

**MAYADA ÇEŞİTLİ FARKLILAŞMA SİNYALLERİNİN
TPS1 VE *NTH1* GENLERİ TRANSKRİPSİYONUNA
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Thomas Saah PETERS



T.C
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MAYADA ÇEŞİTLİ FARKLILAŞMA SİNYALLERİNİN TPS1 VE NTH1
GENLERİ TRANSKRİPSİYONUNA ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Thomas Saah PETERS
0000-0003-0324-5583

Prof. Dr. Sezai TÜRKEL
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA-2021
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MAYADA ÇEŞİTLİ FARKLILAŞMA SİNYALLERİNİN TPS1 VE NTH1 GENLERİ TRANSKRİPSİYONUNA ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Thomas Saah PETERS

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

Danışman: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Saccharomyces cerevisiae, haploid veya diploid olarak bulunabilen tek hücreli ökaryotik bir organizmadır. Tek hücreli olmasına rağmen, bazı çevresel koşulların etkisi ile farklı gelişim süreçleri göstermektedir. Bu süreçler sporülasyon ve psöдохifsel gelişmelerdir. Diploid mayalarda azot açlığının Ras2 membran proteini tarafından kontrol edildiği bilinmektedir. Azot açlığı durumunda aktif hale gelen Ras2 proteini, protein kinaz A yolu aracılığıyla, enzimleri ve transkripsiyon faktörlerini kodlayan çok sayıda genin aktivitesini değiştirmektedir. Sonuç olarak, diploid mayalar üreme şeklini değiştirmekte ve psöдохifsel üremeye geçmektedir. Ras2 ve diğer bazı mutasyonlara sahip sigma suşu, haploid olsa dahi, pseudohif oluşturmaktadır. Trehaloz, *S. cerevisiae* için önemli bir disakkarittir ve depo karbonhidrattır. Stres koruma faktörü olmakla birlikte hücreye glikoz girişini kontrol etmektedir. *TPS1* ve *NTH1* genleri de trehaloz metabolizmasında biyosentez ve katabolizmada işlev gören enzimleri kodlamaktadır. Bu tez çalışmasında, *S. cerevisiae*'de görülen apoptoz, otofaji, pseudohifsel gelişim gibi farklı hücresel süreçlerinin *TPS1* ve *NTH1* genlerinin transkripsiyonu üzerine etkileri araştırıldı. Farklı genetik özelliklere sahip suşlara transforme edilen *TPS1-LacZ* ve *NTH1-LacZ* gen füzyonlarının transkripsiyon seviyeleri β -galaktozidaz enzim tayin methoduyla belirlendi. Apoptoz koşulları aktive edildiğinde *TPS1* ve *NTH1* gen ekspresyonunun 2 kat baskılandığı görüldü. Ancak, otofaji koşullarının aktive edilmesi ile hem *TPS1* ve hem de *NTH1* geni transkripsiyonunda farklı seviyelerde aktivasyon olduğu bulundu. Diploid maya hücresinde sporulasyon aktivasyonunda *NTH1* geni transkripsiyonunda önemli bir azalma olduğu tayin edildi. *NTH1* ve *TPS1* gen transkripsiyonlarının *S. cerevisiae*'nin farklı hücresel gelişim veya farklılaşma süreçlerinden farklı şekillerde etkilendiği görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Maya, Otofaji, Transkripsiyon, Trehaloz.

2021, XII + 43 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

ANALYSIS OF THE EFFECTS OF VARIOUS DIFFERENTIATION SIGNALS ON THE TRANSCRIPTION OF TPS1 AND NTH1 GENES IN YEAST

Thomas Saah PETERS

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

Supervisor: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Saccharomyces cerevisiae is a unicellular eukaryotic organism that can be found as haploid or diploid. Although it has a single cell, it shows different developmental processes under the influence of some environmental conditions. These processes are sporulation and pseudohyphal developments. It is known that nitrogen starvation in diploid yeasts is controlled by the Ras2 membrane protein. The Ras2 protein, which is activated in nitrogen starvation, changes the activity of many genes encoding enzymes and transcription factors through the protein kinase A pathway. As a result, diploid yeasts change their growth pattern and pass on to pseudohyphal reproduction. Sigma strain with *ras2* and some other mutations produces pseudohyphae even though it is haploid. Trehalose is an important disaccharide and storage carbohydrate for *S.cerevisiae*. Although it is a stress protection factor, it controls the entry of glucose into the cell. *TPS1* and *NTH1* genes also encode enzymes that function in biosynthesis and catabolism in trehalose metabolism. In this thesis study, the effects of different cellular processes such as apoptosis, autophagy, pseudohyphal development seen in *S. cerevisiae* on the transcription of *TPS1* and *NTH1* genes were investigated. The transcription levels of *TPS1-LacZ* and *NTH1-LacZ* gene fusions transformed into strains with different genetic characteristics were determined by the β -galactosidase enzyme assay method. When the apoptosis conditions were activated, it was observed that *TPS1* and *NTH1* gene expression was suppressed 2-fold. However, different levels of activation were found in both *TPS1* and *NTH1* gene transcription by activating autophagy conditions. A significant decrease in *NTH1* gene transcription in sporulation activation in diploid yeast cell was determined. It is seen that *NTH1* and *TPS1* gene transcriptions are affected differently by different cellular development or differentiation processes of *S. cerevisiae*.

Keywords: Apoptosis, Autophagy, Trehalose, Transcription, Yeast

2021, XII + 43 pages

TEŞEKKÜR

Uludağ Üniversitesi'ndeki akademik yaşantım boyunca bana verdiği rehberlik ve bükülmez destek için akademik danışmanım **Prof. Dr. Sezai TÜRKEL**'e içten ve derin teşekkür ederim. Deneyimi, yönü ve sabrı bana çok yardımcı oldu, bu olmadan başarılı bir akademik çalışma elde edemezdim. Akıl hocam, danışmanım ve babam olarak kalır ve ona sonsuza dek minnettar kalacağım.

Ayrıca tez çalışmalarımda yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarım olan yüksek lisans öğrencilerine, özellikle **Gözde ASLAN** ve **Ceyda ÇOLAKOĞLU**'ya teşekkür ediyorum.

Son olarak, aileme, özellikle babam **John S. PETERS** ve annem **Finda JOHN**'a bana sonsuz sevgi ve destek sağladıkları için büyük bir teşekkür ve takdir gidiyor. Onlar olmasaydı, beni şimdiye kadar getiren motivasyona sahip olmazdım. Ayrıca yıllar boyunca gösterdikleri muazzam destek için YTB'ye teşekkür ederim.

Thomas Saah PETERS
12 / 02 / 2021

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLERİN DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nın Hücresel Özellikleri	3
2.2. <i>S. cerevisiae</i> 'da Psödohifsel üreme ve Kontrol Mekanizmaları	6
2.3. <i>S. cerevisiae</i> 'da Sporulasyon ve Önemi.....	7
2.4. <i>S. cerevisiae</i> 'da Apoptoz ve Otofaji Sürecileri.....	9
2.5. <i>S. cerevisiae</i> 'da Trehaloz Metabolizması ve Metabolik Önemi	11
2.6. <i>S. cerevisiae</i> 'da TPS1 ve NTH1 Genleri ve Kontrol Mekanizmaları.....	14
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	16
3.1. Araştırmada Kullanılan Maya Suşları ve Üreme Koşulları	16
3.2. <i>TPS1-LacZ</i> ve <i>NTH1-LacZ</i> Raportör Vektörünün Yapısı ve Transformasyonu.....	17
3.3. <i>S. cerevisiae</i> 'da Hücresel Farklılaşmaların Uyarılması	19
3.4. Raportör Genlerde Promotor Aktivitesi Tayini	20
4. BULGULAR.....	22
4.1. Psödohifsel Üremenin TPS1 ve NTH1 Transkripsiyonuna Etkileri	22
4.2. Sporulasyonun Aktive Edilmesinin TPS1 ve NTH1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	23
4.3. Apoptoz Koşullarının TPS1 ve NTH1 Transkripsiyonuna Etkileri	24
4.4. Otofaji Koşullarının TPS1 ve NTH1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	25
4.5. Tec1p'nin TPS1 ve NTH1 Transkripsiyonuna Etkileri	26
4.6. <i>TPS1</i> ve <i>NTH1</i> Geni Promotor Yapılarının Sekans Analizi	27
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	31
KAYNAKLAR DİZİNİ	34
EKLER.....	38
Ek 1. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması	39
Ek 2. β - Galaktozidaz Aktivitesi Hesaplanması.....	42
ÖZGEÇMİŞ	43

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta, delesyon
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
%	Yüzde

Kısaltmalar

Kısaltmalar	Açıklama
ATG	Autophagy Related: Otofaji genleri
ATP	Adenosin tri fosfat
cDNA	Copy of their DNA
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DR	Glukoz baskısı altında olmayan, (Derepressed)
GRAS	Generally Recognized as Safe
HOG	High Osmolarity Glycerol response
Kbp	Kilo base pair
LacZ	Beta-Galactozidaz geni
LiOAc	Lityum asetat kısa sembolü
Leu	Lösin
M	Molar
MAT	Mating type, <i>S. cerevisiae</i> 'da eşleşme tipi
Mbç	Mega baz çifti
MCA1	Metakaspaz 1
mg	Miligram
mm	Milimetre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
NTH	Nötral trehalaz enzimi
OD	Optical Density
ONPG	Orto Nitro Phenyl Galactoside
ORF	Open Reading Frame (Açık okuma Penceresi)
PEG	Polyetilen glikol

pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PKA	Protein Kinaz A
R	Glukoz baskılaması (Repressed)
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Rotation per minute
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC- Ura	Urasil içermeyen sentetik tam üreme ortamı
SGD	Saccharomyces Genome Database
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SNF	Sucrose non-fermenting
TPS	Trehaloz fosfat sentaz
URA	Uracil
yAP	Yeast Aktivatör Protein
YE _p	Yeast Epizomal plazmit
YPK	Yeast Protein Kinase
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast extract Pepton Dextrose

ŞEKİLLERİN DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Haploid ve diploid <i>S. cerevisiae</i> 'da budding farklılığı.....	5
Şekil 2.2. <i>S. cerevisiae</i> haploid ve diploid hücre döngüsü.....	6
Şekil 2.3. Mayada pseudohypeal üreme.....	7
Şekil 2.4. <i>S. cerevisiae</i> 'de spor ve ascus oluşum aşamaları.....	9
Şekil 2.5. <i>S. cerevisiae</i> 'da makrotofajinin aşamaları.....	11
Şekil 2.6. <i>S. cerevisiae</i> 'de glikojen ve trehaloz sentez metabolizması yolu.....	13

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1: Trehaloz metabolizması Enzimleri.....	14
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşları ve özellikleri	17
Çizelge 4.1. <i>TPS1</i> ve <i>NTH1</i> genlerinin farklı maya suşlarında Transkripsiyon seviyeleri.....	22
Çizelge 4.2. Psöдохifsel üremenin <i>TPS1</i> ve <i>NTH1</i> genlerinde transkripsiyona etkileri.....	23
Çizelge 4.3. Sporulasyonun <i>TPS1</i> ve <i>NTH1</i> genlerinde transkripsiyona etkileri.....	24
Çizelge 4.4. Apoptoz aktivasyonunun <i>TPS1</i> ve <i>NTH1</i> ’da transkripsiyona etkileri.....	25
Çizelge 4.5. Genel otofajinin FY2 suşunda <i>TPS1</i> ve <i>NTH1</i> genlerinde transkripsiyona etkileri.....	26
Çizelge 4.6. Tec1p’nin <i>TPS1</i> ve <i>NTH1</i> ’da transkripsiyona etkileri.....	26
Çizelge 4.7. Otofaji koşullarına işlevi olan Transkripsiyon faktörleri ve bağlanma sekansları.....	27
Çizelge 4.8. <i>TPS1</i> promotorunda potansiyel bağlanma sekansları olan transkripsiyon faktörleri.....	28
Çizelge 4.9. <i>NTH1</i> promotorunda potansiyel bağlanma sekansları olan transkripsiyon faktörleri.....	29

1. GİRİŞ

Ökaryotik hücrelerde gelişim süreçlerinde, apoptoz ve otofaji gibi farklı hücre ölüm yolları görülmektedir. Apoptoz; programlı hücre ölümüdür ve yüksek organizasyonlu canlılarda gelişim sürecinin tamamlanması, hasarlı hücrelerin programlı olarak organizmadan elimine edilmesi gibi süreçlerin gerçekleşmesinde rol almaktadır. Otofaji ise; genel olarak hücresel faaliyetlerin sürekliliği için bazı proteinlerin ve organellerin programlı olarak parçalanması ve gerektiğinde yeniden amino asit kaynağı olarak kullanılması sürecidir. *S. cerevisiae*'de, bu iki hücresel farklılaşma sürecine ek olarak diploid hücrelerde ortam koşullarına bağlı sporulasyon da görülmektedir. Ayrıca besin açlığı durumunda *S. cerevisiae* hücreleri tek hücreli formdan çok hücreli psödohifsel yapıya dönüşebilirler. Bütün bu gelişim ve farklılaşma süreçleri hem hücre içi ve hem de hücre dışı sinyallere bağlı olarak kontrol edilmektedir. Otofaji başta olmak üzere, apoptoz, psödohifsel gelişme ve sporulasyonun moleküler mekanizması ve bu süreçlerde yer alan faktörler *S. cerevisiae*'da oldukça iyi analiz edilmiştir.

