



**CYC1 GENİ TRANSKRİPSİYONUNA ETKİ EDEN
APOPTOTİK FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI**

Canan KESKİN



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

**CYC1 GENİ TRANSKRİPSİYONUNA ETKİ EDEN APOPTOTİK
FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI**

Canan KESKİN

Prof. Dr. Sezai TÜRKEKEL
(Danışman)

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

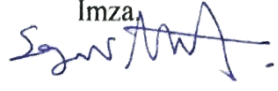
**BURSA-2018
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ ONAYI

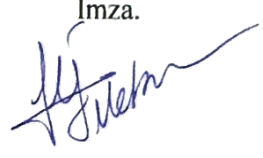
Canan Keskin tarafından hazırlanan "CYC1 geni transkripsiyonuna etki eden apoptotik faktörlerin araştırılması" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Sezai Türkel

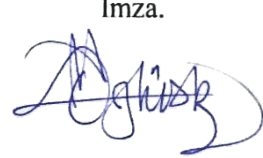
Başkan: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL
U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza.



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

İmza.


Üye: Doç.Dr. Mehmet ÖZTÜRK
Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza.


Yukarıdaki sonucu onaylarım


Prof. Dr. Ali BAYRAM
Enstitü Müdürü

03 / 01 / 2018

Bilimsel Etik Bildirim Sayfası

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

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

03 / 01 / 2018

Canan KESKİN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

CYC1 GENİ TRANSKRİPSİYONUNA ETKİ EDEN APOPTOTİK FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI

Canan KESKİN

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

S. cerevisiae *CYC1* geni sitokrom-c, isoform 1 proteinini kodlamaktadır. *CYC1* geni insandaki sitokrom C1 geni ile yüksek oranda benzerlik göstermektedir. *CYC1* aynı zamanda iso-1-cytochrome c olarak da bilinmektedir, mitokondride membranlar arası boşlukta bulunur ve mitokondriyel elektron taşıma zincirinin önemli bir bileşenidir. İnsan hücrelerinde sitokrom C1 proteinin mitokondriyel hasarlara yanıt olarak apoptozda yer aldığı bilinmektedir. İnsan *CYC1* geninin komplementasyon ile *S. cerevisiae*'da işlevsel olduğu gösterilmiştir. Bazı stres şartlarına yanıt olarak apoptozun mayalarda da meydana geldiği daha önce hem hücresel ve hem de moleküler seviyede gösterilmiştir. *S. cerevisiae* Cyc1 proteininin bu maya türünde apoptoz süresindeki işlevleri kesin olarak ortaya konulamamıştır. Bu çalışmada *S. cerevisiae*'da apoptozu neden olan bazı stres koşullarının *CYC1* geni transkripsiyonuna ve *S. cerevisiae* hücre morfolojilerine olan etkileri incelendi. *CYC1* geni glukoz baskılaması ile kontrol edildiğinden *CYC1* geni ekspresyonu hem repres ve hem de derepres şartlarda incelendi. Oksidatif stresin *CYC1* transkripsiyonunu yaklaşık % 25 kadar baskıladığı bulundu. *S. cerevisiae*'da apoptozu uyaran en önemli madde olan Salisilik asitin ise *CYC1* transkripsiyonunu tamamen durdurduğu görüldü. Nitrosatif stresin ise *CYC1* transkripsiyonunda baskılamaya yol açtığı belirlendi. Salisilik asitin genel olarak hücre morfolojilerinde değişime yol açtığı tayin edildi. Apoptoz uyarıcı maddelerin üreme ortamına uygulanması ile *S. cerevisia* hücrelerinde parçalanma başta olmak üzere, hücre morfolojisinde değişimler, hücre döngüsünün durması gibi anormallikler belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *S. cerevisiae*, Sitokrom C, Apoptoz, Asit stresi, Oksidatif stres.

2018, XII + 41 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF APOTOTIC FACTORS ON THE TRANSKRİPTION OF CYC1 GENE

Canan KESKİN

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

Supervisor: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

CYC1 gene of *S. cerevisiae* encodes cytochrome-c, isoform-1 protein. *CYC1* gene shows very high homology to human cytochrome C1 gene. *CYC1* also known as iso-1-cytochrome c. Cyc1 protein is located at the intermembranal space of mitochondria and has a significant function in the electron transport chain. Human Cyt-C1 protein has a significant function in apoptosis that occurs in response to mitochondrial damages. It is known that human *CYC1* gene complements *CYC1* function in *S. cerevisiae*. Apoptosis also occurs in yeasts in response to various stress conditions. Molecular components of apoptosis signaling pathway has been characterized in *S. cerevisiae*. Nonetheless, the molecular functions of Cyc1 protein in yeast apoptosis has not been characterized in details yet. In this study, the effects of certain stress inducing agents on the transcription of *CYC1* and cell morphology were investigated. Since the transcription of *CYC1* is regulated by glucose repression, its transcriptional regulation was analyzed both in glucose repressed and derepressed growth conditions. It was found that the both nitrosative and also oxidative stress repressed *CYC1* transcript by 25% under glucose derepressed conditions. Salicylic acid, which triggers apoptosis in yeast, completely inhibited *CYC1* transcription. In addition, our results indicated that presence of apoptosis inducing chemicals, such as salicylic acid, in the growth medium resulted in significant changes in cell morphology and cell cycle arrest.

Keywords: *S. cerevisiae*, Cytochrome C, Apoptosis, Acid stress, Oxidative stress

2018, XII + 41 pages

TEŞEKKÜR

Üniversite hayatım boyunca çalışmalarımın her aşamasında desteğini ve yardımını hiç esirgemeyen, akademik hayata hep umutla bakmamı sağlayan, yine çalışmamda konu, kaynak ve yöntem açısından bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım saygıdeğer danışman hocam Prof.Dr.Sezai TÜRKEL'e , bana eğitimim boyunca hep moral veren ve motive eden, maddi ve manevi katkılarını hiç esirgemeyen annem ve babama, her zaman daha iyisini yapabileceğime inandıran ve bundan sonraki hayatım da desteğini hep hissedeceğim sevgili eşim Selman Keskin'e teşekkürü borç bilirim.

Canan KESKİN
03. 01. 2018

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>CYCI</i> Geninin Yapısal Özellikleri.....	3
2.2. <i>CYCI</i> Proteininin Yapısı ve Metabolik Önemi.....	4
2.3. Apoptozun Genel Özellikleri.....	5
2.4. <i>S. cerevisiae</i> 'da Apoptoz Çalışmaları.....	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	12
3.1. Araştırmada Kullanılan Maya Suşları ve Üreme Koşulları.....	12
3.2. <i>CYCI</i> Ekspresyon Vektörünün Özellikleri ve Transformasyonu.....	13
3.3. Stres Şartlarının Maya Hücrelerine Uygulanması.....	15
3.4. Maya Hücrelerinde Beta-Galaktozidaz Aktivitelerinin Tayini.....	17
4. BULGULAR.....	19
4.1. <i>CYCI</i> Geni Promotor Yapısının Biyoinformatik Analizi.....	19
4.2. Salisilik Asidin <i>CYCI</i> transkripsiyonuna Etkisi.....	21
4.3. Oksidatif Stresin <i>CYCI</i> Transkripsiyonuna Etkisi.....	23
4.4. Salisilik Asitin Protein Sentezine Etkisi.....	24
4.5. Stres Şartlarının Hücre Bölünmesi ve Morfolojisine Etkileri.....	25
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	28
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	31
EKLER.....	35
Ek 1: Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması.....	26
Ek 2: β - Galaktozidaz aktivitesi hesaplanması.....	39
Ek 3: Araştırmada Kullanılan Stres Ajanlarının Hazırlanması.....	40
ÖZGEÇMİŞ.....	41

