 5 dakika çöktürüldü. Sıvı faz atıldı. Maya çökeltisi 25 ml'lik steril saf suda yıkandı ve maya hücreleri tekrar çöktürüldü. Sıvı faz atıldı ve çöktürülen maya hücreleri 1 ml 0.1M lityum asetat'da süspansiyon edildi ve tekrar mikrosantrifüjde 12500 rpm'de 30 sn çöktürüldü. Sıvı faz atıldı ve çöktürülen maya hücreleri bu kez 450 µl 0.1 M lityum asetat'da süspansiyon edildi. Bu maya süspansiyonlarından taze mikrofüj tüplerine 50 µl alınarak maya hücreleri tekrar mikrosantrifüjde 12500 rpm'de 30 sn çöktürüldü. Sıvı faz pipet ile alındı. Maya çökeltisi üzerine aşağıda verilen sırada ve miktarlarda ilgili çözümler ve plazmit DNA'ları eklenerek transformasyon karışımları hazırlandı.

240 µl %50 Polietilen glikol (Mw: 3500)  
36 µl 1 M Lityum asetat  
6 µl denature edilmiş herring sperm DNA'sı (toplam 5 µg olacak şekilde)  
4-5 µg plazmit DNA'sı  
steril saf su (toplam hacim 350 µl olacak şekilde)

Bu şekilde hazırlanan transformasyon karışımları 30 C'de etüv de 30 dakika bekletildi. Daha sonra aynı karışımlar etüvden alınarak 42 C'de su banyosunda 30 dakika daha inkübe edildi. Bu bekleme süreleri sonunda transformasyon karışımları mikrosantrifüjde

12500 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Sıvı faz atıldı. Çökelti 500 µl steril saf su ile süspansiyon edildi. Bu şekilde hazırlanan transformant mayaya hücrelerinden koloni elde edebilmek için 100 µl alınarak seçici üreme ortamı olan ve urasil içermeyen Sc-Ura+%2 glukoz içeren petrilere yayma ekimi yapıldı. Maya ekimi yapılan petrilere 30 C'de etüvde koloniler belirgin oluncaya kadar inkübe edildi. Bu süre genellikle 3-4 gündür. Kolonilerin elde edilmesinden sonra sıvı kültürlere ekim yapabilmek için transformant mayaya kolonilerinden iyi şekilde izole olanlar seçilerek taze seçici üreme petrilere küçük pasajlar (6-8 pasaj/petri) yapıldı. Transformant pasajların petride üremesi için de petrilere 30 C'de 2-3 gün inkübe edildi. Maya transformantları ve pasaj petrilere deneyler süresince +4 C'de buzdolabında saklandı.

### **3.5. *S. cerevisiae* Transformantlarının Üretimi**

Üreme aşamalarının EST3'de frame shift oranına etkilerini tayin edebilmek için *S. cerevisiae* BY4741 ve *S. cerevisiae* Σ1278b suşlarının EST3-FS ve EST3-FF transformantları 5 ml'lik sıvı SC-Ura+%2 glukoz ortamında çalkalamalı inkübatörde 140 devir /dakika hızda ve 30 C'de yaklaşık 18 saat üretilerek ön kültürler elde edildi. Bu ön kültürlerden taze 5 ml'lik Sc-Ura+%2 glukoz ortamına bağılangıç hücre yoğunluğu OD<sub>600</sub>:0.2 olacak şekilde ekim yapıldı. Bu kültürler standart şartlarda logaritmik aşamaya (OD<sub>600</sub>:1.5-2.0) veya durağan aşamaya (OD<sub>600</sub>:9.0-10.0) kadar üretildi. Üreme aşaması sonunda maya hücreleri masa üstü santrifüjde 3000 g'de 5 dakika çöktürüldü. Sıvı faz atıldı ve çöktürülen hücreler 1 ml steril saf suda süspansiyon edilerek mikrofüj tüplerine aktarıldı. Maya hücreleri mikrofüj tüplerinde tekrar 12500 rpm'de 1 dakika çöktürüldü. Çöktürülen maya hücreleri 200 µl lizis tampon çözeltisinde (break buffer) süspansiyon edildi. EST3-FS veya EST3-FF ekspresyon vektörlerini içeren bu maya transformantları gen füzyonlarından yapılan ekspresyon miktarlarını tayin edebilmek için aşağıda açıklandığı şekilde β-galaktosidaz aktivitelerinin tayininde kullanıldı. Lizis tampon çözeltisinde süspansiyon edilen mayalar kısa süreli olarak -20 C'de daha uzun süreli olarak da -80 C'de derin dondurucuda saklanabilmektedir.

EST3'de frame shift oranına farklı azot kaynaklarının etkilerini tayin edebilmek için EST3-FS ve EST3-FF vektörlerinin *S. cerevisiae* Σ1278b transformantlarından yukarıda

açıklandığı Çekilde ön kültürler elde edildi. Bu ön kültürler kullanılarak amonyum içermeyen yeast nitrogen base (YNB) üreme ortamına son konsantrasyonları bölüm 4.2'de açıklandığı Çekilde amonyum (%0.5) , glutamin (%0.2), prolin (%0.2), üre (%0.2) veya lösün (%0.2) ilave edildi. Bu Çekilde maya transformantları farklı türlerde azot kaynağı içeren minimal ortamda logaritmik aÇamaya kadar üretilerek yukarıda açıklandığı Çekilde  $\beta$ -galaktozidaz aktivitelerinin ölçümü için hazırlandı.

Pseudohifsel üremenin *EST3*'de frame shift oranına etkilerini incelemek için *EST3-FS* ve *EST3-FF* vektörlerinin *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b transformantlarından yukarıda açıklandığı Çekilde ön kültürler elde edildi. Bu ön kültürler kullanılarak taze YNB+%2 glukoz ortamına ekim yapıldı ve maya transformantları standart Çartlarda logaritmik aÇamaya kadar üretildi. Bu aÇamada maya transformantları 3000 g'de 5 dakika çöktürüldü ve steril 5 ml saf suda süspanse edilerek tekrar çöktürüldü. Maya transformantları bu kez düşük miktarda azot içeren 5 ml'lik SLAD (Synthetic Low ammonium dextrose) üreme ortamında süspanse edildi ve standart Çartlarda 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda maya hücrelerinin pseudohif oluşmalarını tayin edebilmek için üreme ortamından örnek alınarak ışık mikroskopunda 10x100 büyütme ile immersiyon objektifi kullanılıp fotoğraflandı. Pseudohif oluşturduğu kesinleşen kültürler çöktürülerek transformantların  $\beta$ -galaktozidaz aktivitelerini tayin edebilmek için yukarıda açıklandığı Çekilde hazırlandı.