Trehaloz, mantarlar aleminde yer alan organizmalarda, bazı bitkilerde ve böceklerde sentezlenen disakkarittir. Mayanın depo karbonhidratıdır ve stres koruyucu metabolit olarak işlev görmektedir. Ayrıca hücreye glukoz taşınımında da işlevi olduğu gösterilmiştir. Trehaloz biyosentezi ve yıkımı hücresel koşullara göre sürekli olarak düzenlenmektedir. Bu düzenleme trehaloz biyosentezi ve yıkımında önemli olan genler *TPS1* ve *NTH1* ile gerçekleşmektedir. *TPS1*; trehaloz sentaz enzim kompleksinin önemli alt birimini kodlar. Bu genin delesyonunun birçok maya türünde letal olduğu gösterilmiştir ve maya için esansiyel gendir. *NTH1* geni ise hücresel koşullara göre depo edilen trehalozun, gerekli olduğunda hızlı bir şekilde glukozu yıkımı için işlevi olan nötral trehalaz enzimini kodlar. Trehaloz sentaz ve trehalaz enzim işlevlerinin hücresel koşullara göre dengeli olması gerekir. Çünkü, stres koşullarına dayanıklılık için yeterli trehaloz olmaması hücrede letal etki yaratabilir. Alternatif olarak, stres koşullarında biriktirilen trehalozun normal hücresel koşullara dönüşte hızlı şekilde yıkımının gerçekleşmemesi de hücre metabolizmasının normalleşmesini önler.

Bu tez araştırmasında *S. cerevisiae*'de önemli işlevi olan trehalozun biyosentezi ve yıkımında işlevi olan *TPS1* ve *NTH1* gen ekspresyonlarının hücresel farklılaşma

süreçleri olarak değerlendirilen apoptoz, otofaji, psödohifsel gelişim ve sporulasyon koşullarında nasıl etkilendiği incelenmiştir. Gen ifadesi analizlerinde çok farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan birisi de raportör gen füzyonlarıdır. Bu tez araştırmasında da gen ifadesi analizinde *TPS1* ve *NTH1* genlerinin LacZ füzyonu olarak hazırlanmış olan raportör genleri kullanılmıştır. Farklı mutant *S. cerevisiae* suşları kullanılmış ve bu gen füzyonlarının transformasyonu sonucu yapılan transkript seviyeleri tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar *TPS1* ve *NTH1* genlerinden yapılan transkripsiyonun apoptoz, otofaji, sporulasyon ve psödohifsel gelişim süreçlerinde farklı şekilde kontrol edildiğini göstermektedir. Apotoz koşullarında her iki genin transkripsiyonunda azalma görülürken otofaji koşullarında özellikle *NTH1* gen ifadesinde önemli artış olduğu görülmektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Saccharomyces cerevisiae*'nin Hücresel Özellikleri

S. cerevisiae, genomik üstünlükleri ve pek çok çalışma alanı açısından GRAS (Generally Recognized as Safe), yani güvenli olması, organizmanın en büyük avantajlarından biridir. 90 dakika gibi kısa bir sürede bölünmesi, özellikle endüstriyel üretimdeki rolünü önemli kılmaktadır. *S. cerevisiae*'nin üreme ortamları, kolay temin edilebilen ucuz besiyerleridir. Heterolog gen ifadesi için vektör çeşitliliği fazla olup transformasyonu da kolay ve etkindir (Feldman 2012). Ayrıca genomu sekanslanan ilk ökaryot organizmadır (Goffeau ve ark. 1996).

Tek hücreli olması bakımından laboratuvarında çok hızlı üretilebilir. Genomu kolayca mutajenize edilen ve değiştirilebilen basit bir ökaryotik hücreyi temsil eden *S. cerevisiae*, model bir sistem olarak kabul edilmiştir (Botstein ve Fink 2011). Bakterilerden biraz daha büyük bir genom yapısına sahip olan mayalar, prokaryotlarda ve virüslerinde moleküler genetikte hızlı ilerlemeyi sağlayan birçok teknik avantajı paylaşmaktadır. Katı besiyeri ortamında tek koloni olarak üreyebilmeleri mutant seçilimini mümkün kılar, üreme hızı yüksektir ve kısa sürede çok sayıda hücre elde edilir. Haploid ve diploid olarak bulunması da genler arası etkileşimin incelenmesini kolaylaştırır ve esansiyel genlerin çalışılması için şartlı mutant elde etmek de mümkündür (Amberg ve ark. 2005, Feldman 2012).

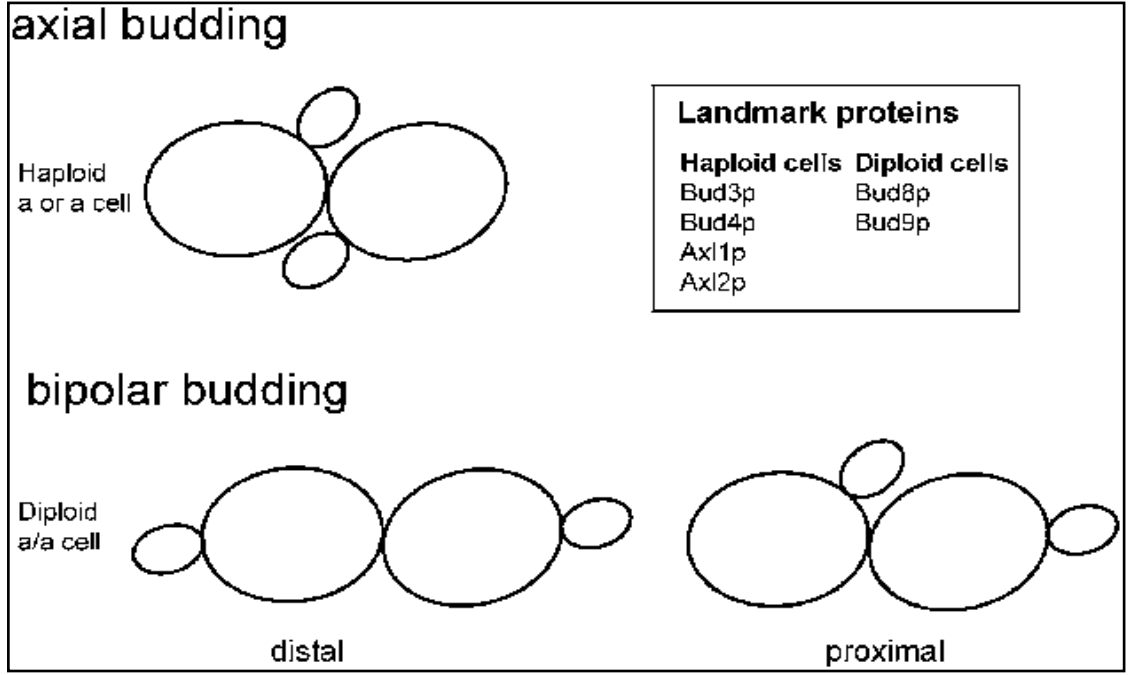
S. cerevisiae genomunda 16 kromozom vardır. Kromozomlara ek olarak genomda 2 mikron plazmiti, RNA virüsleri ve Ty elementleri (Transposon Yeast) de bulunmaktadır (Feldman 2012). Genomu kompakt yapıda olup 12 Mb büyüklüğündedir ve kodlanmayan bölge miktarı çok azdır (Madigan ve Martinko 2010). Genomunun %70'i ORF yani Açık Okuma Çerçevesinden oluşmaktadır. Genler arası boşlukları diğer ökaryotlara kıyasla daha kısadır. ORF'lerinde %4 civarında intron bölgesi içerir. 5570 protein kodlayan geni bulunur (Feldman 2012). Ayrıca, insanda bulunan birçok genin fonksiyonel homoloğu *S. cerevisiae*'de da bulunmaktadır. Bu nedenle *S. cerevisiae* insan genlerinin moleküler işlevlerinin analizinde kullanılmaktadır.

S. cerevisiae'da genomu sekanslanan ve aynı zamanda genom veritabanı da oluşturulan ilk ökaryotik organizma olma özelliği de taşımaktadır. *S. cerevisiae* kromozomların sekansları, genlerin koordinatları, gen yapıları ve kodlanan polipeptidlerin yapıları oldukça ayrıntılı olarak Saccharomyces Genome Data Base (SGD) adlı verilen veri tabanında açık erişim ile ulaşılabilir durumdadır (Anonim 2020a, Cherry ve ark. 2012). Bu veri tabanından sağlanan genetik ve biyokimyasal veriler *S. cerevisiae* araştırmalarında oldukça önemli bir yer tutmaktadır (Cherry ve ark. 2012).

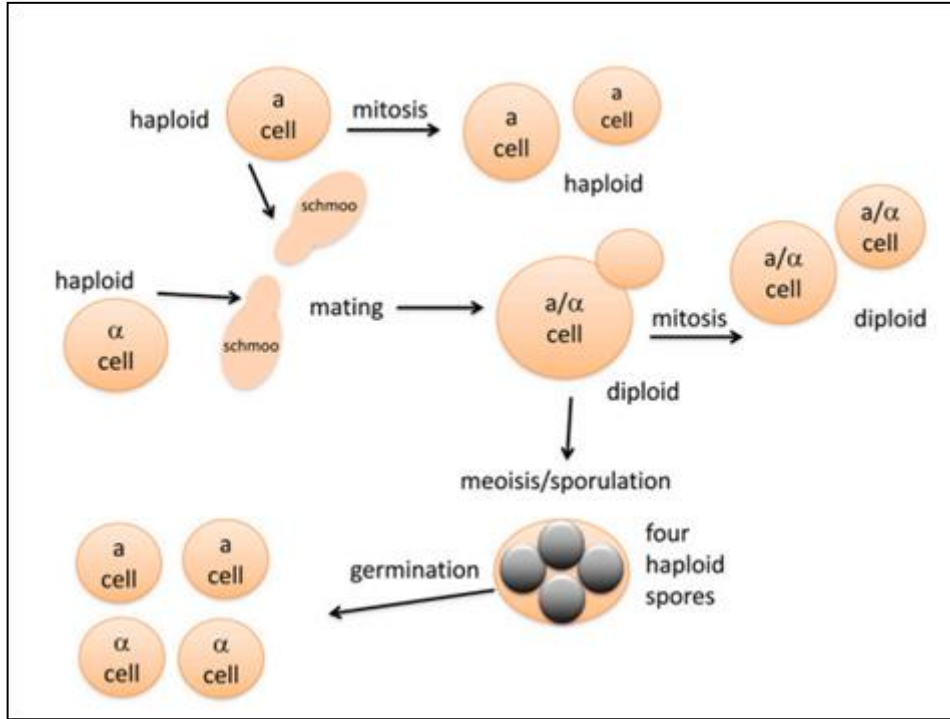
S. cerevisiae hücreleri ökaryotik hücreler olmakla birlikte bazı farklılıklar da içermektedir. Birçok ökaryottan farklı olarak *S. cerevisiae* hücrelerinde mitoz bölünme sırasında nükleus zarı kaybolmaz. Buna kapalı mitoz denir. *S. cerevisiae*'da lizozom da bulunmaz. Ayrıca, nükleus bölünmesi için gereken yapı, spindle pole body, hayvan hücrelerindeki sentriolden farklı olarak nükleus zarına bağlıdır ve bölünen nükleus ve kromozomların iki yavru hücreye ayrılmasını sağlar. Bununla birlikte hücre döngüsünün analizi için ideal ökaryotik organizmadır. (Feldman 2012).

S. cerevisiae hücreleri haploid veya diploid olarak bulunabilirler. Haploid ve diploid hücreleri görsel olarak ayırt etmek çok zordur. Ancak mikroskopta bölünme şekillerindeki farklılık dolayısıyla bu ayırım sağlanabilmektedir. Şekil 2.1'de gösterildiği gibi haploid hücrelerden tomurcuklanarak ayrılan yavru hücreler, hücrenin yan taraflarında meydana gelir. Buna aksiyal bölünme durumu denir. Diploid *S. cerevisiae* hücrelerinin bölünmesinde ise birbirini izleyen bölünmeler ana hücrede zıt kutuplardan oluşur. Diploidlerdeki bu bölünmeye de bipolar bölünme denir. Haploid *S. cerevisiae* hücreleri eşey tipi/cinsiyet olarak MATa ve MAT α olmak üzere iki çeşittir. Haploid hücreler aynı ortamda bulduklarında feromon üretilip eşleşerek diploidleri *S. cerevisiae* hücrelerini oluştururlar. Fakat diploid aşama bazı maya türlerinde kalıcı değildir. Kolaylıkla spor oluşturarak tekrar haploid maya hücrelerini oluştururlar. Ancak diploid *S. cerevisiae* normal üreme ortamında spor oluşturmaz, sadece olumsuz koşullarda (özellikle karbonhidrat eksiliği veya azot açlığı gibi) sporulasyon ile tekrar haploidleri oluşturmaktadır (Feldman 2012). Haploid maya hücreleri, uygun koşullar altında MATa/MAT α diploidleri üretmek için birbirleriyle çiftleşebilen tip a veya α (sırasıyla MATa ve MAT α) çiftleşme olabilir.

Bu diploid hücreler çiftleşemez, ancak mitotik olarak çoğalabilir veya haploid sporlar üretmek için mayoz bölünme geçirebilirler (Şekil 2.2). (Duina ve ark. 2014).