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

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

Kısaltmalar

Açıklama

ATP	: Adenosin tri fosfat
cAMP	: Halkasal Adenosin Mono Fosfat
CDC	: Cell Division Cycle (Hücre bölünmesi döngüsü)
CYC1	: Sitokrom C1 Geni (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
Cyt-C1	: Sitokrom C1 geni (insan)
Cyc1p	: Sitokrom C1 proteini (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DR	: Glukoz baskısı altında olmayan, (Derepressed)
HAP	: Heme Activated Protein
Kbp	: Kilo base pair
LacZ	: β –Galactozidaz geni
M	: Molar
MAT	: Mating type, <i>S. cerevisiae</i> 'da eşleşme tipi
MSN2	: Multicopy suppressor of SNF1 mutation
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
OD	: Optical Density
ONPG	: Orto Nitro Phenyl Galactoside
PEG	: Polyetilen glikol
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu

PKA	: Protein Kinaz A
R	: Glukoz baskılması (Repressed)
RNA	: Ribonükleik Asit
RPM	: Rotation per minute
ROS	: Reactive oxygen species
SA	: Salisilik asit
<i>S. cerevisiae</i>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC- Ura	: Urasil içermeyen sentetik tam üreme ortamı
SGD	: Saccharomyces Genome Database
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SOD	: Süperoksit dismutaz
SNF	: Sucrose non-fermenting
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. Kazpaz kaskadı ve etkileşimleri	7
Şekil 2.2. Kazpaz ilişkili apoptoz sinyal yolağı ve moleküler bileşenleri.....	8
Şekil 3.1. Araştırmada kullanılan CYC1-lacZ gen füzyonu plazmitinin yapısı.....	14
Şekil 4.1. <i>S. cerevisiae</i> 'da durağan fazda cdc48 mutantlarında morfolojik değişiklikler.....	26
Şekil 4.2. Asetik asit ve Salisilik asitin <i>S. cerevisiae</i> hücrelerine etkilerinin mikroskopik analizi	27



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Apoptoz araştırmalarında tarihsel süreç	6
Çizelge 2.2. <i>S. cerevisiae</i> 'da apoptozda yer alan bazı faktörler ve işlevleri.....	11
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşları ve özellikleri.....	12
Çizelge 4.1. <i>CYCI</i> promotoruna bağlanan stres transkripsiyon faktörleri.....	20
Çizelge 4.2. Salisilik asit'in yaban tip <i>S. cerevisiae</i> 'da <i>CYCI</i> geni transkripsiyonuna etkileri.....	22
Çizelge 4.3. Snf1p'in apoptoz sinyalinde <i>CYCI</i> geni transkripsiyonuna etkileri...	23
Çizelge 4.4. Oksidatif stresin <i>CYCI</i> geni transkripsiyonuna etkileri.....	24
Çizelge 4.5. Salisilik asitin protein sentezine etkileri.....	25

1. GİRİŞ

Apoptoz organizmaların gelişimi ve sağlıklı olarak hayatlarının devamı için gerekli olan bir hücre sel süreçtir. Programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz'un doğru şekilde işlememesi sonucunda kanser ve nörodejeneratif hastalıklar meydana gelebilmektedir. Bu nedenle apoptozun kontrol edilmesi ve sadece belirli sinyallere yanıt olarak ve gerekli olduğu zaman organizmalarda meydana gelmesi gerekir. Mitokondride oksidatif hasarların yol açacağı harabiyet, endoplazmik retikulumda protein katlanması ve sekresyonunda anormallik, çeşitli virüsler ile enfeksiyon gibi faktörlerin apoptoza neden olduğu uzun yıllardır bilinmektedir. Apoptozun başlangıç aşamasında apoptoz sinyallerine yanıt olarak ilk aktive edilen faktörler kaspaz olarak adlandırılan özel bir proteaz grubudur. Daha sonra hücre içinde genomik DNA'da fragmentasyon ve organel yapılarının küçük kesecikler halinde paketlenmesi apoptotik keselerin oluşumu ve daha sonra da bu apoptotik keselerin fagositoz ile yok edilmesi ile apoptoz işlemi tamamlanmaktadır. Hücreyi apoptoza götüren sinyal iletim yolu moleküler bileşenleri ve apoptozun farklı aşamalarında hücrede meydana gelen morfolojik, metabolik ve biyokimyasal değişiklikler genellikle insan hücre hatlarında çalışılmaktadır. Farklı hücre hatlarında apoptoz sinyal iletim yolu ve apoptoz sürecinde meydana gelen olaylar ile ilgili yapılan araştırmaların bazılarında farklı sonuçlar elde edildiği de görülmektedir. Bu nedenle apoptozun daha basit yapılı ökaryotlarda incelenmesi gerekliliği de ortaya çıkmaktadır. Bu bağlamda *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* ve *S. cerevisiae*'da yapılan araştırmalarda apoptozun birçok aşamasının bu organizmalarda da korunduğu ortaya çıkmıştır.

S. cerevisiae hem temel ve moleküler genetik ve hem de tıbbi araştırmalar için kullanılması gittikçe yaygınlaşan önemli bir ökaryotik model organizmadır (Botstein ve Fink 2011). *S. cerevisiae* hücrelerinin haploid ve diploid olarak çoğalabilmeleri genler arasında allelik etkileşimlerin analizini oldukça kolaylaştırmaktadır. Üretilmesinde ve gen aktarımında sağladığı avantajlar, kısa hayat döngüsü de *S. cerevisiae*'nın bazı araştırmalar için model organizma olarak kullanımını kolaylaştırmıştır. Apoptoz'un *S. cerevisiae*'da da meydana geldiği keşf edildikten sonra apoptoz sinyal iletim yolağı bileşenleri de *S. cerevisiae*'da incelenmeye başlanmıştır (Maedo ve ark. 1997). Bu çalışmaların sonucu olarak *S. cerevisiae*'da metakaspaz olarak tanımlanan *YCA1* geni ve

ve bu genin *S. cerevisiae*'da apoptoz sürecindeki işlevleri de incelenmiştir (Madeo ve ark. 2002). Apoptozda yer alan bazı kaspazların homologları da *S. cerevisiae*'da tanımlanmıştır.