Kafein'in *EST3*'de frame shift'e etkisini belirlemek için *EST3-FS* ve *EST3-FF* ekspresyon vektörlerinin *S. cerevisiae* BY4741 ve *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b transformantlarından erken logaritmik aÇama kültürleri Sc-Ura+%2 glukoz ortamında ve yukarıda açıklandığı Çekilde hazırlandı. Erken logaritmik aÇamada (yaklaşık  $OD_{600}$ : 0.7-0.8) üreme ortamlarına son konsantrasyonu 0.8 mM olacak Çekilde kafein ilave edildi ve maya kültürleri 6 saat standart Çartlarda üretildi. İnkübasyon periodu sonunda maya hücreleri çöktürülerek yukarıda açıklandığı Çekilde  $\beta$ -galaktozidaz ölçümleri için hazırlandı.

Etanol stresinin *EST3*'de frame shift'e etkisini tayin edebilmek için *S. cerevisiae* BY4741 transformantlarından yukarıda açıklandığı Çekilde Sc-Ura+%2 glukoz

ortamında ön kültürler ve daha sonrada logaritmik aÇama kültürleri elde edildi. Logaritmik aÇamadaki maya kültürlerine son konsantrasyonu %8 olacak Çekilde etanol ilave edildi ve transformantlar standart üreme koÇullarında 6 saat daha üretildi. Üreme periyodu sonunda maya hücreleri çöktürülerek  $\beta$ -galaktozida aktivitesinin tayini için hazırlandı. Karbon kaynağı olarak bulunduğunda etanolün etkisini tayin etmek için ise *S. cerevisiae* BY4741 transformantları Sc-Ura+%2 etanol ortamında önce durağan aÇamaya kadar üretilerek ön kültürler elde edildi. Daha sonra bu ön kültürler kullanılarak tekrar Sc-Ura+%2 etanol ortamına ekim yapılarak logaritmik aÇamaya kadar üretildi. Logaritmik faz kültürleri çöktürülerek yukarıda açıklandığı Çekilde  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesinin tayini için hazırlandı.

### **3.6. $\beta$ -Galaktozidaz Aktivitesinin Tayini**

Farklı üreme ortamlarında üretilip çöktürülen ve 200  $\mu$ l lizis tampon çözeltisinde süspanse edilen maya transformantlarına permeabilizasyon için stok çözeltilerden 20  $\mu$ l saf kloroform ve %0.1lik 20  $\mu$ l SDS ilave edilip 15-20 sn en üst hızda vortek karıştırıldı ve hücre lizatları elde edildi. Hücre lizatlarındaki  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesini tayin etmek için 1x10 cmlik deney tüplerine 20  $\mu$ l hücre lizatı ve 980  $\mu$ l Z-buffer ( $\beta$ -gal tampon çözeltisi) ilave edildi ve deney tüpleri 30 Cde su banyosuna bırakıldı. 2 dklik ön inbüasyondan sonra her bir deney tüpüne 200  $\mu$ l ONPG (reaksiyonun substratı) ilave edilip baÇlangıç zamanı kronometrede kayıt edildi. Reaksiyon baÇlangıçtaki renksiz durumdan açık sarı renk meydana gelinceye kadar beklendi. Açık sarı renk görüldüğünde reaksiyon 500  $\mu$ l 1 M sodyum karbonat ilave edilerek durduruldu ve geçen zaman kayıt edildi. Reaksiyon tüplerinde hücre lizatlarından gelen parçalı materyali çöktürmek için reaksiyon tüpleri masa üstü santrifüjde 4 dk 1600 rpmde santrifüj edildi. Reaksiyon çözeltileri 2 mLlik spektrofotometre küvetlerine aktarılıp absorbansları 420 nm dalga boyunda ölçülerek kayıt edildi. (Guarente, 1983).

Maya transformantlarındaki  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesini normalize edebilmek için yukarıda açıklandığı Çekilde hazırlanan maya hücre lizatlarının toplam protein konsantrasyonları da Lowry metodu ile tayin edildi (Lowry ve ark. 1951). Bunun için 1x10 cmlik deney tüplerine 180  $\mu$ llik steril steril saf su, 20  $\mu$ l hücre lizatı eklendi. Bu

lizat karışımına taze hazırlanmış Lowry-C çözeltisinden 1 ml ilave edildi, en üst hızda vorteks ile 10-15 sn karıştırılıp oda sıcaklığında 10 dk beklendi. Daha sonra bu karışım 1N folin fenol (Sigma F 9252) çözeltisinden 100 µl eklenerek vorteks edildi (Ek 1). Karışım oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. Denet tüpleri hücre lizatlarından gelen parçalı materyalin çöktürülmesi için masa üstü santrifüjde 1600 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Berrak hale getirilen protein çözeltileri 2 ml'lik spektrofotometre küvetlerine aktarıldı ve çözelti absorbansları 750 nm'de ölçülerek kayıtedildi.

EST3-FF ve EST3-FS gen füzyonlarından yapılan ekspresyon seviyeleri ( $\beta$ -galaktozidaz aktiviteleri) Ek 2'de verilen formüle göre hesaplandı (Ausubel ve ark. 1987). Ekspresyon seviyeleri hücre lizatlarındaki 1 mg protein tarafından 1 dakikada hidroliz edilen nmol ONPG (nmol ONPG/dk/ mg protein) olarak elde edildi. EST3'de yapılan çerçeve kayması oranlarını hesap edebilmek için EST3-FS gen füzyonlarından ekspres edilen enzim aktivitesi değerleri EST3-FF'den ekspres edilen aktiviteye bölünerek elde edildi. Bütün enzim deneyleri 3'erli olarak yapıldı ve en az bir kez tekrarlandı. Bu nedenle sonuçlar bölümünde verilen % FS oranları ortalama 9 farklı enzim deneyinin ortalamasıdır. Sonuçların çoğunda standart sapmanın % 10'nun altında olduğu tayin edildi.