Şekil 2.1. Haploid ve diploid *S. cerevisiae*'da budding farklılığı (Oleferenko ve ark 2009)

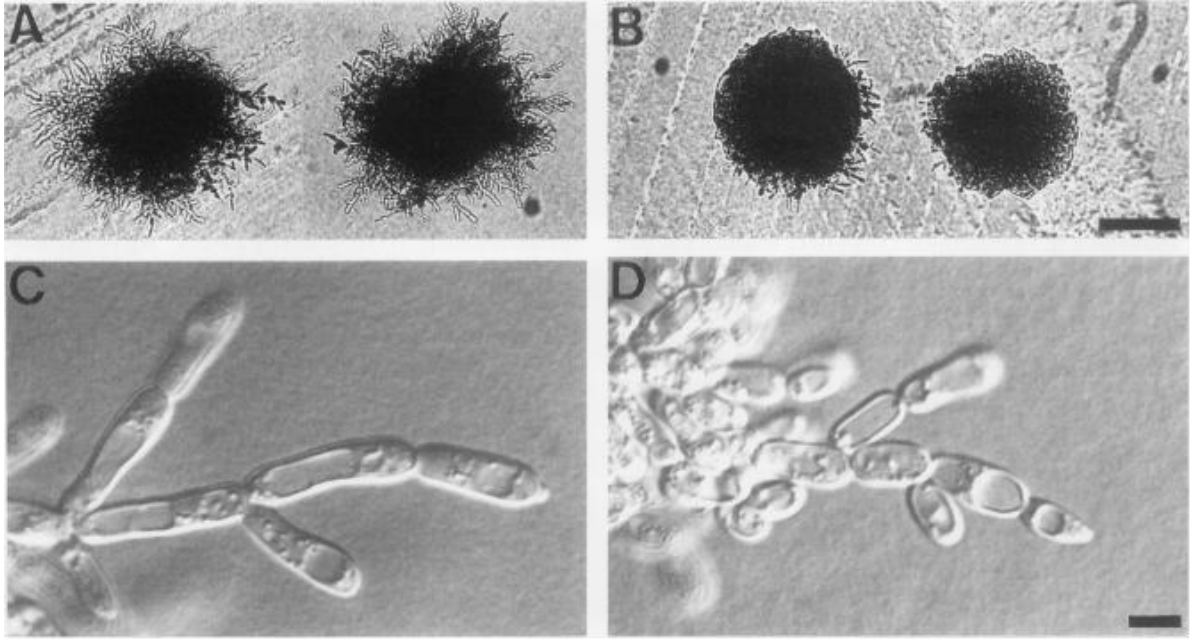


Şekil 2.2. *S. cerevisiae* haploid ve diploid hücre döngüsü (Duina ve ark. 2014).

2.2. *S. cerevisiae*'da Psödohifsel üreme ve Kontrol Mekanizmaları

Maya hücrelerinde glukoz ve azot kullanımı ve bu temel besinlerin türü ve miktarı metabolik kontrol için oldukça önemlidir. Haploid ve diploid maya hücreleri karbonhidrat ve azot kaynakları ve miktarına göre farklı gelişim süreçlerine uğrayabilirler. Diploid maya hücreleri üreme ortamında yeterli azot (NH₄) bulunmadığı durumda bir süre sonra dimorfik dönüşüme uğrarlar (Dimorphic switch). Bu dimorfik dönüşüm sonucunda da normal olarak tomurcuklanma ile çoğalan maya hücreleri pseudohifsel üreme aşamasına geçerler (Gimeno ve Fink 1994, Gancedo 2001). Pseudohifsel üremede maya hücreleri bölünmeye devam edebilirler, fakat bölünen hücreler birbirine bağlı kalır, küflere benzer bir ipliksi yapı oluştururlar. Fakat küflerde görülen hif yapılarından farklı olarak pseudohiflerde hücreler arasında bağlı vardır, farklı hücrelerin sitoplazmaları kaynaşmaz, sinsizyum oluşmaz (Şekil 2.3). Haploid hücrelerde ise azot açlığı invaziv üreme olarak bilinen şekilde gelişir. İnvaziv üremede maya hücreleri agar yüzeyinde değil agar içine doğru üreme gösterir (Kron ve ark. 1994). Diploid mayalarda azot açlığının membran proteini olan Ras2 ile algılandığı

bulunmuştur. Azot açlığı durumunda aktif hale gelen Ras2 proteini protein kinaz A yolağı aracılığı enzim ve transkripsiyon faktörleri kodlayan çok sayıda genin aktivitesini değiştirir. Bunun sonucu olarak da diploid mayalar üreme şeklini değiştirip pseudohifsel üremeye geçebilirler (Gimeno ve Fink 1994).



Şekil 2.3. Mayada Pseudohyfeal üreme (Gimeno and Fink 1994)

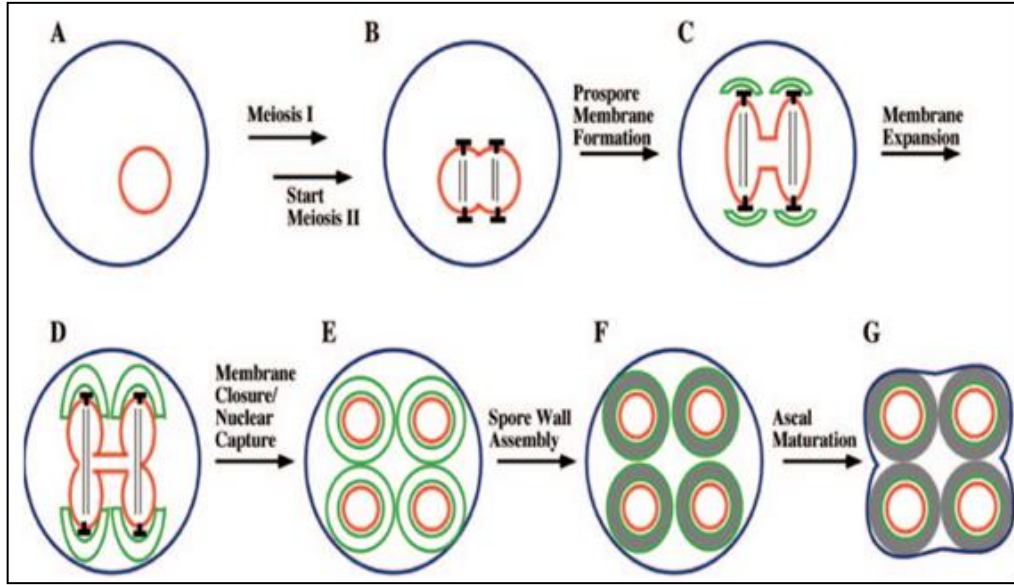
2.3. *S. cerevisiae*'da Sporulasyon ve Önemi

Diploid maya hücreleri normal besiyerinde azot ve glukoz miktarı yeterli ise mitotik olarak bölünerek üremelerine durağan faza kadar devam ederler. Durağan fazda ise latent olarak uzun süre kalabilirler. Ancak diploid maya hücrelerinin üreme ortamında hem azot ve hem de fermentasyonla kullanılacak karbonhidrat bulunmadığında bölünmeyi durdurup sporulasyon aşamasına geçebilirler. Sporulasyon için maya genomunda çok sayıda genin koordineli olarak işlev görmesi gerekir. Deneysel olarak sporulasyon glukoz yerine üreme ortamına potasyum asetat verilerek de uyarılabilir (Amberg ve ark.2005). Sporulasyon 24-36 saat gibi bir sürede tamamlanabilir. Ancak diploid maya hücrelerinin aynı suşa ait olsa dahi %100 değil belirli bir blöümü sporulasyona uğrar. Sporulasyon etkinliği diploid *S. cerevisiae* suşuna göre değişiklik

gösterebilir. Bu değişikliğin sporulasyon için gerekli olan gen ifadelerinin farklı hüclerde ifade seviyelerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünölmektedir. Sporulasyon hücrenel anlamda mayoz bölünmedir. Normal mitotik bölünme sürecinden besin açlığı sonucu mayoz bölünme programı başlatılır. *S. cerevisiae* genomunda sporulasyon süresince 1000 genin ifade seviyesinde önemli değişiklik olduğu bulunmuştur (Neiman 2005, Feldman 2012). Bu genlerden bir grubu spor duvarının sentezi için gereklidir (*spo75* ve *spo77* gibi). Bazıları ise I. mayozda rekombinasyon için gereklidir (*spo16* ve *spo 22* genleri) (Feldman 2012, Anonim 2020a).

Maya'da mayoz bölünme için gerekli faktörlerin kodlandığı genler ana regölatör olarak bilinen (master regulator) İME1 (Inducer of Meiosis I) tarafından aktive edilir. İME1 transkripsiyon faktörüdür ve mayozun başlangıç aşamasında gerekli olan enzim ve yapısal proteinlerin kodlandığı genleri aktive eder (Kassir ve ark. 1988, Anonim 2020a). Sporulasyonda ve dolayısıyla mayozda gerekli olan diğer bir ana düzenleyici faktör ise RME1'dir (Regulator of MEiosis 1) (Kassir ve Simchen 1976). RME1 çok yönlü bir transkripsiyon faktörüdür. Normal koşullarda üretilen maya hücrelerinde İME1 geni transkripsiyonunu baskımlarken aynı zamanda mitotik hücre döngüsünü de aktive eder. Bu şekilde normal koşullarda üretilen diploid hücrelerde ve haploidlerde mayoz bölünme gerçekleşemez (Kassir ve Simchen 1976, Anonim 2020a).

Sporulasyon sırasında önce mitotik bölünme durur ve I. mayoz gerçekleşir. Daha sonra ise II. mayoz gerçekleşir. I. ve II. mayoz sırasında spor duvarı (spore wall) sentezi de mayozla eş zamanlı olarak gerçekleşir. Sporulasyon süreci sonucunda diploid maya hücrelerinden spor kesesi içinde bulunan 4 haploid maya hücresi meydana gelir (Şekil 2.4). Spor kesesi içindeki bu haploid mayaların tamamına tetrad denir. Tetrad da yer alan haploid mayalar disseksiyon mikroskobu ile birbirinden ayrılarak mayoz sonucu oluşan haploid mayalar (diğer ifade ile gametler) genetik olarak incelenebilir.



Şekil 2.4. *S. cerevisiae*'de spor ve ascus oluşum aşamaları (Neiman 2005)

2.4. *S. cerevisiae*'da Apoptoz ve Otofaji Süreçleri

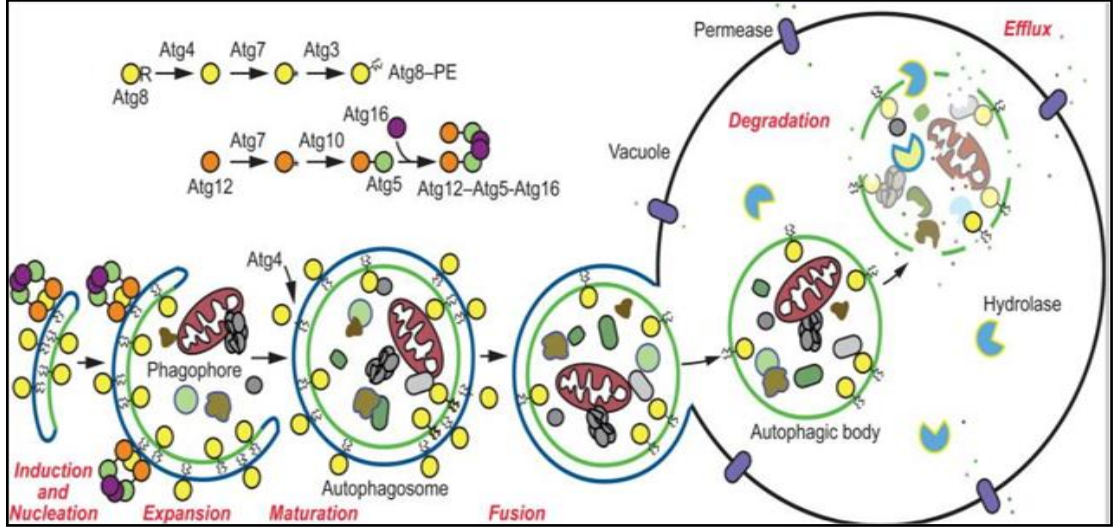
Apoptoz ilk kez *C. elegans*'da tanımlanan programlı hücre ölümü mekanizmasıdır (Ellis ve Horwitz, 1986; Nunez ve ark., 1998). Apoptoz süreci sonunda herhangi bir hücre atığı kalmadan hedef hücre tamamen yok edilir. Apoptoz farklı süreçler tarafından aktive edilir ve hücre içinde kazpaz olarak adlandırılan spesifik proteazlarca tamamlanır (Ellis ve Horwitz, 1986; Nunez ve ark., 1998). Çok hücrelilerde ve özellikle insanda ayrıntılı olarak çalışılan apoptoz *S. cerevisiae*'da da keşfedilmiştir. *S. cerevisiae*'da CDC48 geni delesyonlu maya suşlarında apoptoz benzeri hücre ölümü sonucu hücre ölümü görülmüştür (Madea ve ark., 1997, 2002). *cdc48* mutanları maya hücrelerinin mikroskopik analizlerinde apoptotik vezikül benzeri yapılar olduğu tayin edilmiştir. Daha sonra yapılan analizlerde ise bu süreçte apoptozda görülen kromatin fragmentasyonunun da görüldüğü tayin edilmiştir. *S. cerevisiae*'da apoptozun uyarılması için gerekli kimyasal uyarılar da tayin edilmiştir. Uzun süreli açlık, düşük pH, ve yüksek tuz konsantrasyonuna uzun süreli maruz bırakma gibi stres faktörlerinin mayada apoptozu aktive ettiği tayin edilmiştir (Strich 2015). Mayada apoptoz uyarıcı kimyasal olarak en yaygın kullanılan madde asetik asittir (Ludivico ve ark. 2001).