Mitokondriyel hasarlar apoptoz sürecini başlatabilen önemli etkilere sadece birisidir. Mitokondride hasarların meydana gelmesi ile aynı zamanda mitokondriyel elektron taşıma zincirinin de bir bileşeni olan sitokrom C (Cyt-C) serbest kalarak apoptoz sürecinin başlamasını sağlayan önemli faktörlerdendir. Sitokrom C, *S. cerevisiae*'da da bulunan ve işlevsel olarak korunmuş önemli bir elektron taşıyıcı proteindir. İnsan sitokrom C homologu *S. cerevisiae*'da sitokrom-C, isoform 1 (*CYCI*) olarak adlandırılmıştır ve moleküler yapısı ve hücresel işlevleri çok iyi bilinmektedir. Sitokrom C'nin insan ve diğer ökaryotlarda apoptoz sinyal iletim yolağındaki işlevi iyi tanımlanmış olmakla birlikte *S. cerevisiae*'da *CYCI*'in apoptoz sürecindeki işlevi halen tartışmalıdır. Bazı araştırmalar *S. cerevisiae*'da mitokondriyel hasarlara yanıt olarak *CYCI*'den bağımsız bir apoptoz yolağına varlığını da işaret etmektedir. Bu nedenle bu tez araştırmasında apoptoz indükleyen bazı kimyasal ajanların *CYCI* geni transkripsiyonuna ve hücre morfolojine etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar *CYCI* transkripsiyonunun apoptoz uyarıcı maddeler ile baskılandığını göstermektedir. Özellikle salisilik asit uygulamasının doza bağlı olarak *CYCI* transkripsiyonunu tamamen durdurabildiği tayin edilmiştir. Araştırmamızda kullanılan apoptoz uyarıcı kimyasalların aynı zamanda *S. cerevisiae* hücrelerinde lizis'e, hücre bölünmesinin durmasına ve hücresel yapılarda anormallikler yol açtığı da görülmüştür.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *CYCI* Geninin Yapısal Özellikleri

S. cerevisiae uzun yıllardır genetik araştırmalarında ökaryotik model organizma olarak kullanılmaktadır. Genomu ilk sekanslanan ökaryot'tur (Goffeau ve ark. 1996). Haploid ve diploid olarak bulunabilmesi, klonlama vektörlerinin çeşitliliği, üreme süresinin kısa olması, üreme ortamının basit olması ve kolay hazırlanabilmesi, mutant seleksiyonunun kolay olması gibi birçok teknik üstünlüğü dolayısıyla *S. cerevisiae* hem biyokimyasal ve hem de gen regülasyonu gibi araştırma alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Mager ve Winderickx 2005, Botstein ve Fink 2011). *S. cerevisiae* genomu yapısı, genlerinin ekspresyonu ve kontrol mekanizmaları ve gen ekspresyonu ile ilgili literatür bilgileri de Saccharomyces Genome Database (SGD) adlı veri bankasında sürekli olarak güncellenerek verilmektedir. SGD diğer organizmaların genom bilgileri için de iyi bir örnek teşkil eden ve alanında ilk olan web bazlı önemli bir bilgi kaynağıdır (Cherry ve ark. 2012).

CYCI geni *S. cerevisiae*'da ve aynı zamanda ökaryotik organizmalarda ilk tanımlanan gendir (Sherman ve ark.1965). *CYCI* geni mutantları tek karbon kaynağı olarak laktat içeren ortamda üremeyen veya yaban tip suşa göre düşük sıcaklıkta normal seviyenin ancak %5'i kadar üreyebilen *S. cerevisiae* suşlarında incelenmiştir. Cyc1 proteininin (Cyc1p) molekül ağırlılığının küçük olması ve *S. cerevisiae*'dan kolay saflaştırılması da Cyc1p fonksiyonunun spektrofotometrede biyokimyasal analizini sağlamıştır. *CYCI* mutantları ve bu mutantlardan kodlanan Cyc1p'lerin biyokimyasal özelliklerinin açıklanması ile *CYCI* geni yapısı ve ekspresyonunun kontrol mekanizmaları kısa sürede açıklanmıştır (Sherman 2005).

S. cerevisiae'da *CYCI* geni *S. cerevisiae* kromozomlarından 10. kromozomda (*S. cerevisiae*'da J kromozomu olarak adlandırılır) yer alır. Bu kromozomdaki koordinatları: 526335'den 526664 nükleotidleri aralığında bulunmaktadır. *CYCI* geni kodlama bölgesi uzunluğu 330 bç olup bu gende intron bulunmamaktadır. *CYCI*'in *S.*

cerevisiae'da kabul edilen sistematik adı: YJR048w'dır. *S. cerevisiae*'daki gen kodu ise (SGD ID): S000003809'dur (Anonim, 2017a).

CYC1 geni promotor yapısı da daha önce yapılan çalışmalar ile aydınlatılmıştır. *CYC1* geni transkripsiyonunun glukoz baskılaması, oksijen (aerobik şartlar) ve heme kompleksine (demir iyonlarına) bağlı olarak düzenlendiği gösterilmiştir. *CYC1* geni Promotor bölgesindeki transkripsiyonel kontrol elementlerini/sekanslarını tayin etmek için yapılan delesyon analizi sonucu iki farklı kontrol bölgesi belirlenmiştir. Bu bölgeler UAS1 (Upstream Activation Sequence-1) ve UAS2 olarak adlandırılmıştır (Guarente ve ark., 1984). UAS2 transkripsiyonun başladığı nükleotide göre adlandırıldığında -200 ve -230 bç arasındaki sekans olup bu UAS2 bölgesine transkripsiyon faktörleri Hap2p/Hap3p kompleksinin bağlandığı tespit edilmiştir (Forsburg ve Guarente, 1988). Transkripsiyon faktörleri olan Hap2p ve Hap3p (Heme Activated proteins) *CYC1* transkripsiyonunu heme ve oksijen varlığında aktive eden faktörlerdir. *CYC1* transkripsiyonunun glukoz baskılamasının ise dolaylı olarak meydana geldiği, represör protein Mig1p'nin glukoz varlığında *CYC1* aktivatörü HAP4'ü baskıladığı ve bunun sonucu olarak da *CYC1* geni transkripsiyonunun baskılandığı gösterilmiştir. *CYC1* geni transkripsiyonunun glukoz baskılmasından çıkabilmesi (derepres olabilmesi için) protein kinaz Snf1p'nin gerekli olduğu da bulunmuştur (Wright and Poyton, 1990).

2.2. *CYC1* Proteininin Yapısı ve Metabolik Önemi

CYC1 ayrıca Cytochrome C, isoform 1; veya iso-1-cytochrome c; olarak da adlandırılmaktadır. *S. cerevisiae* Cyc1 proteini hem yapısal ve hem de işlevsel olarak insan sitokrom C proteinine büyük benzerlik gösterir. *CYC1* proteini (Cyc1p) küçük bir proteindir ve 109 aminoasit uzunluğundadır. Molekül ağırlığı 12.19 kDa olup izoelektrik noktası 9.96'dır (Anonim, 2017a). Protein yarılanma süresi 6.6 saat olarak belirlenmiştir (Cristiano ve ark. 2014). Cyc1p mitokondride membranlar arası boşlukta bulunur. Bu bölgede özellikle krista olarak tanımlanan yapılara yoğun olarak yerleşmiştir. *S. cerevisiae*'da Cyc1p'nin bir mayada 7330 adet bulunduğu rapor edilmiştir (Ghaemmaghami ve ark. 2003). Cyc1p'nin en önemli biyolojik işlevi elektron taşıma zincirinde kompleks 3 ve kompleks 4 arasında elektron transferi yapmasıdır. Bu

nedenle mitokondri membranına bağlı olmayıp krista içinde membranlar arası boşlukta harekeli dir.

Cyc1p'nin asıl önemi ökaryotlarda apoptozun hücre içinde başlatılması için gerekli olan ve kazpazları aktive eden bir faktör olduğu keşfedildikten sonra ortaya çıkmıştır. Cyc1p apoptoz sinyali alındığında apoptoz uyarıcı faktör aracılığı ile prokaspaz moleküllerinin aktivasyonunu sağlar ve sonuçta apoptoz meydana gelir. Cyc1p'nin bu fonksiyonu bu tezde bölüm 2.4'de verilmiştir.