## 4- BULGULAR

### 4.1. Üreme Aşamalarının EST3'de Frame Shift'e Etkisi

Tam uzunluktaki Est3p'nin sentezi için translasyon sırasında +1 translasyonel çerçeve kayması olması gerektiği daha önce rapor edilmiştir (Morris ve Lundblad, 1997). Araştırmamızın başlangıç aşamasında Est3p'nin sentezi için gerekli olan frame shift'in gerçekleşmesinde maya hücrelerinin üreme aşamalarının etkisinin olup olmadığı incelendi. Bunun için seçilen iki farklı *S. cerevisiae* laboratuvar suşu olan BY4741 ve Sigma 1278b suşlarında hem logaritmik aşamada ve hem de 24-26 saat üreme sonucu elde edilen durağan faz aşamasındaki transformantlarda % frame shift (bundan sonra % FS olarak verilecektir) oranları tayin edildi. Logaritmik aşamadaki hücre yoğunlukları OD<sub>600</sub>: 1.5-1.7±0.4 olarak ölçüldü. Durağan aşamadaki hücre yoğunlukları ise OD<sub>600</sub>: 9.0-10.0 ±0.4 olarak tayin edildi.

Standart Şartlarda üretilen logaritmik aşamadaki *S. cerevisiae* BY4741 maya kültürlerinde EST3'de % FS yaklaşık olarak %13 olarak belirlendi (çizelge 4.1). *S. cerevisiae* Σ1278b suşunda ise EST3'de % FS oranında önemli bir artış olduğu ve bu maya suşunda logaritmik aşamada frameshift oranının yaklaşık %17 olarak gerçekleştiği görüldü (çizelge 4.1). Frameshift oranının *S. cerevisiae* suşlarına göre farklılık gösterebildiği daha önce rapor edilmiştir. Durağan faz aşamasındaki *S. cerevisiae* transformantlarında ise önemli düşüş olduğu tayin edildi. Durağan fazdaki BY4741 maya suşunda frameshift oranı % 7.25 olarak, sigma 1278b suşunda ise % 7.56 olarak ölçüldü (çizelge 4.2). Frame shift oranında durağan aşamada görülen azalma veya düşüş BY4741 suşu için % 44.74, sigma 1278b suşu için ise % 55.39 olarak hesap edildi.

**Çizelge 4.1.** Logaritmik aÇamadaki *S. cerevisiae* suÇlarında EST3“de frame shift oranları

Maya SuÇu	Ekspresyon vektörü	Ekspresyon seviyesi*	% FS
BY4741	pDT265 (FS)	111	<b>13.12</b>
	pDT261 (FF)	846	
Σ1278b	pDT265	88	<b>16.95</b>
	pDT261	519	

\*Ekspresyon seviyesi nmol ONPG/dakika/mg protein olarak verilmiştir. %FS frame shift oranını göstermektedir. FS: Frameshift vektör, FF: Frame fusion vektör

**Çizelge 4.2.** Durağan aÇamadaki *S. cerevisiae* suÇlarında EST3“de frame shift oranları

Maya SuÇu	Ekspresyon vektörü	Ekspresyon seviyesi*	% FS
BY4741	pDT265	83	<b>7.25</b>
	pDT261	1144	
Σ1278b	pDT265	33	<b>7.56</b>
	pDT261	436	

\*Ekspresyon seviyesi nmol ONPG/dakika/mg protein olarak verilmiştir.



## 4.2. Azot Sinyal İletim Yolağının EST3’de Frame Shift’e Etkisi

Üreme ortamındaki azot kaynağı *S. cerevisiae*’da üreme hızına ve birçok metabolik olaya direkt olarak etki eden önemli bir bileşendir. Karbonhidrat kaynağında olduğu gibi, azot kaynağı olarak da *S. cerevisiae* tarafından öncelikli olarak kullanılan veya alternatif olarak kullanılan azotlu bileşikler vardır. Azot kaynağının kullanımı ile ilgili metabolik yolakda (azot sinyal iletim yolağı) önemli bir faktör de TOR (Target of Rapamycin) kinazdır. Amonyum veya glutamin gibi tercih edilen azot kaynakları bulunduğunda TOR1 kinaz diğer üreme koşulları da uygun ise hücrede bir çok metabolik yolağı aktive edebilir. Buna bağlı olarak da hücre döngüsü, DNA replikasyonu, translasyon gibi olaylar da bölünme hızına göre kontrol edilir. Bundan dolayı bu tez araştırmasında EST3’de programlı ribozomal frameshift oranına azot kaynaklarının ve dolayısıyla da TOR1 kinazın etkisinin olup olmadığı incelendi. TOR kinaz aktivitesini aktive edebilmek için üreme ortamına azot kaynağı olarak amonyum sülfat veya glutamin ilave edilerek logaritmik aşamadaki *S. cerevisiae* hücrelerinde frameshift oranları tayin edildi. Normal üreme koşulları olarak kabul edilen bu şartlarda gerçekleşen frameshift oranı ile tercih edilmeyen azot kaynağı olan prolin, lösin, üre gibi azotlu bileşiklerin bulunduğu üreme ortamında gerçekleşen frame shift oranları da tayin edilerek karşılaştırıldı.

Üreme ortamında azot kaynağı olarak amonyum sülfat bulunduğunda EST3’de frame shift oranı *S. cerevisiae* BY4741suşunda %14.78 olarak tayin edildi. EST3’de frameshift oranı glutamin içeren üreme ortamında ise %12.67 olarak belirlendi (çizelge 4.3). TOR1 kinazın aktif olmadığı, azot kaynağı olarak prolin bulunan besiyerinde üretilen *S. cerevisiae* suşunda ise EST3’de frameshift oranının %17.31 olarak gerçekleştiği bulundu. (çizelge 4.4). Prolinden farklı olarak azot kaynağı olarak üre içeren ortamda üretilen *S. cerevisiae* kültürlerinde frameshift oranı %11.82, lösin içeren ortamda üretilen kültürde ise frameshift oranının %14.44 olduğu bulundu.