S. cerevisiae'da apoptoz sürecinde yer alan enzim ve diğer proteinler de genetik olarak tayin edilmiştir. İnsan hücreleri kadar kaspaz çeşitliliği olmadığı görülmüştür. *S. cerevisiae*'da kaspaz benzeri aktivitesi olan ve apoptoz için gerekli olan enzim de tayin edilmiştir ve YCA1 olarak (Yeast CAspase 1) adlandırılmıştır (Madeo ve ark., 2002). YCA1 enzimi reaksiyon mekanizması farklılığı dolayısıyla daha sonra metakaspaz MCA1 olarak adlandırılmıştır. İnsanda kaspaz enzimleri sistein spesifik proteazlardır. Ancak, mayadaki kaspaz olan MCA1 arjinin ve lizin birimlerinin olduğu yerlerden hedef proteinleri keser (Wilkinson ve Ramsdale, 2011). MCA1'e ek olarak apoptoz sürecinde yer alan diğer faktörler de belirlenmiştir. Bu faktörlerin çoğunun farklı özelliklerde proteazlar olduğu görülmektedir (Strich 2015). Bunlardan; Nma111p kaspaz3 benzeri enzimatik aktiviteye sahiptir. Aif1p ve Nuc1p ise spesifik nükleazlar olup apoptoz koşullarında DNA fragmentasyonunu gerçekleştirirler. Kex1p ise diğer kaspaz benzeri proteazdır (Strich 2015).

Otofaji ise *S. cerevisiae*'da moleküler mekanizması oldukça iyi aydınlatılmış bir hücresel süreçtir (Ohsumi 2014). Otofaji çeşitli stres koşullarında bazı hücre bileşenlerinin degradasyonu olarak da adlandırılır. Çeşitli organellerin parçalanması (ribofaji, mitofaji gibi) veya genel olarak denatüre proteinlerin parçalanması şekilde tanımlanabilir. Otofaji sürecinde gerekli olan faktörlerin kodlandığı genler ATG (AtTophaGy related) genleri olarak tanımlanmıştır (Delorme-Axford ve Klionsky 2018). *S. cerevisiae*'da ATG genleri işlevleri ayrıntılı olarak tanımlanmıştır ve bu genleri insanda da otofaji için gerekli homologlarının olduğu keşfedilmiştir.

Otofaji süreci besin açlığı ile uyarılır (Noda ve Ohsumi 1998). Otofaji uyarımı sonucunda sitoplazmada ATG proteinleri tarafında çift tabakalı membran yapısı içeren otofagozom yapıları meydana gelir (Şekil 2.5). Otofagozom denatüre proteinleri tekrar amino asitlerine parçalayıp hücre metabolizmasına destek sağlar. Bu şekilde hem hasarlı proteinler hücreden uzaklaştırılır ve hem de hücreye yeniden amino asit kaynağı sağlanmış olur (Delorme-Axford ve ark. 2015, Ohsumi 2014). Otofaji sürecinde de *S. cerevisiae*'da hem ATG genlerinin ve hem de açlık stresine yanıt olarak diğer genlerin transkripsiyonlarını kontrol eden çok sayıda transkripsiyon faktörü tayin edilmiştir.

Bunlardan bazıları; Ume6p, Pho23p, Rph1p, Rim15p, Gcn4p, Gln3p, Gat1p ve Yap1p gibi transkripsiyon faktörleridir (Delorme-Axford ve Klionsky 2018).



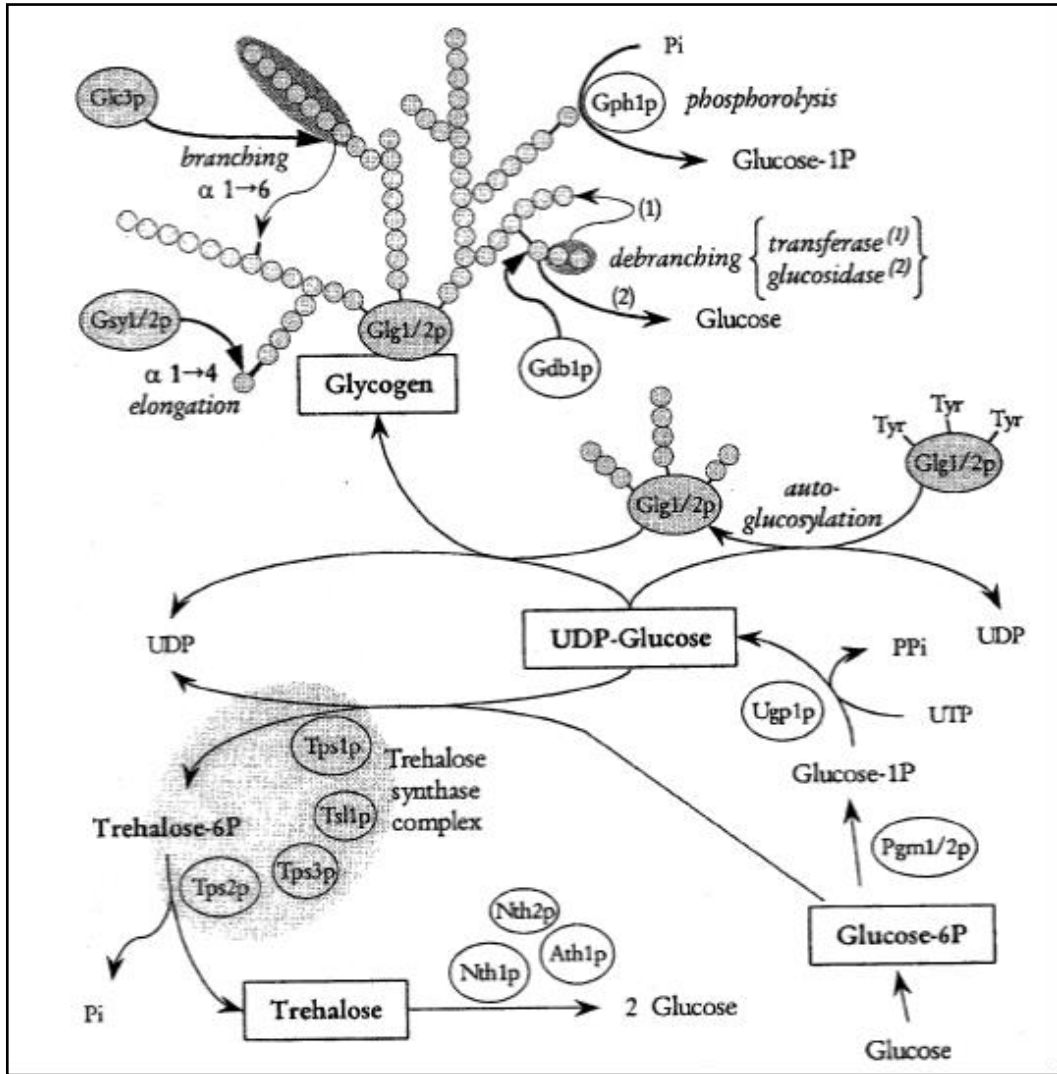
Şekil 2.5. *S. cerevisiae*'da makrotofajinin aşamaları (Delarmo-Axelford ve ark. 2015).

2.5. *S. cerevisiae*'da Trehaloz Metabolizması ve Metabolik Önemi

Tomurcuklanan maya *Saccharomyces cerevisiae*'da glikojen ve trehaloz olmak üzere iki tip depo karbonhidratı bulunur. Glikojen, tekrarlı glukoz birimlerinden meydana gelir. Glukoz düz zincir olarak alfa 1-4 glikozidik bağ ile polimer oluşturur. Nadir olarak bu linner polimerde alfa 1-6 glikozidik bağ ile dallanma da olabilir. Trehaloz ise iki glukoz molekülünün alfa 1-1 glikozidik bağ ile bağlanması ile oluşan bir disakkarittir. Glikojen ve trehaloz seviyeleri hücre içinde üreme aşamalarına göre farklılık gösterir. Glikojen normal üreme koşullarında sentezlenip depo edilirken trehalzo daha çok besin açlığı, ısı şoku gibi stres koşullarında daha fazla sentezlenerek depo edilir. (Francois ve Parrou 2001). Hem glikojen biyosentezi ve hem de trehalaz biyosentezi glikolize bağlı olan biyosentez yollarıdır (Şekil 2.7). Hücre içine alınan glukoz heksikinaz/glukokinaz ile glukoz 6-fosfata dönüşür. Glukoz 6 fosfat hem glikojen ve hem de trehaloz biyosentezi için önemli substratlardan birisidir. Glikojen ve trehaloz biyosentezi özellikle glukoz 6- fosfat ortak substrat havuzundan sentezlendikleri için birbiri ile bağlantılıdır (Şekil 2.7). Glikojen sentezi çok sayıda enzim gerektiren bir

biyosentez sürecidir. Bu tez çalışmasında glikojen sentezi incelenmediği için bu yolakla ilgili literatür verilmemiştir.

Trehaloz biyosentezi henm glikolitik yolak üzerine olan düzenleyici etkisi ve hem de stres metaboliti olduğundan enzimolojisi ve genetiği çok iyi aydınlatılmış bir metabolik yolaktır (Francois ve Parrou 2001). Trehaloz, trehaloz fosfat sentaz (kısaca TPS) enzim kompleksi tarafından iki kademedede sentezlenir. Bu enzim kompleksi dört alt birimden oluşur. Bunlar TPS1, TPS2, TPS3 ve TSL alt birimleridir (Bell ve ark. 1998).. Bu alt birimlerin özellikleri Çizelge 2.1’de verilmiştir. Trehaloz fosfat sentaz enzim kompleksi önemli alt birimlerden birisi Tps1’dir. Trehaloz metabolizmasında önemli diğer enzimler ise trehaloz molekülünü hidroliz eden trehalaz enzimleridir. Trehalazlar nötr (Neutral Trehalase :NTH) ve asidik trehalaz (Acidic Tehalase: ATH) olarak iki farklı tipte bulunurlar. Sitoplazmada trehaloz döngüsü için gerekli olan trehalaz Nth1’dir. Asidik trehalaz vokuolde ve hücre dışında bulunmaktadır (Kopp ve ark. 1993, Destruelle ve ark. 1995). Trehaloz fosfat sentaz ve trehalaz birbirine zıt yönde çalışan iki enzimdir. Trehaloz biyosentezi sırasında ara metabolit olarak oluşan trehaloz -6-fosfat hegzokinaz enzimi inhibitörüdür. Hekzokinaza etki ederek hücreye glukoz girişini kontrol eder (Blazquez ve ark. 1993).



Şekil 2.6. *S. cerevisiae*'de glikojen ve trehaloz sentez metabolizması yolu (Francois ve Parrou 2001).

Çizelge 2.1. Trehaloz metabolizması Enzimleri

Gen	Ürünü	Fonksiyonu
TPS1	Trehaloz-6-P sentaz	Trehaloz sentezi
TPS2	Trehaloz-6-P fosfotaz	Trehaloz-6-P defosforilasyonu
TSL1 (TPS3)	Düzenleyici alt birimler	Trehaloz sentaz kompleksinin stabilizesi
NTH1	Nötral, sitosolik trehalaz	Stoplazmik trehalozun hidrolizi
ATH1	Asidik, vakuolar trehalaz	Vakuolar ve hücre dışında bulunan trehalozun hidrolizi

2.6. *S. cerevisiae*'da *TPS1* ve *NTH1* Genleri ve Kontrol Mekanizmaları

TPS1 (Trehalose 6-Phosphate Synthase 1) geni *S. cerevisiae*'da II kromozomda bulunan ve intron içermeyen bir gendir (Bell ve ark. 1992). TPS1 geni transkripsiyonu çok sayıda transkripsiyon faktörü tarafından kontrol edilmektedir. Bu faktörlerden en önemlileri ise genel strese yanıt olarak aktive edilen Msn2p ve Msn4p transkripsiyon faktörleri kompleksidir (Msn2/4). *TPS1* geni promotoruna bağlanan işlevsel olarak karakterize edilmiş transkripsiyon faktörleri listesi tezin sonuçlar bölümünde ayrıca verilmiştir ve online kaynak olarak YEASTRACT'dan sağlanmaktadır (Anonim 2020b). Genin kodlama bölgesi 1485 nükleotid olup 495 amino asit uzunluğunda tek polipeptid kodlar. TPS transkripsiyonu sıcaklık stresi, oksidatif stres gibi çevresel faktörlerle aktive edildiği gibi üreme aşamasına göre de transkripsiyonu kontrol edilir (Francois ve Parrou 2001). *TPS1* geni delesyonu bazı maya suşlarında letaldir. *Dtps1* mutanı maya suşları glukozda üreyemez. Bu nedenle bu mutant suşların üremesinde galaktoz, gliserol ve laktat gibi karbon kaynağı kullanılmak zorundadır (Thevelein ve Hohmann 1995). Δ *tps1* mutanı maya suşu galaktoz üreme ortamından alınıp glukoz ortamına aktarıldığında üremenin hemen durduğu, sitoplazmada hızlı şekilde ATP seviyesinin düştüğü görülmüştür. Glukoz toksisitesi denilen bu durumun hücrede

trehaloz 6-fosfat sentezlenemediği için heksokinazın aşırı aktivitesi sonucu kontrolsüz glukoz fosforilasyonundan kaynaklandığı bulunmuştur (Thevelein ve Hohmann 1995, Blazquez ve ark. 1993,).