2.3. Apoptozun Genel Özellikleri

Apoptoz organizmalarda doku, organ gelişimi ve gelişim sürecinde organizmanın sağlıklı olarak gelişimini tamamlaması için gerekli bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Apoptoz veya diğer adı ile programlı hücre ölümü (programmed cell death, PCD) hücrelerin herhangi bir hücre sel atık bırakmadan ve organizma için de iltihap oluşturmadan belirli bir program dahilinde kendilerini yok etmeleridir (Kerr ve ark. 1972). Apoptozun organizma gelişimindeki önemi açıklandıktan sonra apoptozu başlatan sinyal yolakları ve bu sinyal yolaklarının moleküler bileşenleri konusunda çok yoğun araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Apoptoz özellikle kanser biyolojisindeki önemi açıklandıktan sonra hücre moleküler biyolojisinde önemli araştırma alanlarından olmuştur (Pollard ve Earnshaw 2008). Apoptozun ilk tanımlandığı günden beri gelişimi çizelge 2.1'de verilmektedir (Nunez ve ark. 1998, Hongmei 2012). Apoptoz sinyal yolağının genetik bileşenleri ilk kez birçeşit nematod olan *C. elegans*'da açıklanmıştır.

C. elegans'da apoptoz için gerekli olan ilk sistein proteazlar olarak keşfedilen *CED3* ve *CED4* (Cell Death Abnormal) genlerinin kodladığı enzimleri sonradan Caspase (Caspase: Cysteine-dependent aspartate specific protease).olarak adlandırılmıştır (Ellis ve Horwitz 1986, Nunez ve ark. 1998). *C. elegans*'ın embriyonik gelişim sürecinde birçok hücrenin programlı bir şekilde, hücre atığı bırakmadan yok olduğu ve gelişimin tamamlanması için bu işlemin gerekli olduğu Ellis ve Horwitz (1986) rapor edilmiştir.

Çizelge 2.1. Apoptoz araştırmalarında tarihsel süreç.

Yıl	Bilim İnsanları	Apoptoz Araştırması
1842	Carl Vogt	Apoptozun ilk kez tanımlanması
1885	Walter Flemming	Apoptozun programlı hücre dejenerasyonu ve parçalanması olduğunun tanımlanması
1965	John Foxton, Ross Kerr	Apoptozun hücresel özelliklerinin elektron mikroskopunda tanımlanması
1972	John Foxton, Ross Kerr	Apoptoz teriminin bu bilim insanlarıncı ilk kez kullanılması
1997	Frank Madeo	Apoptozun <i>S. cerevisiae</i> 'da ilk kez tanımlanması
2002	Sydney Brenner, H. Robert Horvitz ve John E. Sulston	Doku/organ gelişiminin genetik kontrolü ve apoptozun bu süreçlerdeki önemi alanındaki araştırmaları dolayısıyla Nobel Tıp ve Fizyoloji ödülü verilmesi

CED3 ve *CED4* genlerindeki mutasyon sonucu apoptozun meydana gelememesi ise *C. elegans*'da gelişimin tamamlanamaması ve anormal gelişim sürecine yol açmaktadır. Bu nedenle, bu ilk sonuçlara bağlı olarak kaspazların bütün çok hücreli canlılarda olması gerektiği öne sürülmüştür. Daha sonra yapılan çalışmalar ile özellikle genom araştırmalarının yaygınlaşması ile kaspazların bütün çok hücreli canlılarda bulunduğu homoloji araştırmaları ile ortaya konulmuş ve herbir kaspazın da apoptoz sürecindeki işlevi belirlenmiştir. Kaspazlar apoptozdaki işlevlerine göre 3 alt gruba ayrılmıştır (Fan ve ark. 2005). Bunlar;

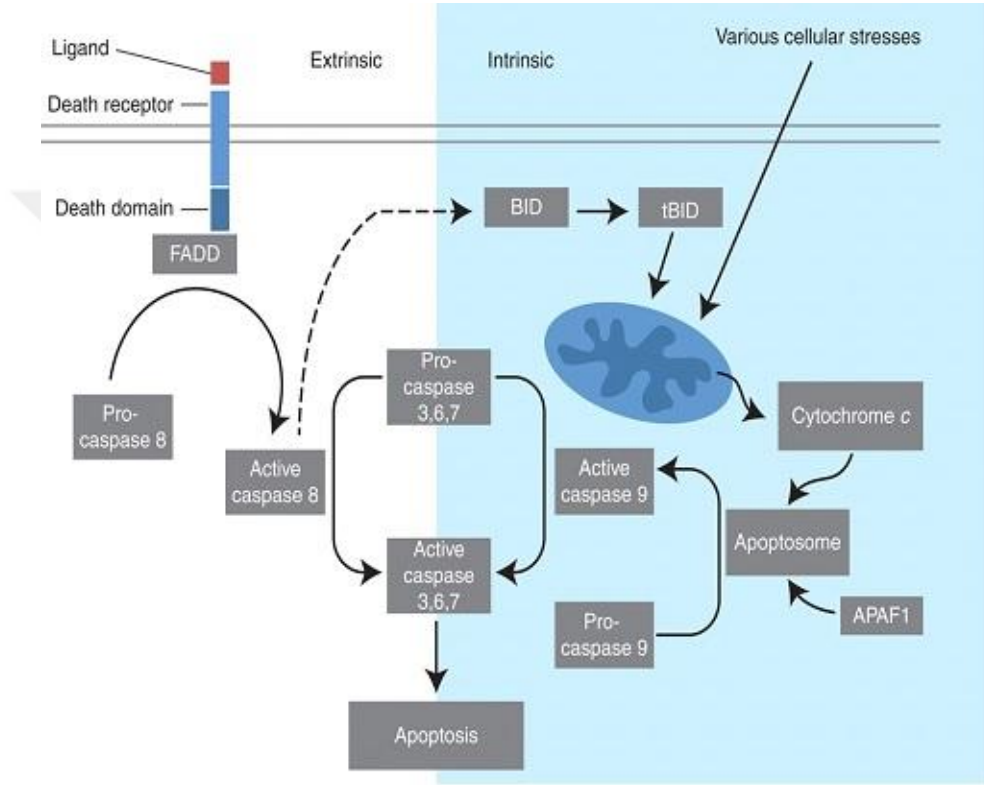
I- Başlatıcı (initiator) kaspazlar: Kaspaz 2, 8, 9, 10.