**Çizelge 4.3.** Normal azot kaynaklarının EST3''de frame shift''e etkisi

Üreme ortamı	Ekspresyon vektörü	Ekspresyon seviyesi*	% FS
YNB+%2 dekstroz *(%0.5 NH <sub>4</sub> )	pDT265	218	<b>14.78</b>
	pDT261	1479	
YNB+%2 dekstroz *(%0.2 Gln)	pDT265	205	<b>12.67</b>
	pDT261	1617	

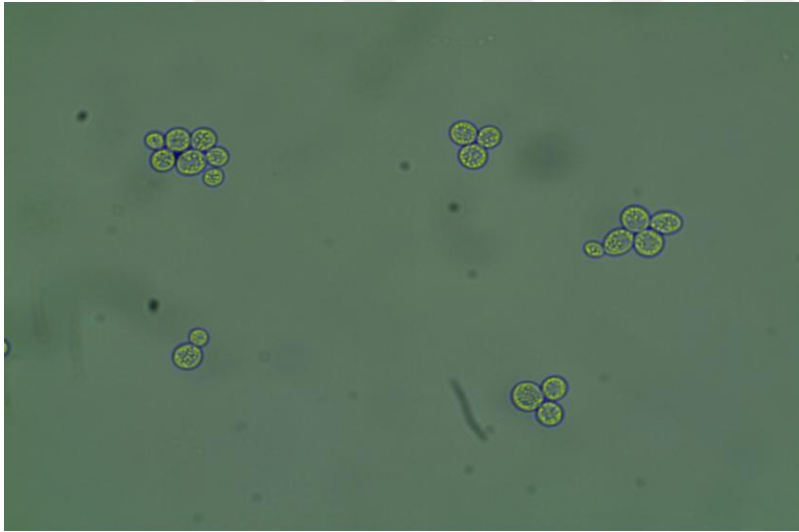
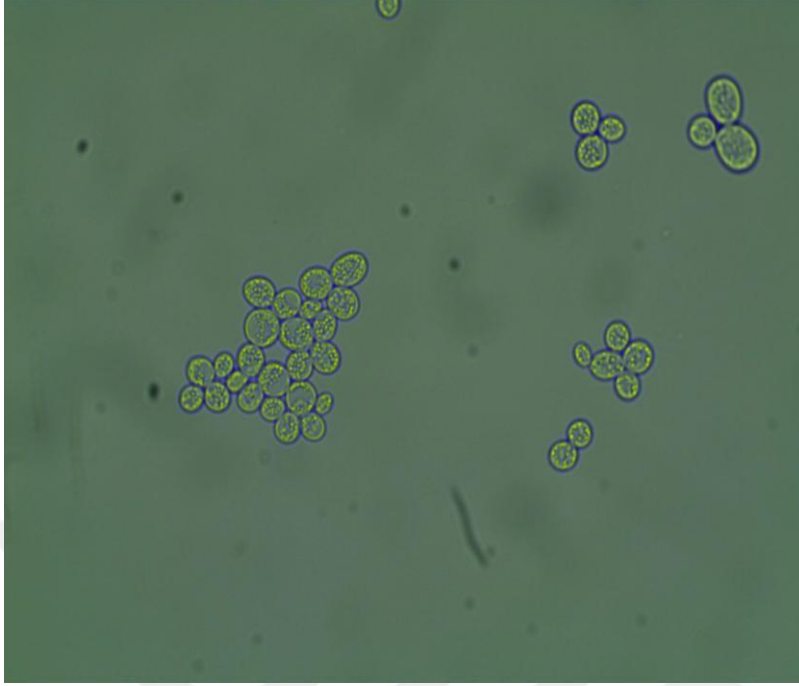
\*NH<sub>4</sub>: NH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, Gln: Glutamin''i göstermektedir.

**Çizelge 4.4.** Alternative azot kaynaklarının EST3''de frame shift''e etkisi

Üreme ortamı	Ekspresyon vektörü	Ekspresyon seviyesi*	% FS
YNB+%2 dekstroz *(%0.2 Prolin)	pDT265	234	<b>17.31</b>
	pDT261	1350	
YNB+%2 dekstroz *(%0.2 Lösin)	pDT265	393	<b>14.44</b>
	pDT261	2723	
YNB+%2 dekstroz *(%0.2 Üre)	pDT265	250	<b>11.82</b>
	pDT261	2115	

### 4.3. Pseudohifsel Üremenin EST3'de Frame Shift'e Etkisi

*S. cerevisiae* hücreleri minimal üreme ortamında azot kaynağı kısıtlı olduğu zaman farklı bir üreme şekli olan pseudohifsel üreme aşamasına geçmektedir. Bu aşamadaki maya hücrelerinde bölünen hücreler ana hücreden ayrılmadan kalırlar. mantarlarda görülen hifsel üremeden farklı olarak pseudohifsel üreme gösteren hücreler arasında hücre duvarı vardır, hücresel sinsizyum görülmez (Zaragoza ve Gancedo, 2000). Pseudohifsel üreme özellikle  $\Sigma 1278b$  suşunda kolaylıkla uyarılmaktadır. Bu nedenle pseudohifsel üremenin EST3'de frameshifte olan etkisi sadece bu maya suşunda tayin edilmiştir. Normal üreme ortamından SLAD ortamına aktarılan maya transformantları pseudohifsel üremenin gerçekleşmesi için bu ortamda 24 saat bekletildi. Transformantların pseudohif oluşturduğu mikroskopik olarak tayin edildi ve 10x100 objektifi ile immersiyon uygulanarak fotoğraflandı (şekil 4.1). Pseudohif meydana getirdiği görülen maya kültürleri çöktürülerek frame shift ve frame fusion vektörlerinden yapılan transkript miktarları  $\beta$ -Galaktozidaz aktiviteleri ölçülerek tayin edildi ve % FS oranları hesaplandı (Çizelge 4.5).