NTH1 geni ise hücrede biriken trehalozun stres sonrası hızlı şekilde tekrar glukoz hidrolizi için gerekli enzim olan nötral trehalazı kodlar. Bu gen mayada IV kromozomda bulunur ve intron içermez. Kodlama bölgesi 2256 nükleotid olup 751 amino asit uzunluğunda bir enzim olan nötral trehalazı kodlar. *NTH1* geni transkripsiyonu da farklı faktörler tarafından kontrol edilmekle birlikte bu genin ifadesi daha çok translasyon seviyesinde trehalaz enziminin fosforilasyonu-defosforilasyonu ile kontrol edilir. Fosfoprotein olan Nth1p nin aktivitesi metabolik sinyallere göre Protein Kinaz A ile kontrol edilir (App ve Holzer 1989). *NTH1* geni transkripsiyonu da genel stres transkripsiyon faktörleri Msn2/4 ile kontrol edilmektedir. Bu genin kontrol bölgesinde de Stres Yanıt Elementi (Stress Response Element: STRE) sekansı bulunmaktadır ve bu sekansın da *NTH1* transkripsiyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir (Nwaka ve ark. 1995, Nwaka ve Holzer 1998).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Araştırmada Kullanılan Maya Suşları ve Üreme Koşulları

Araştırmada kullanılan *S cerevisiae* suşları Çizelge 3.1’de verildi. Bu maya suşlarından laboratuvar kod’u olarak YST124, YST125 ve YST265 no’lu suşlar EUROSCARF maya koleksiyonundan satın alındı (Brachman ve ark. 1998). YST246 (Σ 1278b) ve YST249 (FY2) suşları Prof.Dr. P.J. Farabaugh’ın (University of Maryland) koleksiyonundan sağlandı. Sigma1278b suşu yapısında bulunan *RAS2* geni ve diğer mutasyonlar dolayısı ile kolay psödohif oluşturma özelliğine sahiptir (Jin ve ark. 2008). FY2 suşu ise minimal üreme ortamında herhangi bir amino asit ilavesi gerektirmeden üreme özelliği dolayısıyla kullanıldı. YST124, YST125 (diploid), ve YST265 kodlu maya suşlarının genetik özellikleri daha önce verilen kaynakda açıklanmıştır (Brachmann ve ark. 1998).

Farklı kaynaklardan sağlanan maya suşları öncelikle zengin besiyeri ortamı olarak kullanılan YPD (Yeast Extract, Pepton, Dextrose) petrilerinde çizgi ekimi yapılarak 30 C’de inkübatörde 24-48 saat üretilerek tekrar canlandırıldı. Bu maya suşları uzun süreli depolama için petrilerde üremeden sonra steril kürdan ile bir miktar alınarak steril 1 ml %20’lik gliserol çözeltisinde süspanse edilip -80 C’de derin dondurucuda depo edildi. YPD petrilerindeki maya suşları da rutin laboratuvar deneylerinde kullanılmak üzere +4 C’de buzdolabında depo edildi. Maya suşlarının üretilmesinde zengin besiyeri veya minimal üreme ortamı olarak kullanılan petri ve sıvı besiyeri içerikleri ve bu besiyerlerinin hazırlanması standardize edilmiş yöntemler olup Rose ve ark. (1990) tarafından açıklandığı şekilde yapıldı. Araştırma kullanılan çözeltiler ve maya üretiminde kullanılan besiyerlerinin hazırlanması Ek 1’de verildi. Maya suşları sıvı kültürlerde standart koşullar olan 30 C’de, 140 dev/dk hızda karıştırmalı inkübatörde üretildi. Petri kültürlerinin üretilmesi ise standart olarak 30 C’de inkübatörde üreme görülünceye kadar inkübe edilerek yapıldı.

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

<i>ST Lab Kodu</i>	Genotipi ve ilgili mutasyonlar
YST124	MATa, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0 (haploid yaban tip)
YST125	MATa/α, his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0 (diploid yaban tip)
YST246	MATa, ura3-52, (Σ1278b)
YST249	MATα, ura3-52, (FY2)
YST265	MATa, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0 YBR083w::kanMX4 (Δtec1 mutant suşu)

3.2. *TPS1-LacZ* ve *NTH1-LacZ* Raportör Vektörünün Yapısı ve Transformasyonu

Araştırmada farklı koşulların *TPS1* ve *NTH1* gen ifadelerine etkilerini incelemek için bu genlerin *LacZ* raportör füzyonları kullanıldı. Her iki gen füzyonu da daha önceden *YE_p* plazmiti (2 mikron-*URA3*) üzerine klonlanmıştır ve Prof.Dr. Jean François tarafından araştırmalarımız için daha önceden sağlanmıştır. *Nth1-lacZ* gen füzyonunun içeren plazmit’de *NTH1* geni promotor bölgesinin ilk 770 bç uzunluktaki bölgesi bulunmaktadır (Parrou ve ark. 1997). Bu plazmitteki *NTH1* geni promotor bölgesinin *NTH1* geni transkripsiyonu için gerekli olan bütün kontrol bölgelerini içerdiği bilinmektedir (Parrou ve ark. 1997). *TPS1* geni de *LacZ* füzyonu olarak aynı yapıdaki plazmit üzerine klonlanmıştır. Bu gen füzyonunda *TPS1* geninin 1 Kbç’lik promotor bölgesi *LacZ* genine gen füzyonu olarak kullanılmıştır. Hem *NTH1-LacZ* ve hem de *TPS1-LacZ* raportör genlerinde gen ifadesinin kontrolü için gerekli olan sekansların bulunduğu daha önceden rapor edilmiştir (Parrou ve ark. 1997).

Replikasyon orijini ve markör gen olarak 2 mikron-*URA3* kasetini içeren *YE_p* vektörlerinin transformasyonla aktarıldıkları maya suşlarında seçici üreme ortamında stabil olarak buldukları da daha önce gösterilmiştir (Farabaugh ve ark. 1989).

TPS1-LacZ ve *NTH1-LacZ* raportör genlerini içeren 2 mikron-*URA3* tipi YE_p plazmitleri ilgili maya suşlarına daha önce açıklanan lityum asetat-polietilen glikol metodu kullanılarak transform edildi (Gietz ve ark. 1995). Transformasyon için önce ilgili maya suşları standart koşullarda YPD üreme ortamında logaritmik aşamaya kadar üretildi. Bu aşamada santrifüjde çöktürülen maya suşları önce steril saf su ile suspanse edilerek tekrar çöktürüldü. Daha sonra ise steril 0.1M lityum asetat ile suspanse edilerek tekrar çöktürüldü. Maya pelletleri bu kez 500 µl 0.1M Lityum asetat'da suspane edilerek stok maya süspansiyonları hazırlandı. Bu stok maya süspansiyonlarından transformasyon tüplerine 50'şer µl alınarak aşağıda verilen sırada diğer çözeltiler ve DNA/plazmit örnekleri ilave edildi.

240 µl PEG (%50'lik stoktan)

36 µl 1 M LiAOc (taze stok)

6 µl denatüre Herring sperm DNA'sı

4-5 µl (1-2 µg) plazmid DNA'sı

64 µl dsH₂O

Transformasyon karışımının toplam hacmi 350 µl olacak şekilde su eklendi.

Transformasyon karışımı homojen oluncaya kadar vorteksle karıştırıldı. Bu karışım önce 30 C'de 30 dk, sonra 42 C'de 20 dk inkübe edildi. Sıcaklık inkübasyonlarından sonra transformasyon karışımı 12500 rpm'de 30 sn çöktürüldü. Çöktürülen maya hücreleri 500 µl saf suda suspanse edildi. Bu maya süspansiyonlarından seçici maya petrilere (Sc-URA%2 dekstroz veya YNB+%2 dekstroz) steril cam baget ile 100 µl yayma ekimi yapıldı. Petrilere transformantların üremesi ve koloni oluşumu için 30 C'de inkübatörde koloniler belirgin oluncaya kadar (3-4 gün) inkübe edildi. Transformant koloniler 1-2 mm çapına kadar üredikten sonra tekrar bu koloniler alınarak seçici petrilere 0.5 cm ebatlarında olacak şekilde pasajlar yapıldı. Bu pasajlar da 30 c'de 2-3 gün inkübe edildi. Transformant petrilere deneyler süresince +4 C'de buz dolabında depo edildi.

3.3. *S. cerevisiae*'da Hücresel Farklılaşmaların Uyarılması

TPS1 ve *NTH1* raportör gen füzyonlarını içeren maya transformantlarında farklılaşma süreçleri üreme ortamlarının değiştirilmesi ile sağlandı. Sporulasyonu uyararak için YST125 (diploid suş) transformantları logaritmik aşamaya kadar 10 mL Sc-Ura+%2 dekstroz ortamında üretildi. Bu maya hücrelerinden 5 mL alınarak santrifüjde çöktürüldü (1600 rpm/ 5 dk) ve 10 mL steril distile suda süspanse edilerek yıkandı ve tekrar aynı koşullarda çöktürüldü. Sıvı faz atıldı, maya pelletleri bu kez 5 mL sporulasyon ortamında süspanse edildi ve standart şartlarda 16-18 saat üretildi (Rose ve ark. 1990). Üreme süresi sonunda maya hücreleri masa üstü santrifüjde 1600 rpm/5 dk çöktürüldü. Sıvı faz atıldı. Maya pelletleri 1 mL steril saf suda süspanse edilip mikrofüj tüplerine alındı ve tekrar mikrofüjde çöktürüldü. Sıvı faz atıldı. Maya pelletleri bu kez 200 µl β-galaktozidaz lizis tampon çözeltisinde süspanse edildi. Bu maya örnekleri beta-galaktozidaz aktiviteleri ölçülünceye kadar -80 C'de depo edildi. Beta-galaktozidaz aktiviteleri bölüm 3.4'de verildiği şekilde tayin edildi.

Psödohifsel üremenin aktivasyonu için *TPS1* ve *NTH1* transformantı maya hücreleri yukarıda verildiği şekilde hazırlanarak logaritmik aşama kültürleri elde edildi. Bu aşamada maya kültürlerinin 5 mL alınarak çöktürüldü ve steril saf ile yıkandı ve tekrar çöktürüldü. Sıvı faz atıldı. Maya pelletleri bu kez psödohifsel üremeyi aktive etmek için 5 ml SLAD ortamında süspanse edilerek standart şartlarda 16-18 saat üremeye bırakıldı. Üreme süresi sonunda çöktürülen maya hücreleri yukarıda açıklandığı şekilde β-galaktozidaz aktiviteleri tayini için hazırlanarak -80 C'de depo edildi.

Apoptoz koşullarını oluşturmak için yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanan transformantların 5 ml'si alınarak bu maya kültürlerine son konsantrasyonu 60 mM olacak şekilde asetik asit ilave edilmiştir (Ludovico ve ark. 2001). Otofaji koşullarını aktive etmek için ise yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanan maya kültürlerinden 5 ml alınarak son konsantrasyonu 8 mM olacak şekilde kafein ilave edildi (Kuranda ve ark. 2006). Apotoz ve otofaji koşulları uyarılmış maya transformantları da standart üreme koşullarında 5-6 saat üretildi. Üreme süreleri sonunda çöktürülen maya hücreleri

yukarıda açıklandığı şekilde beta-galaktozidaz aktivitelerinin tayini için hazırlandı ve -80 C'de depo edildi.

3.4. Raportör Genlerde Promotor Aktivitesi Tayini ve Promotor Analizleri

Yukarıda açıklandığı şekilde farklı üreme koşullarında üretilen maya transformantlarında gen füzyonlarından yapılan transkripsiyonun kantitatif tayini bu gen füzyonlarından ekspres edilen mRNA'dan sentezlenen β -galaktozidaz aktiviteleri ölçülerek belirlendi.