II- Gerçekleştirici (executioner) kaspazlar: Kaspaz 3, 6, 7

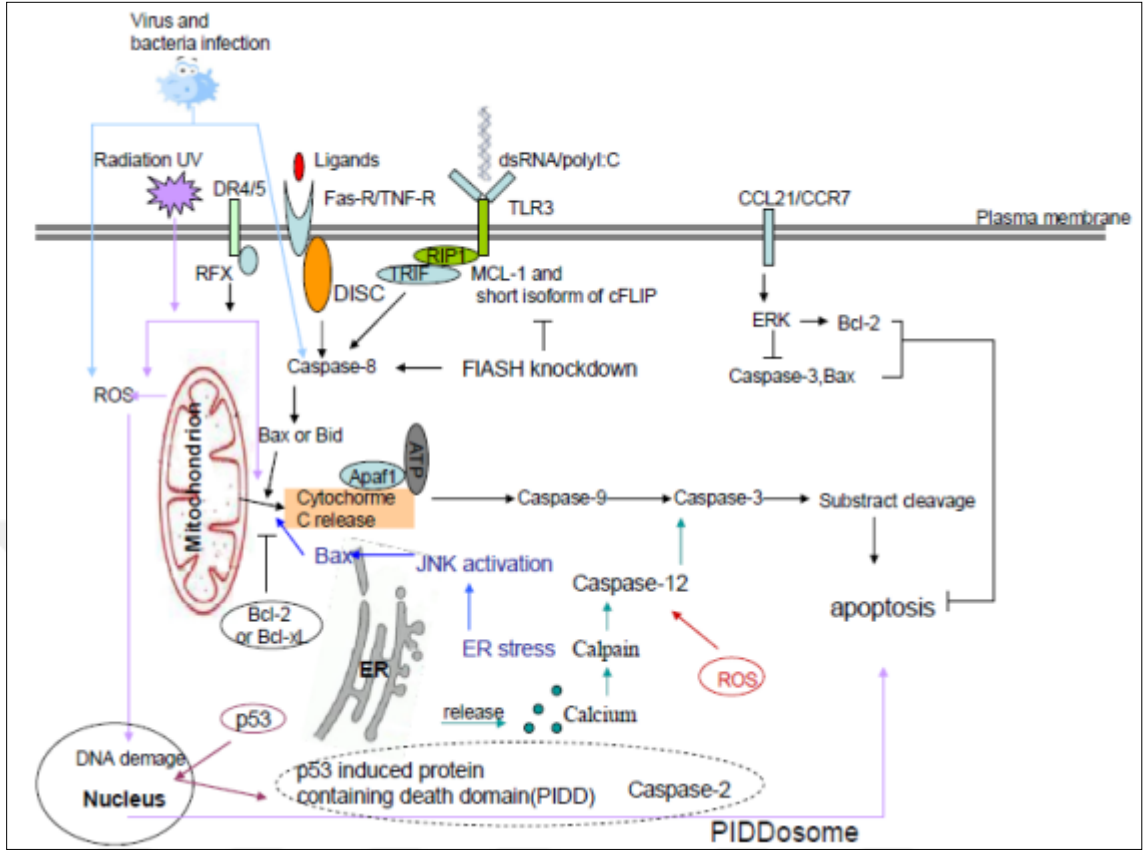
III- İnflamasyon iletici (Inflammatory) kaspazlar: Kaspaz 1, 4, 5, 11-15.

Apoptoz hem hücre içi ve hemde hücre dışı sinyallere yanıt olarak başlayabilen programlı bir süreçtir. Apoptoz kaspazların ardışık şekilde aktivasyonu ile gerçekleşir. Bu işleme kaspaz kaskadı (kaspase cascade) denir (Şekil 2.1). Başlatıcı kaspazlar hücre içi apoptoz sinyalini ilgili reseptörden alarak apoptoz gerçekleştiren ve inaktif durumda

bulunan kaspaz 3, 6 veya 7 aktive eden kaspazlardır. Aktive olan gerçekleştirici kaspazlar ise apoptozda hücre içi organellerin yıkımı, DNA fragmentasyonu ve sonunda apoptotik cisimlerin oluşumuna kadar giden süreci başlatırlar. İnflamatuvar kaspazlar ise hücre içi sinyallere bağlı olarak (örnek. E.R stresi, oksidatif stres gibi) stres koşullarına bağlı olarak aktifleşip gerçekleştirici kaspazları aktive ederek apoptozu başlatırlar.



Şekil 2.1. Kaspaz kaskadı ve etkileşimleri (McIlwain ve ark. 2013)



Şekil 2.2. Kazpaz ilişkili apoptoz sinyal yolağı ve moleküler bileşenleri (Hongmei 2012)

Hücre dışı veya hücre içinde oluşan apoptoz sinyallerinin çoğunlukla hedefi mitokondridir (Şekil 2.2). Birçok apoptoz sinyal yolağı mitokondri membranında permeabilite artışı ve mitokondri membranlar arası boşlukta bulunan sitokrom C'nin sitoplazmaya geçişi ile başlar. Hücre içi apoptoz sinyalleri Bcl2/Bax etkileşimini bozarak proapoptotik faktör Bax'ın mitokondri dışı zarından geçmesine neden olur. Bax faktörü mitokondri membran permeabilitesini bozar ve mitokondri membranlar arası boşluktaki sitokrom C'nin mitokondri dışına çıkışına neden olur. Sitokrom C inaktif Apaf ile etkileşerek Apaf'ı aktive eder, bu da önce kaspaz 9'u ve kaspaz 9'da kaspaz 3'ü aktive ederek apoptoz sürecini geri dönüşümsüz olarak başlamasına yol açar. Özellikle memelilerde sitokrom C apoptoz sürecinde merkezi işleve sahiptir (Şekil 2.2).

2.4. *S. cerevisiae*'da Apoptoz Çalışmaları

Apoptoz ökaryotlarda hücresel ve genetik olarak tanımlandığında daha çok doku ve organların gelişimi için gerekli bir biyolojik süreç olarak görülmüştür. *S. cerevisiae*'nin tek hücreli olması ve doku organ farklılaşması göstermeyen bir organizma olması dolayısıyla *S. cerevisiae*'da apoptoz çalışmaları ancak hücre döngüsü mutantlarının analizi sırasında önce fenotipik olarak tanımlanmıştır (Madea ve ark. 1997). *S. cerevisiae* *CDC48* geni çok fonksiyonlu bir enzim kodlamaktadır. Cdc48p hücre içi vezikül transportu, ubiquitin bağımlı protein degradasyonu, telomeraz alt birimi proteinlerin kontrolü, mitozda iğ ipliklerinin oluşumu ve kromozomlardan ayrışması, otofaji gibi çeşitli hücresel işlemlerde görev alır ve delesyonu letaldir (Stolz ve ark. 2011). İnsan hücrelerinde apoptozda yer alan Bax proteininin *S. pombe*'de ekspres edilmesinin bu maya türünde hücre bölünmesinde önemli inhibisyon ve morfolojik anomalilere yol açtığı, anti-apoptotik protein olan Bcl2'nin aynı maya hücrelerinde Bax2 ile birlikte ekspres edilmesinin ise hücre morfolojisini normalleştirdiği bulunmuştur. *S. pombe*'de Bax fazla sentezinin bu maya hücrelerinde apoptoz benzeri mekanizma ile hücre ölümüne yol açtığı rapor edilmesi ile apoptozun maya hücrelerinde de olabileceğini gösterilmiştir (Jürgensmeier ve ark. 1997).

Jürgensmeier ve arkadaşlarının 1997'de yukarıda özetlenen çalışmalarına ek olarak Madea ve arkadaşlarının (1997) *S. cerevisiae*'da apoptozun sinyal iletim yolu bileşenlerini tayin etmek için başlattığı çalışmalar ile ilk önce *cdc48* mutantlarında durağan fazda besin açlığı dolayısıyla apoptozda görülen fenotipik özellikler oluştuğu rapor edilmiştir (Madea ve ark. 1997). Bu çalışmada *cdc48* mutantlarında açlık dolayısıyla apoptotik cisimcikler oluştuğu, DNA fragmentasyonu olduğu elektron mikroskobu çalışması ile tayin edilmiştir. *S. cerevisiae*'da apoptoz sinyal yolağında kazpazların olup olmadığı ile ilgili çalışmada ise kazpaz benzeri protein kodlayan gen olarak *YCA1* (Yeast CAspase 1) geni önce biyoinformatik olarak maya genom analizi ile tayin edilmiştir (Madeo ve ark., 2002). Daha sonra *YCA1* geni delesyonlu maya suşunun çeşitli streslere ve açlığa maruz bırakılması ile bu genin apoptoz için gerekli olduğu deneysel olarak da gösterilmiştir (Madeo ve ark. 2002).