**ğekil 4.1:** *S. cerevisiae* sigma 1278b suğunda pseudohifsel üreme.

**Çizelge 4.5.** Pseudohifsel üremenin EST3’de frame shift,,e etkisi

Maya SuÇu	Ekspresyon vektörü	Ekspresyon seviyesi*	% FS
Σ1278b	pDT265	21	4.39
	pDT261	478	

Pseudohifsel üremenin EST3’de frame shift oranına çok önemli derecede etki ettiği ve % FS oranında en az 4-kat azalmaya neden olduğu görülmektedir. Logaritmik aşamada *S. cerevisiae* Σ1278b suÇunda % 17 olan frame shift oranının aynı suÇta pseudohifsel üreme uygulandığında % 4.39’a indiği görülmektedir (çizelge 4.5). Pseudohifsel üremenin özellikle frameshift ekspresyon vektöründen yapılan transkript seviyesinde önemli azalmaya yol açtığı da görülmektedir. Normal Çartlardaki üreme ortamında frame shift vektöründen yapılan transkript 88 ünite iken aynı vektörden pseudohifsel üreme Çartlarında 21 ünite kadar ekspresyon yapıldığı görülmektedir (çizelge 4.5).

#### 4.4. Etanol ve Kafein Stresinin EST3’de Frame Shift’e Etkisi

*S. cerevisiae*’da telomeraz aktivitesine çeÇitli fizyolojik stres faktörlerinin etkileri ayrıntılı olarak çalıÇılmıştır. Kafein, hidrojen peroksit ve yüksek sıcaklığa maruz kalmanın *S. cerevisiae*’da telomer uzunluğunda kısalmaya yol açtığı rapor edilmiştir (Romano ve ark., 2013). Etanol, metanol ve asetik asit ile inkübasyonun ise bu maddelerin konsantrasyonlarına da bağılı olarak *S. cerevisiae* telomerlerinde uzamaya yol açtığı aynı çalıÇmada gösterilmiştir (Romano ve ark., 2013). Kafein aynı zamanda TOR sinyal iletim yolağına da baskılayan bir madde olduğu için bu araÇtırmaya dahil edilmiştir (Tate ve Cooper, 2007). Est3p *S. cerevisiae*’da telomeraz kompleksinin önemli alt birimidir, telomeraz aktivitesini de önemli derecede etkilemektedir. AraÇtırmamızda kafein ve etanol ile inkübasyonun EST3’de frame shift oranına etkileri incelendi. Frame shift ve frame fusion vektörleri *S. cerevisiae* BY4741 suÇuna transfrom edildi. Kafein ile inkübasyonun frameshift oranına etkisini tayin etmek için

maya transformantları Sc-Ura +%2 dekstroz ortamında logaritmik aÇamaya kadar üretildi. Bu aÇamada üreme ortamına kafein ilave edilerek 5 saat standart Çartlarda inkübasyona devam edildi ve kafeinin frameshift oranına etkileri hesap edildi (Çizelge 4.6).

**Çizelge 4.6.** Kafein'in EST3'de frame shift,,e etkisi

Maya SuÇu	Ekspresyon vektörü	Ekspresyon seviyesi*	% FS
BY4741	pDT265	58	8.9
	pDT261	651	

\*Üreme ortamına son konsantrasyonu 8 mM olacak Çekilde steril kafein ilave edilmiştir..

Kafein ile logaritmik aÇamada inkubasyonun EST3 frameshift oranında % 13'den % 8.9 azalmaya neden olduğu görülmektedir (Çizelge 4.1 ve 4.6).

Etanol'un EST3'de frame shift oranına etkisi ise iki farklı deneysel yaklaşım ile tayin edilmiştir. Bilindiği gibi, etanol *S. cerevisiae* suÇları tarafından diğer karbonhidratlar üreme ortamında olmadığı zaman karbon kaynağı olarak da kullanılmaktadır. Etanol aynı zamanda üreme ortamında belirli konsantrasyonların üzerinde bulunduğu (%5 veya daha fazla) kimyasal stres meydana getirebilmektedir. Bundan dolayı etanol'un hem karbon kaynağı olarak ve hem de kimyasal stres ajanı olarak EST3'de frame shift oranına etkileri ayrı ayrı incelenmiştir. Etanol'un kimyasal stres ajanı olarak frame shift'e etkisini belirlemek için *S. cerevisiae* BY4741 suÇunun EST3 frame shift ve frame fusion vektörü transformantları önce Sc-Ura %2 dekstroz ortamında logaritmik aÇamaya kadar üretilip bu aÇamada üreme ortamına son konsantrasyonu %8 olacak Çekilde etanol ilave edildi. Transformant kültürleri etanol içeren bu ortamda 5 saat inkübe edildi. Stres ajanı olarak etanol'un üreme ortamında bulunmasının EST3 frame shift oranında azalmaya yol açtığı ve normal koÇullarda %13 olan frame shift oranının % 11'e düÇtüğü belirlendi (Çizelge 4.7).

Üreme ortamında karbon kaynağı olarak etanolün bulunması ise EST3 frame shift oranında açığı azalmaya ve yaklaşık olarak frame shiftin tamamen durmasına, frame shift oranının ise % 0.76 kadar düşmesine neden olduğu görüldü (Çizelge 4.7).

**Çizelge 4.7.** Etanolün EST3de frame shift oranına etkisi

Üreme ortamı	Ekspresyon vektörü	Ekspresyon seviyesi*	% FS
<i>Sc-ura</i> +%2 dekstroz + (%8 etanol)	pDT265	108	<b>10.78</b>
	pDT261	1001	
<i>Sc-ura</i> +%2 etanol	pDT265	9	<b>0.76</b>
	pDT261	1174	

\*Ekspresyon seviyesi nmol ONPG/dakika/mg protein olarak verilmiştir.

## 5. TARTIĞMA VE SONUÇ

Programlı ribozomal frameshift (PRF) gen ifadesinin translasyonun devamı aÇamasında meydana gelen bir çeğit kontrol mekanizmasıdır. Bakterilerde, ökaryotik virüslerde ve ökaryotlarda birçok hücrel gende gen anlatımının PRF ile kontrol edildiği gösterilmiğtir (Atkins ve ark, 2016; Namy ve ark. 2004; Farabaugh, 1996). Ğnsan sağlığı ile yakından ilgili olduğundan özellikle HİV virüsünde PRF'in moleküler mekanizması ayrıntılı olarak incelenmiğtir (Varmus ve Jacks, 1985).