Farklı üreme koşullarında üretilip -80 C'de depo edilen maya süspansiyonları +4 C'de bekletilere çözümlereyi sağlandı. Bu süspansiyonlara maya lizatleri elde etmek için daha önce açıklanan şekilde SDS ve kloroform ile permeabilized edildi (Rose ve ark 1990). β -galaktozidaz aktivitesi tayinleri her transformants için 3'lü olarak yapıldı. Bunun için deney tüplerine önce 980 μ L Z-tampon çözeltisi alındı ve 20 μ L hücre lizatı eklendi. Lizat karışım 30 C'de su banyosunda 3 dk bekletildi ve substrat olan ONPG'den 200 μ L ilave edildi. Reaksiyon başlama zamanı kayıt edildi. Deney tüplerinde açık sarı renk gelişinceye kadar beklendi. Bu aşamada zaman geçen zaman kayıt edilerek reaksiyon ortamına 500 μ L 1 M Na₂CO₃ ilave edildi. Deney tüpleri masa Çözeltilerdeki lizat parçalarını çöktürmek için deney tüpleri 5 dk masa üstü santrifüjde 1600 rpm'de çöktürüldü. Sarı renkli sıvı fazın absorbansı spektrofotometrede 420 nm'de lizat içermeyen kontrol sıvıya karşı ölçülerek kayıt edildi. Maya lizatlarındaki çözümlü protein konsantrasyonu ise daha önce açıklanan şekilde Lowry testi ile tayin edildi (Lowry ve ark. 1951). Bunun için test tüplerine 180 μ L steril saf su, 20 μ L hücre lizatı alındı. Bu lizat karışımına taze hazırlanmış 1 mL Lowry-C çözeltisi ilave edildi, karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dk beklendi. Süre sonunda bu tüplere 1N folin çözeltisinden 100 μ L ilave edildi ve karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. Daha sonra deney tüpleri masaüstü santrifüjde 1600 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çözeltilerdeki maya lizatı kalıntıları çöktürüldü. Sıvı fazın absorbansı spektrofotometrede 750 nm'de okundu. Gen füzyonlarından yapılan ekspresyonla sentezlenen β -galaktozidaz aktiviteleri ek-2'de verildiği şekilde hesaplandı. β -galaktozida ünitesi= nmONPG/dk/mg protein olarak verildi.

Deneyler 2'şerli olarak ve en az 2 tekrarlı olarak yapıldı. β -galaktozidaz aktiviteleri de 3'lü olarak yapıldı. Sonuçlar bölümünde verilen β -galaktozidaz aktiviteleri en az 12 β -galaktozidaz aktivitesinin ortalaması olup standart sapma değerleri de ilgili çizelgelerde verilmiştir.

TPS1 ve *NTH1* genleri promotor bölgelerine bağlandığı daha önce rapor edilen transkripsiyon faktörleri ise YEASTRACT veri tabanı kullanılarak tayin edildi (Anonim 2020b).

4- BULGULAR

4.1. Psödohifsel Üremenin *TPS1* ve *NTH1* Transkripsiyonuna Etkileri

S. cerevisiae'da gen ifadesi farklı suşlara göre farklılıklar gösterebilmektedir. Maya suşları arasında gen varyantlarının bulunması incelenen genlerin ifadelerinde de suşlara göre farklılıklar gösterir. SGD'de yayımlanan maya varyant veri tabanında maya araştırmalarında kullanılan 25 farklı maya suşunun tüm genom sekansı yayınlanmıştır. Genomu yayımlanan *S. cerevisiae* 25 farklı laboratuvar suşunda farklı genlerde transkriptomu etkileyecek farklılar bulunmaktadır (Anonim 2020a). Bu tez araştırmasında farklı genetik kökene bağlı maya suşları kullanıldığından öncelikle bu suşlarda normal üreme koşullarında *Tps1-LacZ* ve *Nth1-LacZ* raportör gen füzyonlarından yapılan gen ifadesi seviyeleri karşılaştırmalı olarak analiz edildi.

Araştırmalarda standart haploid maya suşu olarak kullanılan ve lab. kodu'olarak YST124 olarak adlandırdığımız BY4741 maya suşunda normal koşullarda *Tps1-LacZ* ve *Nth1-LacZ* gen füzyonlarından yapılan transkript 5922 ve 3497 ünite olarak tayin edildi. Ancak bu gen füzyonlarından yapılan transkript seviyelerinin diploid maya suşunda *TPS1* için yaklaşık %50, *NTH1* için de %25 kadar azaldığı görüldü (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *TPS1* ve *NTH1* genlerinin farklı maya suşlarında transkripsiyon seviyeleri.

Raporör genler	Maya Suşları ve β -Galaktozidaz Aktiviteleri (\pm SD)*		
	YST124 (Haploid)	YST125 (Diploid)	YST246 (Σ 1278b suşu)
<i>TPS1-LacZ</i>	5922 \pm 307	3293 \pm 256	2197 \pm 261
<i>NTH1-LacZ</i>	3497 \pm 214**	2571 \pm 137	2443 \pm 178

*SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir. **Bu sonuçlar Turan 2011'den alınmıştır.

Genomunda *RAS2* geni ve diğer bazı mutasyonlar dolayısıyla kolay psödohif oluşturan sigma suşunda da haploid olmasına rağmen BY4741 suşuna göre daha düşük seviyelerde *Tps1-LacZ* ve *Nth1-LacZ* transkript seviyeleri belirlendi. Bu sonuçlar *TPS1* ve *NTH1* gen ifadelerinde kullanılan maya suşlarına göre oldukça değişken olabileceğini de göstermektedir.

Bu temel sonuçlardan sonra psödohifsel üremenin *Tps1-LacZ* ve *Nth1-LacZ* gen füzyonlarından yapılan transkript miktarına etkileri incelendi. Bunun için logaritmik aşamaya kadar üretilen sigma 1278b transformantları iki kısma bölünerek bir kısmı çok az amonyum içeren minimal üreme ortamına (SLAD) aktarıldı ve 16-18 saat bu üreme ortamında standart koşullarda üretildi. Elde edilen sonuçlar hem *TPS1* ve hem de *NTH1* geni ifadesinin psödohifsel üreme koşullarında aktive edildiğini gösterdi (Çizelge 4.2). Psödohifsel üreme koşullarında *Tps1-LacZ* gen füzyonunda transkripsiyonun yaklaşık 3.6-kat, *Nth1-LacZ* gen füzyonu transkripsiyonun da ise yaklaşık 4-kat kadar aktivasyon olduğu bulundu (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Psödohifsel üremenin *TPS1* ve *NTH1* genlerinde transkripsiyona etkileri.

Raportör genler	Üreme ortamları ve β -Galaktozidaz Aktiviteleri*(\pm SD)	
	Normal ortam	SLAD Ortamı
<i>TPS1-LacZ</i>	2197 \pm 261	7862 \pm 480
<i>NTH1-LacZ</i>	2443 \pm 178	10981 \pm 884

4.2. Sporulasyonun Aktive Edilmesinin *TPS1* ve *NTH1* Transkripsiyonuna Etkileri

Sporulasyon diploid maya hücrelerinin bazı stres koşullarında mayoz bölünme ile metabolik olarak latent fakat strese dayanıklı haploid sporlar oluşturmasıdır. *S. cerevisiae*'da sporulasyon minimal sporulasyon ortamında 24 saate tamamlanmaktadır. Fakat her maya suşunun sporulasyon etkinliği de farklıdır. Bu çalışmada sporulasyon sinyalinin *TPS1* ve *NTH1* gen ifadelerine etkileri diploid maya suşunda incelendi.

Çizelge 4.3. Sporulasyonun *TPS1* ve *NTH1* genlerinde transkripsiyona etkileri.

Raportör genler	Üreme ortamları ve β -Galaktozidaz Aktiviteleri*(\pm SD)	
	Normal ortam	Sporulasyon ortamı
<i>TPS1</i> -LacZ	3293 \pm 256	2940 \pm 91
<i>NTH1</i> -LacZ	2571 \pm 137	1720 \pm 63

Diploid maya suşunda sporulasyon koşullarında *TPS1* ve *NTH1* genleri transkripsiyon seviyelerinde önemli bir değişiklik olmadığı bulundu (Çizelge 4.3). *TPS1* gen ekspresyon seviyesinde düşük seviyede bir azalma olsa da bunun istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü. *NTH1* gen ifadesinde ise sporulasyon koşullarında önemli seviyede azalma olduğu, gen ifadesinin 2571 üniteden 1720 üniteye düştüğü görülmektedir (Çizelge 4.3).

4.3. Apoptoz Koşullarının *TPS1* ve *NTH1* Transkripsiyonuna Etkileri

S. cerevisiae FY2 maya suşu sadece minimal ortamda üreyebilmektedirler. Bu nedenle apoptoz koşullarını oluşturmak için de bu maya suşu kullanıldı. Apoptoz koşullarının *TPS1* ve *NTH1* geni ifadesine etkilerini incelemek için *TPS1*-LacZ ve *NTH1*-LacZ raportör gen füzyonlarını içeren plazmitler yaban tip suş olarak FY2 maya suşuna transformasyon ile aktarıldı. Transformant maya suşları minimal ortamda (YNB+%2 glukoz) üretildi ve logaritmik fazda bu maya kültürlerin bir bölümüne apoptoz koşullarını aktive etmek için 60 mM (pH=3) olacak şekilde asetik asit ilave edildi. *TPS1* ve *NTH1* gen ifadeleri normal ve apoptotik şartlarda karşılaştırıldığında her iki gen ifadesi seviyesinde de önemli seviyede baskılanma olduğu bulundu (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Apoptoz aktivasyonunun *TPS1* ve *NTH1*'da transkripsiyona etkileri.

Raportör genler	Üreme ortamları ve β -Galaktozidaz Aktiviteleri*(\pm SD)	
	Normal ortam	Apoptoz Aktivasyonu
<i>TPS1</i> -LacZ	6583 \pm 276	2629 \pm 122
<i>NTH1</i> -LacZ	6862 \pm 212	3149 \pm 511

Apoptoz koşulları etkisiyle *TPS1* ve *NTH1* gen ifadelerinde en az 2-kat kadar baskılanma olduğu tayin edildi (Çizelge 4.4).

4.4. Otofaji Koşullarının *TPS1* ve *NTH1* Transkripsiyonuna Etkileri

TPS1 ve *NTH1* gen ifadelerine otofaji koşullarının etkisini incelemek için de *S. cerevisiae* FY2 suşu kullanıldı. Bu maya suşuna transformasyonla aktarılan *TPS1*-LacZ ve *NTH1*-LacZ raportör genlerinin normal koşullarda ve otofaji koşullarında gen ifade seviyeleri tayin edildi. Otofaji koşullarını uyurmak için hem uzun süreli azot açlığı ve hem de TOR kinaz inhibitörü olan kafein kullanıldı.

Otofaji koşullarının *TPS1* gen ifadesinde düşük seviyede aktivasyona yol açtığı bulundu (Çizelge 4.5). *TPS1* gen ifadesinde azot açlığında %18, kafein etkisi ile oluşan otofaji koşulunda ise %36'lık bir artış görüldü. Otofaji koşullarının *NTH1* geni ifadesine etkisi ise daha yüksek düzeyde gerçekleştiği bulundu. Normal ortam koşullarında yaklaşık 6800 ünite olan *NTH1* transkripsiyonunun otofaji ve apoptoz uyarıldığında yaklaşık 2-kat artarak 12000-14000 ünite gibi yüksek seviyelerde gerçekleştiği bulundu (Çizelge 4.5). Bu sonuçlar apoptoz koşullarından farklı olarak *TPS1* ve *NTH1* gen ifadelerinin otofaji koşullarında farklı seviyelerde de olsa aktive edildiğini göstermektedir.

Çizelge 4.5. Genel otofajinin FY2 suşunda *TPS1* ve *NTH1* genlerinde transkripsiyona etkileri.

Raportör genler	Üreme ortamları ve β -Galaktozidaz Aktiviteleri*(\pm SD)		
	Normal ortam	Otofaji aktivasyonu (azot açlığı 18 saat)	Otofaji aktivasyonu (8 mM Kafein)
<i>TPS1-LacZ</i>	6583 \pm 276	8957 \pm 406	7955 \pm 395
<i>NTH1-LacZ</i>	6862 \pm 212	14172 \pm 362	12482 \pm 70

4.5. Tec1p'nin *TPS1* ve *NTH1* Genleri Transkripsiyonuna Etkileri

Transkripsiyon faktörü Tec1p psödohifsel üreme için gerekli olan genlerin başlıca aktivatörlerinden birisidir. *TPS1* ve *NTH1* genlerinde transkripsiyonun Tec1p ile kontrol edilip edilmediği de test edildi. Bunun için BY4741 (YST124) ile izogenik olan fakat *TEC1* geni delesyonla silinmiş olan mutant suş kullanıldı. Normal ortam üreme koşullarında $\Delta tec1$ mutant suşunda *TPS1* geni ekspresyon seviyesinin yaklaşık olarak yaban tip seviyesinde gerçekleştiği görüldü (Çizelge 4.6). Bu mutant suşa azot açlığı uygulandığında *TPS1* gen ekspresyonu seviyesinde herhangi bir değişiklik olmadığı görüldü. Bu sonuçlar Tec1p'nin analiz edilen koşullarda *TPS1* geni transkripsiyonunda işlevi olmadığını öne sürmektedir.

Çizelge 4.6. Tec1p'nin *TPS1* ve *NTH1*'da transkripsiyona etkileri.

Raportör genler	Üreme ortamı ve β -Galaktozidaz Aktiviteleri*(\pm SD)		
	Normal ortam	Azot açlığı (6 saat)	Azot açlığı (20 saat)
<i>TPS1-LacZ</i>	6696 \pm 390	6472 \pm 71	6580 \pm 842
<i>NTH1-LacZ</i>	4306 \pm 115	4633 \pm 390	6086 \pm 250

Ancak, *NTH1* geni transkripsiyonunda Δ tec1 mutant suşunda yaban tip suşa göre düşük seviyede artış olduğu (%20 kadar), uzun süreli azot açlığı şartlarında da *NTH1* transkripsiyonunda 4306 üniteden 6086 üniteye artış olduğu görülmektedir (Çizelge 4.6). Bu sonuç Tec1p'nin uzun süreli azot açlığı koşullarında direkt veya dolaylı olarak *NTH1* geni transkripsiyonunda işlevi olduğunu göstermektedir.