YCA1 geni işlevsel olarak apoptozda yer alan kaspaz enzimlerine benzeyen bir proteaz kodlamakla birlikte substrat özgüllüğü memelilerde belirlenen kaspazlardan farklılık göstermektedir. Bu nedenle *YCA1* günümüzde *MCA1* (Metacaspase-1) olarak adlandırılmıştır. Kaspazlar sistein spesifik proteazlardır. Bu enzimlerin katalitik aktiviteleri yapılarında bulunan sistein yan zincirine bağlı olup hedef substrat proteinleri özellikle aspartik asit biriminden kesmektedirler. *YCA1/MCA1* de apoptozda yer alan kaspaz benzeri enzim olmakla birlikte hedef proteinleri daha çok arjinin ve lizin birimlerinin olduğu bölgelerden kesmektedir. Bu nedenle metakaspaz olarak adlandırılmıştır (Wilkinson ve Ramsdale 2011, Mazzoni ve Falcone 2008). Apoptozda yer alan faktörler ve kaspaz benzeri aktiviteleri olan diğer proteinler de *S. cerevisiae*'da belirlenmiş olup bu proteinlerin kodlandığı genler de klonlanmıştır, bu genlerin ve proteinlerinin yapıları da ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Bu faktörler Çizelge 2.2'de özetlenmiştir (Strich 2015).

S. cerevisiae'da apoptozu tetiklemek için gerekli çevresel ve hücre içi sinyaller de incelenmiştir. *S. cerevisiae* hücrelerinin uzun süreli açlığa bırakılması (durağan fazda 10 gün gibi), düşük pH içeren üreme ortamına maruz bırakma (asetik asit gibi), bazı bitki toksinleri ve antifungal peptidlere maruz bırakma (kitinaz gibi), hücre içi aktin fonksiyonlarında bozulma, ozmotik stres uygulanması (yüksek konsantrasyonlarda NaCl'ye maruz bırakma), uzun süreli alfa faktöre uzun süre maruz bırakma, vd gibi stres şartlarının *S. cerevisiae*'da apoptozu uyaran faktörler olduğu rapor edilmiştir (Strich 2015).

Aspirinin (asetil salisilik asit) özellikle mitokondriyel permeabilityyi artırarak apoptozu neden olduğu bulunmuştur (Sapienza ve ark. 2008). Aspirinin mitokondriyel membran potansiyelini düşürerek önce dış membran permeabilitesini arttırdığı ve bunun sonucu olarak da membranlar arasında bulunan sitokrom C'nin mitokondri'den sitoplazmaya geçişini aktive ettiği bulunmuştur (Sapienza ve ark. 2008). Bu nedenle özellikle aspirine yanıt olarak gelişen apoptozda Cyc1p'nin işlevi ortaya konulmuştur. Bu nedenle araştırmamızda da salisilik asit apoptoz uyarıcı molekül olarak özellikle seçilmiştir.

Çizelge 2.2. *S. cerevisiae*'da apoptozda yer alan bazı faktörler ve işlevleri.

Faktör adı	Moleküler işlevi
Ycap1/Mca1p	Apoptozda yer alan proteaz, metakaspaz.
Nma111p	Kaspaz-3'e benzerlik gösterir, nükleusda bulunan serin proteaz, Bir1 proteinini hidroliz eden proteaz.
Bir1p	Apoptoz inhibitörüdür, memelilerde bulunan İAP homoloğu, Nma11p'nin substratıdır.
Aif1p/Ndi1p	Mitokondriyel nükleazlar olup mitokondri permeabilitesi bozulduğunda nükleusa geçerek kromatin parçalanmasına yer alırlar.
Esp1p	Kaspaz-1 benzeri proteaz, Memelilerde apoptotik faktör separin homoloğudur.
Nuc1p	Mitokondriyel nükleazlar olup mitokondri permeabilitesi bozulduğunda nükleusa geçerek kromatin parçalanmasına yer alır, memelilerdeki EndoG nükleazın homoloğudur.
Kex1p	Katapsin-A serin karboksipeptidaz, kaspaz benzeri proteaz.
Ssn3p	Strese yanıt olarak mitokondriye geçer, mitokondriyel permeabilitenin kontrolü ve mitokondri parçalanması için gereklidir, memelilerdeki Cyclin C homoloğudur.
Ybh3p	Strese yanıt olarak mitokondri membranından geçer ve membran permeabilitesi arttırır, memelilerdeki Bax ortoloğudur.
Cyc1p	Maya apotozu için uyarıcı olduğu öne sürülmektedir. Memelilerdeki Sitokrom-C homoloğudur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Araştırmada Kullanılan Maya Suşları ve Üreme Koşulları

Bu tez çalışmasında genomu daha önceden sekanslanmış olan ve laboratuvar araştırmalarında standart haploid *S. cerevisiae* suşu olarak yaygın olarak kullanılmakta olan *S. cerevisiae* BY4741 suşu ve bu suştan elde edilen *S. cerevisiae* $\Delta snf1$ mutant suşu kullanıldı. Bu maya suşları EUROSCARF koleksiyonundan sağlandı. Bu *S. cerevisiae* suşlarının genotipleri, stok merkezi kodları ve laboratuvarımızda uygulanan stok maya kod numaraları Çizelge 3.1’de verildi. Genomları tamamen sekanslanmış olan bu maya suşlarında çizelgede verilen delesyonlar dışında mutasyon bulunmadığı bilinmektedir (Brachmann ve ark. 1998). Bu maya suşlarında araştırmamızın konusu olan *CYCI* geni transkripsiyonuna etki eden herhangi bir mutasyon da rapor edilmemiştir.

S. cerevisiae suşları EUROSCARF’den (Frankfurt, Almanya) YPD tüplerinde sağlandı. Maya örnekleri aseptik şartlarda tekrar üremeleri için YPD petrilerinde çizgi ekimi yapılarak laboratuvarımızda 30 °C’de 48 saat üretildi. Petrilerde taze olarak üretilen maya suşlarından steril kürdan ile alınan örnekler 1 ml steril %20’lik gliserol bulunan mikrofüj tüplerinde suspanse edilerek uzun süreli depolamak için –80 °C derin dondurucuda saklandı. Laboratuvar çalışmalarımız sırasında sıvı kültürleri başlatmak için +4 °C’de buzdolabında depo edilen YPD petrilerindeki stok *S. cerevisiae* suşları kullanıldı

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

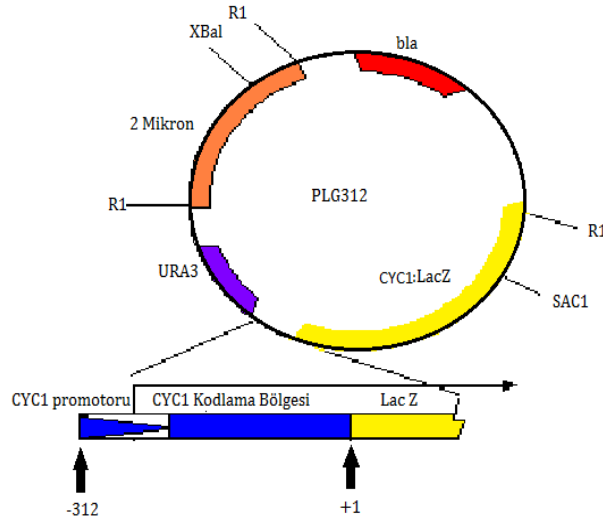
Euroscarf Kodu	ST Lab Kodu	Genotipi ve ilgili mutasyonlar
Y00000	YST124	MAT a, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0. (Haploid, Yaban tip)
Y14311	YST159	MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YDR477w::kanMX4 ($\Delta snf1$ mutanı)