*S. cerevisiae* *EST3* geninden kodlanan Est3p proteini telomeraz enziminin düzenleyici alt birimidir ve *est3* mutanı *S. cerevisiae* hücrelerinde telomerlerin her bölünmede kısaldağı rapor edilmiğtir (Wellinger ve Zakian, 2012). Telomer uzunluklarına etki eden diğer faktörler ise çeÇitli çevresel stres faktörleri ve hücrel yağlanmadır. Harriri vd'nin (2007) yaptığı arağtırmada bazı stres faktörlerinin telomer uzunluklarında önemli kıalmaya, bazı stres faktörlerinin ise telomerlerde uzamaya neden olduğu görülmüğtür. Bu çalıÇmada strese maruz bırakılan *S. cerevisiae* hücreleri yaklağık 100 bölünme süresince stres faktörüne maruz bırakılmığ ve bu süre sonunda telomer uzunluklarındaki değiğim incelenmiğtir (Romano ve ark., 2013). *S. cerevisiae* üreme ortamı koğullarının telomer uzunluklarına etkisi bilindiğinden bu arağtırmada azot stresi, etanol ve kafein stresi gibi faktörlerin telomer replikasyonu için önemli bir peptid olan EST3 de PRF'e etkileri incelenmiğtir. Üreme ortamına uygulanan bu stres faktörlerine ek olarak üreme aÇamaları ve pseudohifsel üremenin de EST3 de PRF'e etkileri incelenmiğtir.

Kupiec ve ekibi tarafından yapılan arağtırmada telomer uzunluğuna çevresel stres faktörlerinin etkilerini tayin edebilmek için 50 veya 100 jenerasyonluk üreme süreci sonunda telomer uzunlukları tayin etmiğtir (Romano ve Ark, 2013). Bizim araÇtırmamızda ise *EST3* de framsehift oranları logaritmik aÇamada 2-3 jenerasyon süresi sonunda tayin edilmektedir. Çok uzun jenerasyon süreci plazmit kaybına yol açabileceğinden araÇtırmamızda jenerasyon süreci bir zorunluluk olarak kısa tutulmuğtur. Bu nedenle toplam telomer uzunluğuna stress faktörlerin etkisi ile *EST3* de frame shift oranları daha önceki çalığmalar ile uyumlu görülmemektedir. Örnek olarak



etanol stresinin telomerlerde uzumaya neden olduğu rapor edilmiğtir. Araştırmamızda elde edilen sonuçlar ise etanol stresinin EST3 de frameshifte çok fazla etkinin olmadığını göstermektedir. Bu tez çalışmasının kaynak araştırması bölümünde de verildiği gibi *S. cerevisiae*’da telomer yapısında çok sayıda faktör bulunmaktadır. Romano ve ark (2013) yaptıkları bu önemli çalışmada telomeraz aktivitesini de tayin etmemişlerdir. Yapılan bu çalışma telomer uzunluklarının tayini ile ilgilidir.

TOR genel besin sensörüdür, tercih edilen azot kaynağı amonyum veya glutamin ve karbon kaynağı olarak da glukoz bulunduğunda bağta üreme hızı olmak üzere birçok metabolik yolağı aktive eder (Rohde ve ark., 2008). Üre, allantoin veya prolin ise tercih edilmeyen azot kaynaklarıdır. Etanol gibi tercih edilmeyen ve direkt olarak da metabolize edilmeyen karbon kaynağı üreme hızını yavaşlatmaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre tercih edilmeyen azot kaynaklarında üremenin PRF oranına fazla etki etmediğini göstermektedir. Bu da TOR sinyal yolağının veya azot kaynaklarının EST3’de PRF oranına çok önemli bir etkisi olmadığını öne sürmektedir. TOR sinyal yolağı gen ifadesine transkripsiyon seviyesinde de etki etmektedir. Bu nedenle TOR etkisi EST3 genininde transkripsiyonel seviye de olabilir. Bundan dolayı farklı azot kaynaklarında üretilen *S. cerevisiae* hücrelerinde EST3 mRNA seviyesinin de karşılaştırılmalı olarak analizi gerekebilir.

Araştırmalarımızda EST3’de PRF oranına etki eden en önemli faktörün üreme açamaları, durağan faz ve pseudohifsel üreme olduğu bulunmuştur. Bu da EST3’de PRF oranının üreme hızına göre kontrol edildiğini öne sürmektedir. Logaritmik fazda en hızlı seviyede olan DNA replikasyonu ve buna bağlı olarak gerçekleşen telomer replikasyonu nedeni ile telomeraz aktivitesine ihtiyaç duyulmaktadır. durağan fazda ve pseudohifsel üremede ise üreme ya tamamen durmuştur veya çok yavaş gerçekleşmektedir, bu nedenle bu aşamalarda DNA ve telomer replikasyonu yapılamamaktadır. Karbon kaynağı olarak glukoz yerine etanolün bulunması da üreme hızını çok yavaşlatır. EST3’de PRF oranındaki azalma buna bağlı olarak gerçekleşebilir. Durağan fazda ve pseudohifsel üremede aktif telomeraz enzimine fazla ihtiyaç duyulmadığından telomerazın düzenleyici alt birimi olan EST3’de de gen ifadesi buna bağlı olarak azalabilir. *S.cerevisiae*’da hücre döngüsü bütün ökaryotlarda olduğu gibi

G1, S, G2 ve M fazlarından meydana gelir. Hücre döngüsü CDK (cyclin dependent kinase) tarafından kontrol edilir (Enserink ve ark 2010). Pseudohyphal oluşumu sırasında hücre döngüsünde G2/M fazı çok uzun sürede tamamlanır. Pseudohifsel üreme sırasında bazı siklinlerin baskılandığı ve bunun da MAP kinazlar tarafından yapıldığı gösterilmiştir (Zaragoza ve Gancedo, 2000).