4.6. *TPS1* ve *NTH1* Geni Promotor Yapılarının Otofaji Faktörleri İçin Analizi

Genel otofaji koşullarında otofaji sürecinin kontrol edilmesi ve otofagozom oluşumunda yer alan çok sayıda genin transkripsiyonu aktive edilmektedir. Otofaji sürecinde işlevi olan transkripsiyon faktörleri de belirlenmiştir (Delorme-Axford ve Klionsky 2018). Bu transkripsiyon faktörlerinin listesi çizelge 4.7'de verildi. Bu faktörlerden özellikle Gcn4p, Gln3/Gat1 ve Ume6p'nin otofaji sürecinde işlevi olan birçok ATG geninin transkripsiyonel kontrolünde işlevi olan ana faktörler olduğu rapor edilmiştir (Delorme-Axford ve Klionsky 2018). Otofaji koşullarında *TPS1* ve *NTH1* gen ifadesindeki aktivasyonun bu faktörler bağlı olabileceği düşünülerek *NTH1* ve *TPS1* genlerinin promotor bölgelerinde potansiyel transkripsiyon faktörü bağlanma sekansları da YEASTRACT veri tabanında incelendi (Anonim 2020b).

Çizelge 4.7. Otofaji koşullarında işlevi olan Transkripsiyon faktörleri ve bağlanma sekansları. Bağlanma sekansları YEASTRACT veritabanından derlenmiştir ve 5'-3' yönünde verilmiştir. (W=A veya T, N: Herhangi bir nükleotid)

Transkripsiyon faktörü	Promotorda bağlanma konsensüs dizisi
Gcn4p	TGACTC, TGACTGA,
Gln3p/Gat1p	GATAAG, GATTAG
Sfl1p	AGAANTTCC
Fhl1p	GACGCA
Fyv5/Kdm4	TWAGGG
Rph1	tWAGGGGt
YAP1	TTACTAA
Ume6	TAGCCGCCGA, TCGGCGGCT,
Msn2/Msn4	CCCCT, AGGGG

YEASTRACT veri tabanında yapılan incelemede *TPS1* ve *NTH1* geni promotor bölgelerinde bu genlerin transkripsiyonel kontrolü için potansiyel olarak çok sayıda faktör bağlanma sekansı olduğu görülmektedir (Anonim 2020b). *TPS1* geni promotor bölgesinde bağlanma sekansı olan transkripsiyon faktörleri Çizelge 4.8’de verilmiştir. YEASTRACT incelemesinde *TPS1* promotoruna bağlandığı bilinen faktörlere göre inceleme yapılmıştır.

Çizelge 4.8. *TPS1* promotorunda potansiyel bağlanma sekansları olan transkripsiyon faktörleri (Anonim 2020b)

Gen adı	Transkripsiyon faktörleri/Rapor edilen çalışma için referans linki	
<u>YBR126C/TPS1</u>	<u>Aft1p - Reference</u> <u>Aft2p - Reference</u> <u>Arr1p - Reference</u> <u>Ash1p - Reference</u> <u>Bas1p - Reference</u> <u>Cbf1p - Reference</u> <u>Cin5p - Reference</u> <u>Crz1p - Reference</u> <u>Cst6p - Reference</u> <u>Ert1p - Reference</u> <u>Fhl1p - Reference</u> <u>Fkh1p - Reference</u> <u>Flo8p - Reference</u> <u>Gal4p - Reference</u> <u>Gat1p - Reference</u> <u>Gcn4p - Reference</u> <u>Gcr2p - Reference</u> <u>Hms1p - Reference</u> <u>Hsf1p - Reference</u> <u>Mcm1p - Reference</u> <u>Met28p - Reference</u> <u>Met31p - Reference</u> <u>Met32p - Reference</u> <u>Mga2p - Reference</u> <u>Mig1p - Reference</u>	<u>Msn1p - Reference</u> <u>Msn2p - Reference</u> <u>Msn4p - Reference</u> <u>Oaf1p - Reference</u> <u>Pdr1p - Reference</u> <u>Pdr3p - Reference</u> <u>Pip2p - Reference</u> <u>Rap1p - Reference</u> <u>Rgm1p - Reference</u> <u>Rlm1p - Reference</u> <u>Rpn4p - Reference</u> <u>Skn7p - Reference</u> <u>Sok2p - Reference</u> <u>Spt23p - Reference</u> <u>Stb3p - Reference</u> <u>Stb5p - Reference</u> <u>Stp1p - Reference</u> <u>Sum1p - Reference</u> <u>Tye7p - Reference</u> <u>Wtm1p - Reference</u> <u>Wtm2p - Reference</u> <u>YGR067C - Reference</u> <u>Yap1p - Reference</u> <u>Yap7p - Reference</u> <u>Yrr1p - Reference</u>

Çizelge 4.8’de verilen sonuçlardan da görüldüğü gibi *TPS1* promotor bölgesi otofaji koşullarında işlevi olduğu rapor edilen çok sayıda transkripsiyon faktörlerinden Gcn4p, Fhl1p, Gln3/Gat1p, Gcn4p, Msn2/4p ve Yap1p için işlevsel sekanslar içermektedir.

Bu transkripsiyon faktörlerinin TPS1 geni transkripsiyonunun düzenlenmesinde işlevleri olduğu daha önce rapor edilmiştir ve çizelgedeki web linkinden incelenebilir.

Otofaji koşullarında *NTH1* transkripsiyonunun çok fazla aktive edildiği deneysel olarak bulundu (Çizelge 4.5). Otofaji kontrol eden transkripsiyon faktörlerinin *NTH1* promotor bölgesinde işlevsel olarak tanımlanmış bağlanma dizileri olup olmadığı da YEASTRACT veri tabanından incelendi. Çizelge 4.9’da verildiği gibi *NTH1* promotorunda da otofaji ile ilişkili genlerin transkripsiyonel kontrolünde işlevi olan bazı transkripsiyon faktörlerinin *NTH1* geni ifadesinde de yer aldığı görülmektedir,

Çizelge 4.9. *NTH1* promotorunda potansiyel bağlanma sekansları olan transkripsiyon faktörleri (Anonim 2020b)

Gen adı	Transkripsiyon faktörleri/Rapor edilen çalışma için referans linki
<u>YDR001C/NTH1</u>	Bas1p - Reference Cbf1p - Reference Cin5p - Reference Cst6p - Reference Dal82p - Reference Gat1p - Reference Gcn4p - Reference Gcr2p - Reference Gis1p - Reference Hap4p - Reference Hsf1p - Reference Ino2p - Reference Leu3p - Reference Mbp1p - Reference Met31p - Reference Mga2p - Reference Mig1p - Reference Mig3p - Reference Msn2p - Reference Msn4p - Reference Pdr1p - Reference Pdr3p - Reference Pho2p - Reference Rfx1p - Reference Rlm1p - Reference Rpn4p - Reference Sok2p - Reference Swi4p - Reference Yap1p - Reference Yhp1p - Reference Yrr1p - Reference

NTH1 geni ifadesini kontrol eden faktörler incelendiğinde bu faktörlerden Gcn4p, Gat1p, Yap1p ve Msn2/4p’nin bu genin transkripsiyonel regülasyonunda işlevsel olarak yer aldığı verilen kaynaklardan görülmektedir.

TPS1 ve *NTH1*’in otofaji koşullarında ATG genlerine benzer şekilde verilen transkripsiyon faktörleri tarafından kontrol edilmiş olabileceği düşünülmektedir. Bu

faktörlere ek olarak represör faktör olarak işlevi olan Sflp'nin ve otofajide özellikle ATG8'in işlevini kontrol eden UME6'nın TPS1 ve NTH1'de işlevsel olarak tanımlanmadığı görülmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

S. cerevisiae hücreleri ökaryotlarda görülen bazı hücrel gelişim ve farklılaşma süreçlerinin analizi için de model organizma olarak kullanılmaktadır (Botstein ve Fink 2011). Özellikle otofajinin moleküler bileşenleri *S. cerevisiae* mutant suşları kullanılarak Prof.Dr. Ohsumi tarafından aydınlatılmıştır (Ohsumi 2014). Benzer şekilde apoptoz gibi kompleks etkileşimler sonucu gerçekleşen programlı hücre ölümü sürecine benzer mekanizmalar *S. cerevisiae*'da da tespit edilmiştir ve kaspaz benzeri enzim olan metakaspaz 1 (MCA1) *S. cerevisiae*'da klonlanmıştır (Madeo ve ark. 1997, Strich 2015). *S. cerevisiae*'da trehaloz metabolizması hücre gelişim süreçlerinde kontrol edilen bir metabolik yolaktır. Strese karşı hıla depolanan ve strese karşı hücrel makromolekülleri koruyucu özelliği olan disakkarit trehalozun stres sonrası hücre metabolizmasının normale dönmesi için de hızla hidroliz edilmesi gerekir. Bu iki olay için yani trehaloz biyosentezi ve yıkımı için gerekli enzimler *TPS1* ve *NTH1* genleri tarafından kodlanmaktadır. Her ne kadar *TPS* enzimi çok alt birimli olsa da *TPS1* geni tarafından kodlanan Tps1p bu enzimin önemli katalitik alt birimidir (Blasquez ve ark. 1993). Bu tez araştırmasında maya hücrelerinde trehaloz dengesi için gerekli olan faktörleri kodlayan *TPS1* ve *NTH1* genleri transkripsiyonlarının psödohifsel üreme, apoptoz ve otofaji koşullarından nasıl etkilendikleri incelendi.

Yapılan incelemede her iki genin transkripsiyonunun da *S. cerevisiae* suşuna göre önemli seviyede değişiklik gösterdiği bulundu (Çizelge 4.1). Özellikle haploit ve diploit maya suşlarında görülen farklılık henüz literatürde rapor edilmemiş bir sonuç olup *TPS1* ve *NTH1* genlerinin transkripsiyonlarının hücre tipine göre de transkripsiyonlarının kontrol edildiğini göstermektedir. Bu durum bu iki genin transkripsiyonel analizi için kullanılacak *S. cerevisiae* suşunun da dikkatle tayin edilmesi gerektiğini göstermektedir

Araştırmamızda incelenen diğer hücrel farklılaşma süreci ise psödohifsel gelişimdir. Psödohifsel üremenin azot açlığı ile uyarıldığı üreme koşulunda her iki genin de transkripsiyonunun 3-4 kat aktive edildiği bulundu. Ancak bu aktivasyonun *S. cerevisiae*'da psödohifsel üreme için gerekli faktörleri aktive eden transkripsiyon faktörü Tec1'den bağımsız olduğu da görüldü (Çizelge 4.2 ve 4.6). *TPS1* ve *NTH1*

promotorlarına bağlanan transkripsiyon faktörü çeşitliği incelendiğinde bu genlerin çok sayıda transkripsiyon faktörü tarafından kontrol edildiği görülmektedir (Çizelge 4.8 ve 4.9). Bu faktörlerden birçoğunun (Msn2/4, Gcn4, Yap1 vd) genel streslere ve azot açlığına yanıt olarak hedef genlerin transkripsiyonlarını aktive ettikleri bilinmektedir (Feldman 2012). Bundan dolayı psödohifsel üreme koşullarında *TPS1* ve *NTH1* genleri transkripsiyonlarının aktivasyonlarının Tec1p'den bağımsız olarak, bu genlerin promotorlarına bağlanan çoklu transkripsiyon faktörleri ile aktive edildiği düşünülmektedir. Her iki genin transkripsiyonunun da aktive edilmesi psödohifsel üreme sürecinde trehaloz sentezi ve yıkımının eş zamanlı olarak aktive edilebileceğini düşündürmektedir. Ancak bu koşullarda in vitro olarak hem trehaloz sentaz ve hem de trehalaz enzim aktivitelerinin de tayin edilmesi gerekmektedir. Ayrıca bu koşullarda hücre içi trehalaz miktarının da tayin edilmesi gerekmektedir.

Sporulasyon *S. cerevisiae*'da çok sayıda genin aktivasyonu veya baskılanması sonucu gerçekleşen süreçtir. Araştırmamızda uygulanan sporulasyon koşullarında *TPS1* geni transkripsiyonunda önemli bir artış olmadığı, bu gen ifadesinin yaklaşık aynı seviyede kaldığı bulundu. Ancak *NTH1* geni transkripsiyonunda önemli azalma olduğu tayin edildi (Çizelge 4.3). Bu durum sporulasyon sırasında trehaloz yıkımının olmadığını daha çok sentez yönünde trehaloz metabolizmasının devam ettiğini gösterebilir. Sporulasyon süresinde hücrelerde biriken çeşitli metabolitlerden birisi de trehalozdur.