Tez deneyleri sırasında maya suşlarının üretilmesi için kullanılan besiyerlerinin bileşenleri ve bu besiyerlerinin hazırlanması EK.1’de verildi. YPD besiyeri (Yeast Extract, Peptone, Dextrose) *S. cerevisiae* suşlarının üretilmesinde seçici olmayan tam besiyeri (zengin besiyeri) olarak kullanıldı. *S. cerevisiae* suşlarına *CYCI* ekspresyon vektörünün transformasyonu ve transformantların seçilmesi ve üretilmesi için ise seçici besiyeri olarak (Sc-Ura+%2 glukoz) urasil içermeyen minimal tam besiyeri kullanıldı (Rose ve ark. 1990). *CYCI* geni transkripsiyonu glukoz baskılaması ile de kontrol edildiği için maya transformantlarında Sc-Ura üreme ortamında karbon kaynağı olarak %2 glukoz (repres şartlar, glukoz baskılamasının olduğu şartlar) veya %0.1 glukoz (derepres şartlar, glukoz baskılamasının olmadığı şartlar) ilave edilerek kullanıldı. *S. cerevisiae* suşlarının sıvı besiyerlerinde üretilmeleri için maya araştırmalarında standart üreme şartları olarak kabul edilen 30 °C çalkalamalı inkübatör, 140 dönüş/dakika hız uygulandı. Maya transformantlarının petrilere üretimi ise 30 °C’de inkübatörde 2-3 gün bekletilerek gerçekleştirildi.

3.2. *CYCI* Ekspresyon Vektörünün Özellikleri ve Transformasyonu

Apoptoza neden olan faktörlerin *CYCI* geni transkripsiyonuna etkilerini tayin etmek için bir çeşit raportör vektör olan ve daha önceki araştırmalarda hazırlanan *CYCI-lacZ* gen füzyonu kullanıldı. Bu tez araştırmasında kullanılan *CYCI-lacZ* gen füzyonu plazmitinin genetik yapısı da daha önce yayımlanmıştır ve orijinal adı da pLGΔ312’dir (Guarente ve ark. 1984). *CYCI-lacZ* gen füzyonu plazmiti P.J. Farabaugh (University of Maryland Baltimore County, Baltimore, Maryland, ABD) aracılığı ile temin edilmiş olup laboratuvarımızda plazmit stoklarında mevcuttur. *CYCI-lacZ* gen füzyonu vektörü 2µM-URA3 temelli, maya plazmiti olup hücrelerde çok kopyalı olarak bulunur. Bu ekspresyon vektöründe *CYCI* geni promotor bölgesinin 1. ATG kodonundan başlanarak -312 bç uzunluğundaki promotor kısmı *lacZ* genine eklenmiş olarak bulunmaktadır. Bu ekspresyon vektörü daha önceki araştırmalarda *CYCI* geni promotor yapısının kontrol bölgelerinin belirlenmesi için de kullanılmış olup *CYCI* transkripsiyonunun kontrolü için gerekli olan bütün düzenleyici elementleri içerdiği rapor edilmiştir (Guarente ve

ark. 1984). *CYC1* promotor bölgesine bağlanan transkripsiyon faktörleri biyoinformatik araçlar kullanılarak tezin sonuçlar bölümünde de verilmiştir.



Şekil 3.1. Araştırmada kullanılan *CYC1-lacZ* gen füzyonu plazmitinin yapısı

CYC1-lacZ gen füzyonunu plazmiti lityum asetat polietilen glikol yöntemi ile transformasyon yapılarak *S. cerevisiae* suşlarına aktarıldı. *S. cerevisiae* suşlarına plazmit transformasyonu daha önce açıklanan ve laboratuvarımızda rutin olarak uygulanan metod kullanılarak aşağıda özetle verildiği şekilde yapıldı (Rose ve ark. 1990). Transformasyon için *S. cerevisiae* suşları YPD petrilerinden alınarak önce 5 ml'lik YPD sıvı besiyerinde 18 saat (bir gece) standart şartlarda ön kültür olarak üretildi. Ertesi sabah bu ön kültürler kullanılarak 20 ml'lik taze YPD ortamına başlangıç OD_{600} değeri 0.1-0.2 olacak şekilde ekim yapılarak standart şartlarda üretilip (yaklaşık 4 saat kadar) logaritmik aşama kültürleri elde edildi. Logaritmik fazdaki maya kültürleri 50 ml'lik steril falcon tüplere aktarıldı ve masa üstü santrifüjde 2000 rpm hızda 5 dk santrifüjde çöktürüldü, sıvı faz atıldı ve maya pelletleri 20 ml steril saf suda süspansiyon edilerek tekrar çöktürüldü. Maya pelletleri 1 ml steril 0.1 M lityum asetat ile süspansiyon edilerek mikrofüj tüplerine alınarak transformasyonda kullanılacak maya süspansiyonları elde edildi. Bu maya stoklarından 50 µl alınarak taze mikrofüj tüplerine

aktarıldı. Transformasyon işleminde 1-3 µg CYC1-lacZ plazmiti ve 1 µg kadar da taşıyıcı DNA olarak denatüre edilmiş Herring DNA'sı kullanıldı. Transformasyon işlemi daha önce açıklandığı gerçekleştirildi (Rose ve ark. 1990). Maya transformantları üremeleri için seçici besiyeri olan Sc-Ura+%2 glukoz petrilerinde yayma ekimi yöntemi ile ekildi ve 30 °C'de 3-4 üretilti. *Δsnf1* mutant fenotipi yavaş üreme gösterdiğinden bu maya suşunun transformantlarının minimal ortamda üremesi için en az 1 haftalık bir zaman gerektiği de görüldü. Petrilerde transformant koloniler belirgin şekilde görüldüğünde 3-4 koloni seçilerek steril kürdan ile alındı ve tekrar taze Sc-Ura +%2 glukoz petrilerine küçük pasajlar şeklinde (yaklaşık 0.5-1 cm² kadar olacak şekilde) ekim yapılarak 30 °C'de 3-4 gün üremeye bırakıldı. Bu transformant pasajları da sıvı kültürler için stok kültürler olarak kullanıldı ve deneyler süresince +4 °C'de saklandı.