Kafein'in telomer uzunluklarında kısalmaya yol açtığı gösterilmiştir (Romano ve ark. 2013). Çalışmamızda üreme ortamında kafein bulunması ile EST3'de PRF oranının yaklaşık %32 azaldığı belirlenmiştir. Kafeinin aynı zamanda telomer yapısında bulunan diğer faktörlere de etki ettiği gösterilmiştir (Romano ve ark. 2013). Etanol'ün stres ajanı olarak üreme ortamında bulunması da EST3'de PRF oranına fazla miktarda etki etmemektedir. PRF oranı normal ortamda % 13.2 iken %8 etanol varlığında bu oran %10.78'e azalmaktadır. Romano ve ark. (2013) yayımladıkları araştırmada %7 etanol varlığında telomer uzunluklarında önemli artış rapor etmişlerdir. Yalnız etanolün bu etkisini görebilmek için maya hücreleri 200 bölünme süresince yeast ekstrakt ve pepton ortamında (YPE) etanol stresine maruz bırakılmıştır. Araştırmalarımız plazmit vektörleri ile yapıldığından minimal ortamda ve kısa süreli olarak yapılabilmektedir. Bu nedenle etanol stresinde telomerlerde uzama görülürken EST3'de PRF oranında beklenen önemli artış görülememiği olabilir.

Ökaryotlarda telomer yapıları çok kompleks DNA-protein yapılarıdır. *S. cerevisia*'da telomer uzunluklarını kontrol eden yaklaşık 400 gen rapor edilmiştir (Harrari ve Kupiec, 2014; Unger ve ark., 2009). *EST3*, Telomer Maintenance Genes (TLM) olarak adlandırılan bu genlerden sadece birisidir. *EST3* geninin ekspresyonu transkripsiyonel seviyede olduğu gibi translasyonun elongasyon aşamasında da ribozomal frameshift ile kontrol edilmektedir (Morris ve Lundblad, 1997; Taliferro ve Farabaugh, 2007). Elde ettiğimiz sonuçlar *EST3* gen ifadesinin ribozomal frameshift ile kontrolünde özellikle üreme aşamalarının ve buna bağlı olarak da üreme hızı, hücre bölünme hızının önemli olabileceğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

**Atkins, F.J., Loughran, I., Bhatt, P.R., Firth A.E., Baranov, P.V. 2016.** Ribosomal frameshifting and transcriptional slippage: From genetic steganography and cryptography to adventitious use. *Nucleic Acids Res.*, 44 (15): 7007-7078.

**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.

**Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., Boeke, J.D. 1998.** Designer Deletion Strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a Useful set of Strains and Plasmids for PCR-mediated Gene Disruption and Other Applications. *Yeast*, 14: 115-132.

**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 Virgilio, C., Loewith, R. 2006.** Cell growth control: Little eukaryotes make big contributions. *Oncogene*, 25: 6392-6415.

**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.

**Enserink, J.M., Kolodner, R.D. 2010.** An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div.*, 5: 11.

**Farabaugh, P.J. 1996.** Programmed translational frameshifting. *Microbiol. Rev.*, 60: 103-134.

**Feldman, H., 2012.** *Yeast: Molecular and cellular biology.* Wiley-Blackwell, Weinheim, Germany.

**Freitas-Simoes, T.M., Ros, E., Sala-Vila, A. 2016.** Nutrients, foods, dietary patterns and telomere length: Update of epidemiological studies and randomized trials. *Metabolism*, 65: 406-415.

**Frydrychova, R., Mason, J. 2013.** *Telomeres: Their Structure and Maintenance.* National Institute of Environmental Health Sciences, USA

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lingner, J., Cech, T.R., Hughes, T.R., Lundblad, V. 1997.** Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 94: 11190- 11195.
- 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.
- Magasanik, B., Kaiser, C.A. 2002.** Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 290:1-18
- Morris, D.K., Lundblad, V. 1997.** Programmed translational frameshifting in a gene required for yeast telomere replication. *Current Biology*, 7: 969-976.
- Namy, O., Rousset, J.P., Naphine, S., Brierley, I. 2004.** Reprogrammed Genetic Decoding in Cellular Gene Expression. *Molecular Cell*, 13: 157–168.
- Orlova, M., Kanter, E., Krakovich, D., Kuchin, S. 2006.** Nitrogen Availability and TOR Regulate the Snf1 Protein Kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 5: 1831-1837.

**Reiling, J.H., Sabatini, D.M. 2006.** Stress and mTOR signaling. *Oncogene*, 25: 6373-6383.

**Rohde, J.R., Bastidas, R., Puria, R., Cardenas, M.E. 2008.** Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Opinion in Microbiology*, 11: 153-160.

**Romano, G.H., Harari, Y., Yehuda, T., Podhorzer, A., Rubinstein, L., Shamir, R., Gottlieb, A., Silberberg, Y., Peer, D., Ruppin, E., Sharan, R., Kupiec, M. 2013.** Environmental Stresses disrupt telomere length homeostasis. *Plos Genetics*, 9: e1003721.

**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.

**Sharanov, S., Zvereva, M.I., Dontsova, O.A. 2006.** *Saccharomyces cerevisiae* telomerase subunit EST3p binds DNA and RNA and stimulates unwinding of RNA/DNA heteroduplexes. *FEBS Lett.*, 580: 4683-4690.

**Sherman, F. 1998.** *An Introduction to the Genetics and Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae*. University of Rochester Medical School, Rochester, NY 14642, USA.

**Singer, M.S., Gottschling, D.E. 1994.** TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science*, 266: 404-409.

**Szostak, J.W., Blackburn, E.H. 1982.** Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell*, 29: 245-255.

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

**Tate, J.J., Cooper, T.G. 2007.** Stress-responsive Gln3 localization in *Saccharomyces cerevisiae* is separable from and can overwhelm nitrogen source regulation. *J. Biol.Chem.*, 282: 18467–18480.

**Türkel, S., Kaplan G., Farabaugh, P.J., 2011.** Glucose signalling pathway controls the programmed ribosomal frameshift efficiency in retroviral-like element Ty3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 28: 799-808.

**Ungar, L., Yosef, N., Sela, Y., Shara, R., Ruppin, E., Kupiec, M. 2009.** A genome-wide screen for essential yeast genes that affect telomere length maintenance. *Nucleic Acids Res.*, 37: 3840-3849.

**Varmus, H.E., Jacks, T. 1985.** Expression of the Rous sarcoma virus pol gene by ribosomal frameshifting. *Science*. 230: 1237-1242.

**Wellinger, R.J., Zakian, V.A. 2012.** Everything you ever wanted to know about *Saccharomyces cerevisiae* telomeres: Beginning to end. *Genetics*, 191: 1073–1105.

**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.

**Wolkowitz, O.M., Epel, E.S., Mellon, S. 2008.** When blue turns to grey: do stress and depression accelerate cell aging? *World J. Biol. Psychiatry*, 9: 2-5.