Apotoz ve otofaji de *S. cerevisiae*'da çeşitli çevresel faktörlerle aktive edilebilen hücresel süreçlerdir. Bu iki farklı süreçte *TPS1* ve *NTH1* gen ifadeleri tayin edildiğinde her iki genin transkripsiyonunun da benzerlik ve farklılar olduğu ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.5 ve 4.6). Otofaji koşullarında *TPS1* geni transkripsiyonunda düşük seviyede aktivasyon görülmektedir. *NTH1* geninde ise transkripsiyonun 2 kat aktive edildiği görülmektedir. Bu durum proteolitik bir süreç olan otofaji sürecinde trehaloz sentezinden çok trehaloz yıkımının gerçekleşmiş olabileceğini öne sürmektedir. Buna ek olarak YEASTRACT kayıtlarında yapılan incelemede otofaji sürecini başlatan ve kontrol eden *ATG* genlerinin transkripsiyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin aynı zamanda özellikle *NTH1* geni transkripsiyonunu da aktive ettiği öne sürülebilir. Bu transkripsiyon faktörleri Gcn4, Gln3/Gat1, Yap1 ve Msn2/4 gibi transkripsiyon

faktörleridir (Çizelge 4.7). Bu sonucun yani otofaji aktivasyonuna yanıt olarak hem *TPS1* ve hem de özellikle *NTH1* geni transkripsiyonunun aktive edilmesinin fizyolojik önemi ve sonuçlarının da incelenmesi gerekmektedir. Bir çeşit metabolik stres olan otofaji koşullarından dolayı sitoplazmik trehaloz biyosentezi ve yıkımı da hızlanmış olabilir. Ancak litik bir süreç olan apoptozda hücre parçalanacağı için trehaloz biyosentezi ve yıkımı da bloke edilmiş olabilir. Apoptoz sinyaline yanıt olarak *TPS1* ve *NTH1* genleri transkripsiyonları represör faktörlerince baskılanması da mümkündür. Ancak apoptoz gibi hücrenin tamamen yok edildiği programlı hücre degradasyonu süreci aktivasyonunda hem *TPS1* ve hemde *NTH1*'in transkripsiyonunda 2-kat azalma olduğu görülmektedir (Çizelge 4.4).

Tez araştırmasında uygulanan deneysel yöntemde apoptoz uyarımından 4-5 saat sonra gen füzyonlarından yapılan transkript ölçülmekte ve çok daha uzun sürede tamamlanan apoptoz sürecinin tamamlanması beklenememektedir. Normal üreme koşullarında araştırmada kullanılan plazmitler oldukça stabildir ve hücre bölünmesi sırasında hücreden kayıp olmaz. Ancak, apoptoz uyarımından belirli bir süre sonra DNA degradasyonu da başladığından raportör genleri içeren plazmitlerin de parçalanma olasılığı bulunmaktadır. Bu nedenle deney tasarımından ve apoptoz sürecinden kaynaklanan zorunluluk dolayısıyla apoptoz sinyali uyarıldıktan kısa süre sonra (4-5 saat) *TPS1* ve *NTH1* genleri transkripsiyonları ilgili gen füzyonlarından tayin edilmiştir. Trehaloz metabolizmasının trehaloz fosfat sentaz ve trehalaz enzimlerince azot açlığı ve ozmotik stres gibi koşullarda aktive edildiği daha önce yapılan çalışmalarda açıklanmıştır (Parrou ve ark. 1999, Zahringer ve ark. 2000). Genel sonuç olarak değerlendirildiğinde *NTH1* ve *TPS1* gen transkripsiyonlarının *S. cerevisiae*'da farklı hücresel gelişim veya farklılaşma süreçlerinden de farklı şekillerde etkilendiği görülmektedir.

KAYNAKLAR

Amberg, D.C., Burke, D.J., Strathern, J.N. 2005. Methods in yeast genetics. CSHL Pres. New York, USA. 230 pp

Anonim 2020a. <https://www.yeastgenome.org/> (İnceleme tarihi: 15.12.2020., 09:00)

Anonim 2020b. <http://www.euroscarf.de/index.php?name=News> (İnceleme tarihi: 15.12.2020., 09:00)

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

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

Bell, W., Klaassen, P., Ohnacker, M., Boller, T., Herweijer, M., Schoppink, P., Van der Zee, P., Wiemken, A. 1992. Characterization of the 56-kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphate synthase and cloning of its gene reveal its identity with the product of CIF1, a regulator of carbon catabolite inactivation. *Eur. J. Biochem.* 209: 951-959

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

Botstein, D., Fink, G.R. 2011. Yeast: An experimental organism for 21st century biology. *Genetics*, 189(3): 695–704.

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.

Delorme-Axford, E., Guimaraes, R.S., Reggiori, F., Klionsky, D.J. 2015. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*: an overview of methods to study autophagy progression. *Methods*, 75: 3–12.

- Delorme-Axford, E., Klionsky, D.J. 2018.** Transcriptional and post-transcriptional regulation of autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*, 293: 5396–5403.
- Destruelle, M., Holzer, H., Klionsky, D.J. 1995.** Isolation and characterization of a novel yeast gene, ATH1, that is required for vacuolar acid trehalase activity. *Yeast*, 11: 1015–1025.
- 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.
- Ellis, H.M., Horvitz, H.R. 1986.** Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44: 817–829.
- Farabaugh, P.J., Liao X.B., Belcourt, M., Zhao, H., Kapakos, J., Clare, J. 1989.** Enhancer and silencerlike sites within the transcribed portion of a Ty2 transposable element of *S.cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 9: 4824–4834.
- Feldman, H., 2012.** *Yeast: Molecular and Cellular Biology*, Wiley-Blackwell, Weinheim, Germany, 1650 pp
- François, J., Parrou, J.L., 2001.** Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25, 125–145.
- Gancedo, J. M. 2001.** Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25:107–123.
- Gietz, RD., Schiestl, R.H., Willems, A.R., Woods, R.A. 1995.** Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11: 355–360.
- Gimeno, C.J., Fink, G.R. 1994.** Induction of pseudohyphal growth by overexpression of PHD1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol. Cell. Biol.*, 14: 2100–2112.
- 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.
- Jin. R., Dobry, C.J., McCown, P.J, Kumar, A. 2008.** Large-scale analysis of yeast filamentous growth by systematic gene disruption and overexpression. *Mol. Biol. Cell*, 19: 284–296.
- Kassir, Y., Granot, D., Simchen, G. 1988.** IME1, a positive regulator gene of meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell*, 52: 853–862.

- Kassir, Y., Simchen, G. 1976.** Regulation of mating and meiosis in yeast by the mating-type region. *Genetics*, 82: 187–206.
- Kopp, M., Muller, H. and Holzer, H. 1993.** Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 268: 4766–4774.
- Kron, S.J., Styles, C.A., Fink, G.R. 1994.** Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, 5: 1003–1022.
- Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G., François, J. 2006.** Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol. Microbiol.*, 61: 1147–1166.
- 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.
- Ludovico, P., Sousa, M.J., Silva, M.T., Leao, C. 2001.** *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death in response to acetic acid. *Microbiology*, 147: 2409–2415.
- Madeo, F., Frohlich, E., Frohlich, K.U. 1997.** A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J. Cell Biol.*, 139: 729–734.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wesselborg, S., Frohlich, K.U. 2002.** A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol. Cell*, 9: 911–917.
- Neiman A. M., 2005.** Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 69: 565–584.
- Noda, T., Ohsumi, Y. 1998.** Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in Yeast. *J. Biol. Chem.*, 273: 3963–3966.
- Nunez, G., Benedict, M.A., Hu, Y., Inohara, N. 1998.** Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*, 17: 3237–3245.
- Nwaka, S., Kopp, M. Holzer, H. 1995.** Expression and function of the trehalase genes NTH1 and YBR0106 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 270: 10193–10198.
- Nwaka, S., Holzer, H. 1998.** Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 58: 197–237.
- Ohsumi, Y. 2014.** Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res.*, 24: 9–23.
- Oliferenko, S., Chew, T.G. Balasubramanian, M.K. 2009.** Positioning cytokinesis. *Genes and Dev.*, 23: 660–674.

- Parrou, J.L., Teste, M.A., François, J. 1997.** Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: Genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology*, 143: 1891–1900.
- Parrou, J.L., Enjalbert, B., Plourde, L., Bauche, A., Gonzalez, B. and François, J. 1999.** Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15: 191–203.
- Rose, M.D., Winston, F., Heiter, P. 1990.** Methods in Yeast Genetics. A Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 455pp
- Strich, P. 2015.** Programmed cell death initiation and execution in budding yeast. *Genetics*, 200: 1003–1014.
- Thevelein, J.M., Hohmann, S., 1995.** Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem. Sci.*, 20: 3–10.
- Wilkinson, D., Ramsdale, M. 2011.** Proteases and caspase-like activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Soc. Trans.*, 39: 1502–1508.
- Zahringer, H., Thevelein, J.M., Nwaka, S. 2000.** Induction of neutral trehalase Nth1 by heat and osmotic stress is controlled by STRE elements and Msn2/Msn4 transcription factors: Variations of Pka effect during stress and growth. *Mol. Microbiol.*, 35: 397–440.

EKLER

EK 1. Besiyeri ve özeltilerin Hazırlanması

EK 2. β - Galaktozidaz Aktivitesi Hesaplanması

EK 1. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması

1: Yeast Ekstrakt, Pepton, Dekstroz (YPD) (Tam Besiyeri)

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

2: Urasil İçermeyen Sentetik Tam Besiyeri (Sc-Ura)

Sc-Ura besiyerini hazırlamak için 1.7 gram/litre Yeast Nitrogen Base (YNB), 5 gram/litre Amonyum sülfat distile suda çözülüp, otoklavda steril edildi. Otoklavdan sonra Sc-Ura amino asit karışımı xx gram/litre olacak şekilde saf suda çözüldü ve 0.45 mm'lik disk filtre ile steril edilerek verilen konsantrasyonlarda besiyerine eklendi.

Sc-Ura katı besiyerleri için 20 gram/litre olacak şekilde *Agar agar* ilave edildi. Glukoz son konsantrasyonu %2 olacak şekilde %20'lik steril stok çözeltilerden deneydeki kullanımdan hemen önce ilave edildi. Derepres şartlar için son konsantrasyon %0.1 olacak şekilde steril glukoz ilavesi yapıldı.

3- YNB (Yeast Nitrogen Base) besiyeri

1.7 gram/litre Yeast Nitrogen Base (YNB), 5 gram/litre Amonyum sülfat distile suda çözülüp, otoklavda steril edildi. Otoklavdan sonra gerekli aminoasitler 0.45 mm'lik disk filtre ile steril edilerek verilen konsantrasyonlarda besiyerine eklendi. Katı besiyerleri için 20 gram/litre olacak şekilde *Agar agar* ilave edildi. Glukoz son konsantrasyonu %2 olacak şekilde %20'lik steril stok çözeltilerden deneydeki kullanımdan hemen önce ilave edildi.

4- Sporulasyon Besiyeri

10g Potassium asetat, 1g Yeast ekstrakt, 05 gram glukoz 1litre distile suda çözüldükten sonra 20g litre olacak şekilde agar agar ilave edildi. Karışım otoklavda steril edildi

5- SLAD ortamı (Synthetic Low Ammonium Dextrose)

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

6: Lityum Asetat ve Polietilen Glikol (PEG) Çözeltileri

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

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

7: Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (%0,1) ve Kloroform Çözeltileri

Sodyum dodesil sülfat (SDS), steril distile suda %0,1'lik stok çözelti olarak hazırlandı. Kloroform seyreltilmeden, doğrudan stoktan kullanıldı. Bu çözeltiler maya hücrelerini permeabilized ederek hücre lizatı hazırlamak için kullanıldı.

8: Lizis Tampon Çözeltisi (Break Buffer)

Lizis Tampon Çözeltisinin (Break Buffer) Bileşenleri:

100 mM Tris.HCl (pH: 8)

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

%20 Gliserol

4 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF).

9: β- Galaktozidaz Tampon Çözeltisi (Z Buffer)

Z Buffer içeriği:

60 mM Na₂HPO₄.7H₂O,

40 mM NaH₂PO₄.H₂O,

10 mM KCl,

1 mM MgSO₄.7H₂O

50 mM β-Merkepto-etanol çözeltisi

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

10: Lowry Çözeltileri

I: Lowry A çözeltisi:

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

II: Lowry-B1 çözeltisi:

1 g CuSO₄, toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile su ile çözümlenip, +4 °C'de depolandı. III: Lowry-B2 çözeltisi:

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

IV: Lowry-C çözeltisi:

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

Lowry-C Çözeltisinin İçeriği:

24,5 ml Lowry A,

250 µl Lowry B1,

250 µl Lowry B2.

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

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

EK 2. β - Galaktozidaz aktivitesi hesaplanması

β -Galaktozidaz aktivitesi aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

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

OD₄₂₀: Sarı rengin absorbansı

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

0,0045: ONPG'nin molar absorpsiyon katsayısı

t: β -galaktozidaz reaksiyon süresi (dakika)

V: β -Galaktozidaz ölümünde kullanılan hücre lizatı hacmi (ml)

P: Hücre lizatlarının protein konsantrasyonları (mg/ml)

β -Galaktozidaz aktivitesi biririmi, dakika başına hücre lizatındaki 1 mg znr protein içindeki β -Galaktozidaz enziminin hidroliz edilen nmol ONPG (nmol ONPG/dk/ mg protein) cinsinden verilmiştir

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Thomas Saah PETERS
Doğum Yeri ve Tarihi : Monrovia Liberia, 10 Temmuz, 1992
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lise : Haywood Mission Institute / 2009
Lisans : Cuttington Üniversitesi/ 2014
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi/ 2020
İletişim (e-posta) : petersthomas85@yahoo.com
Yayınları :

Türkel, S., Arslan, G., Günay İbrahimova, G., Saah Peters, T.S. 2018.
Saccharomyces cerevisiae'da Organik Asit Stresinin CYC1 ve GPD1 Genleri
Transkripsiyonuna Etkilerinin İncelenmesi. III. Ulusal Uygulamalı Biyolojik Bilimler
Kongresi, 3-5 Mayıs, 2018. Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.