**Yang, C.P., Chen, Y.B., Meng, F.L., Zhou, J.Q. 2006.** *Saccharomyces cerevisiae* Est3p dimerizes in vitro and dimerization contributes to efficient telomere replication in vivo. *Nucleic Acids Res.*, 34: 407-416.

**Zaragoza, O., Gancedo, J.M., 2000.** Pseudohyphal growth is induced in *Saccharomyces cerevisiae* by a combination of stress and cAMP signalling. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2: 187-194

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

## EKLER

### Ek 1: Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması

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

YPD besiyeri *S. cerevisiae* için üreme ortamı olarak kullanılan zengin besiyeridir.

##### Bileşimi ve hazırlanması:

10 gram/litre Yeast Ekstrakt

20 gram/litre Pepton

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

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

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

*S. cerevisiae* transformantlarını üretebilmek için kullanılan seçici besiyeridir.

##### Bileşimi ve hazırlanması:

1.7 gram/litre Yeast Nitrogen Base (YNB)

5 gram/litre Amonyum sülfat

1.92 gram/litre urasil içermeyen amino asit karışımı (SC-Ura) (Sigma Y-1501)

Katı besiyerleri için son konsantrasyonu 20 gram/litre olacak Çekilde agar agar ilave edildi, 121°C'de 25 dakika süreyle olarak otoklavda sterilize edildi.

Urasil içermeyen amino asit karışımı 0.45µm por çaplı disk filtrelerde steril edilerek kullanımdan hemen önce üreme ortamına ilave edildi. Glukoz %20'lik steril stok çözeltilerden deneylerde açıklanan konsantrasyonlarda kullanımdan hemen önce ilave edildi.

### **3: SLAD Üreme Ortamı (Synthetic Low Ammonium Dextrose)**

*S. cerevisiae* hücrelerinde pseudohifsel üremeyi sağlamak için kullanıldı.

#### **Bileşimi:**

%0.67 Yeast Nitrogen Base (amino asitsiz ve amonyum sulfatsız)

0.05mM amonyum sülfat

%2 glukoz.

### **4: Lityum Asetat Çözeltileri (1M ve 0.1M)**

*S. cerevisiae* hücrelerine transformasyon yapmak için kullanıldı. Lityum asetat (M.a: 102.02) son konsantrasyonu 1M olacak şekilde 50 ml stok çözelti olarak hazırlandı ve Karıçım 0.45 µm por çaplı membran disk filtre ile steril edildi ve oda sıcaklığında depo edildi. 0.1M lityum asetat ise transformasyon işleminden hemen önce taze olarak hazırlandı.

### **5: Amino asit çözeltileri ve kafein:**

Tez araştırmasında alternatif azot kaynağı olarak kullanılan Glutamin, Prolin ve Lösin distile suda %2'lik stok çözeltiler olarak hazırlandı ve disk filtre ile steril edilip oda sıcaklığında saklandı. Azot kaynağı olarak verilen konsantrasyonlarda kullanıldı.

Kafein stok çözeltisi ise 500 mM olacak şekilde distile suda stok çözelti olarak hazırlandı ve verilen konsantrasyonlarda kullanıldı, oda sıcaklığında depo edildi.

### **6: Polietilen Glikol (%50 PEG)**

*S. cerevisiae* hücrelerine transformasyon yapmak için kullanıldı. Polietilen Glikol (Ma: 3,350) distile suda %50'lik stok çözelti olarak hazırlandı, 121°C'de 25 dakika otoklavda steril edildi.

### **7: SDS (%0.1) ve Kloroform çözeltileri**

SDS ve kloroform *S. cerevisiae* hücrelerini permeabilized edip hücre lizatlarını elde etmek için kullanıldı. SDS deionize suda %0.1'lik stok çözelti olarak hazırlandı. Kloroform direk olarak konsantre stoktan herhangi bir seyreltme yapılmadan kullanıldı.



### **7: Lizis tampon çözeltisi**

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

#### Bileşimi ve hazırlanması:

100 mM Tris.HCl (pH: 8)

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

%20 Gliserol

4 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF).

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

### **8: $\beta$ -Galaktozidaz tampon çözeltisi (Z Buffer)**

Bu tampon çözelti maya transformantlarından elde edilen lizatlarda  $\beta$ -galaktosidaz enzimatik aktivitesini tayin etmek için tampon çözelti olarak kullanıldı.

#### Bileşimi ve hazırlanması:

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

40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O,

10 mM KCl,

1 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

50 mM  $\beta$ -Merkepto-etanol çözeltisi

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

### **9: Lowry Çözeltileri**

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

#### Çözeltilerin bileşimi ve hazırlanması:

I: Lowry A çözeltisi: 20g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 4g NaOH toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü, stok çözelti olarak oda sıcaklığında depo edildi.

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

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

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

Lowry-C çözeltisinin hazırlanması:

24.5 ml Lowry A,

250 µl Lowry B1,

250 µl Lowry B2, karıştırıldı ve taze olarak kullanıldı.

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

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

## Ek 2: $\beta$ - Galaktozidaz aktivitesi hesaplanması

*S. cerevisiae* transformantlarından ölçülen  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesi aşağıda verilen formül excel formatına göre hazırlanan çalışma tablosu kullanılarak hesap edildi.

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

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

t:  $\beta$ -galaktozidaz reaksiyon süresi (dakika)

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

P: Hücre lizatlarının protein konsantrasyonları (mg/ml)

$\beta$ -galaktozidaz aktivitesi birimi: Dakikada 1 mg protein tarafından hidroliz edilen nmol ONPG (nmol ONPG/dk/ mg protein) cinsinden verilmiştir

## ÖZGEÇMİŞİ

Adı Soyadı : Mahmoud ARAFAT  
Doğum Yeri ve Tarihi : Lübnan, 18.03.1990  
Yabancı Dili : İngilizce, Türkçe, Fransızca

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Baalbak Devlet Lisesi/ Baalbak, Lübnan  
Lisans : Lebanese International University/ Bekaa,  
Lübnan

Yüksek Lisans : Uludag Üniversitesi/ 2016

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : -----

İletişim (e-posta) : rastro\_2@hotmail.com

Yayımları : ----