3.3. Stres Şartlarının Maya Hücrelerine Uygulanması

S. cerevisiae'da apopozu uyaran faktörler daha önceki çalışmalarda tayin edilmiştir. Bu tez araştırmasında da apoptoz uyarıcı maddeler olarak salisilik asit (SA), menadion ve sodyum-nitro prusid (SNP) ilgili çizelgelerde verilen dozlarda uygulandı (Redza-Dutordoir ve Averill-Bates 2016, Sapienza ve ark. 2008). Bölüm 3.2'de açıklanan şekilde hazırlanan CYC1-lacZ transformantları önce transformant pasaj petrilerinden alınarak 5 ml'lik Sc-Ura %2 glukoz içeren (repres şartlar) steril 25 ml kapasiteli erlen kaplarına sıvı besiyerlerine ekim yapıldı ve maya kültürleri standart şartlarda bir gece üretilerek (yaklaşık 18-20 saat kadar) durağan faz ön kültürleri elde edildi. Ertesi sabah bu ön kültürler kullanılarak 5 ml'lik taze Sc-Ura+%2 glukoz besiyerine başlangıç OD₆₀₀ değerleri 0,1 olacak şekilde ekim yapıldı ve standart şartlarda çalkalamalı inkübatörde logaritmik aşamaya (OD₆₀₀: 0,8-1) kadar üretilti. Bu aşamada üreme ortamına sonuçlar bölümünde ilgili çizelgelerde verilen konsantrasyonlarda salisilik asit, sodyum-nitro prusid ve menadion ilave edilerek maya kültürlerinin aynı standart üreme şartlarında 4 saat daha üremeleri beklendi.

CYC1 geni glukoz baskılaması ile kontrol edildiğinden glukoz baskılamasının olmadığı derepres şartlarda da *CYC1* geni transkripsiyonuna apoptotik faktörlerin etkileri

incelendi. Derepres maya transformantı kültürleri elde edebilmek için önce maya transformantları yukarıda açıklandığı şekilde repres şartlarda logaritmik faza kadar standart şartlarda üretildi. Bu aşamada maya transformantları yukarıda açıklanan şekilde masa üstü santrifüjde çöktürülerek 5 ml steril saf suda süspansiyon edildi ve tekrar aynı şekilde santrifüjde çöktürüldü, sıvı faz atıldı. Maya peletleri bu kez 5 ml Sc-Ura %0.1 glukoz ortamında süspansiyon edildi ve 25 ml'lik steril erlenlere aktarıldı. Derepres maya kültürlerine de yukarıda açıklanan şekilde apoptoz uyarıcı maddeler olan salisilik asit, menadion ve sodyum nitro prusid ilave edilerek derepres maya kültürlerinin de 4 saat daha standart şartlarda üremeleri sağlandı.

Üreme süreleri sonunda maya kültürleri 1.5x12 cm'lik santrifüj tüplerine aktarılıp masa üstü santrifüjde 1600 rpm'de 4 dk süre ile çöktürüldü, sıvı faz atıldı. Çöktürülen maya hücrelerine (maya peletleri) 1 ml'lik steril saf ilave edildi, vortek ile karıştırılarak pelletlerin süspansiyon olması sağlandı ve maya süspansiyonları mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı, bu kez 12500 rpm'de 1 dk çöktürüldü, sıvı faz atıldı. Çöken maya pelletleri bu kez 200 µl lizis tampon çözeltisinde süspansiyon edilerek maya hücreleri β-galaktozidaz aktiviteleri tayin edilinceye kadar -80 °C'de depo edildi.

Yukarıda açıklandığı şekilde üretilen maya transformantlarında apoptoz uyarıcı kimyasal maddelerin uygulanmasından önce ve sonraki aşamalarda hücre yapılarını incelemek için de ayrıca steril mikrofüj tüplerine 100 µl örnek alındı. Bu örneklerin mikroskop incelemesine uygun olabilmesi için steril saf ile 10-50 kat kadar seyreltmeler yapıldı. Seyreltilen maya transformantı kültürlerinden direkt olarak lam-lamel arası preparat hazırlandı ve ışık mikroskopunda immersiyon objektifi kullanılarak maya hücrelerinin görüntüleri alındı. Apoptotik faktörlerin uygulandığı ve uygulanmadığı maya hücrelerinin görüntüleri sonuçlar bölümünde verildi.

3.4. Maya Hücrelerinde Beta-Galaktozidaz Aktivitelerinin Tayini

Bölüm 3.3’de açıklandığı şekilde üretilen *S. cerevisiae* CYC1-lacZ transformantları depo edildikleri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’de derin dondurucudan alınarak oda sıcaklığında çözümleri için bekletildi. CYC1-lacZ gen füzyonundan sentezlenen beta-galaktozidaz (β -Gal) hücre içi enzim olduğundan önce maya hücrelerinin permeabilize edilmesi gerekmektedir. Maya transformantlarından beta galaktozidaz aktivitelerinin tayin edilmesinde daha önce açıklanan metod uygulandı (Rose ve ark. 1990). Bunun için stok maya süspansiyonlarına 20 μl saf kloroform ve %0.1’lik SDS çözeltisinden de 20 μl SDS ilave edilip yaklaşık 0.5-1 Dk kadar süre ile en yüksek hızda vorteks ile karıştırıldı ve permeabilize olmuş maya hücre lizatları elde edildi. Bu maya lizatlarındaki β -galaktozidaz aktivitesini tayin etmek için 1x10 cm’lik deney tüplerine önce 980 μl Z-buffer ve vorteks ile tekrar karıştırılan maya lizatlarından 20 μl hücre lizatı ilave edildi. Karışımı içeren deney tüpleri tekrar kısaca vorteks ile karıştırıldı ve beta-galaktozidaz reaksiyon sıcaklığının optimum sıcaklık olan $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’ye gelebilmesi için deney tüpleri $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’de su banyosunda 2 dk bekletildi. Daha sonra bu deney tüplerine beta-galaktozidazın substratı olan ONPG çözeltisinden 200 μl ilave edilip reaksiyon başlangıç zamanı kronometrede kayıt edildi. Beta-galaktozidaz reaksiyonun tamamlanması için reaksiyon tüplerinde açık sarı renk meydana gelinceye kadar beklendi. Reaksiyon tüplerindeki çözelti rengi şeffaf’den açık sarı’ya döndüğünde reaksiyon tüplerine bu kez 500 μl 1 M sodyum karbonat ilave edilerek enzimatik reaksiyon durduruldu ve geçen zaman, reaksiyon süresi kronometreden okunarak kayıt edildi. Reaksiyon tüpleri masa üstü santrifüjde 1600 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek hücre lizatlarındaki parçalı materyalin çökmesi sağlandı. Santrifüj sonrası reaksiyon çözeltileri 2 mL’lik spektrofotometre küvetlerine aktarılıp absorbansları Shimadzu marka spektrofotometrede absorbans modunda 420 nm dalga boyunda ölçülerek kayıt edildi. (Rose ve ark. 1990).

Maya lizatlarında tayin edilen β -galaktozidaz aktiviteleri ilgili lizatlardaki toplam çözüner protein miktarına göre normalize edildi. Maya lizatlarının toplam protein konsantrasyonları da daha önce açıklandığı şekilde Lowry metodu ile tayin edildi (Lowry ve ark. 1951). Enzimatik aktivite ve protein konsantrasyonu tayini için

kullanılan bütün çözeltilerin içerikleri ve hazırlanması da Ek.1’de verildi. β -galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg çözünür protein başına hidroliz edilen nmol ONPG olarak verildi (nmol ONPG/dakika/mg protein). β -galaktozidaz deneyleri üç tekrarlı olarak yapıldı. Maya transformantları da iki tekrarlı olarak üretildi. Bu nedenle sonuçlar bölümünde verilen aktivite değerleri en az altı bağımsız deneyin ortalamasıdır. Aktivite hesapları Ek.2’de verilen formüle göre Excell tabloları hazırlanarak yapıldı. Beta-galaktozidaz aktivitelerinde standart sapmanın %10 veya daha düşük değerlerde olduğu görüldü. Araştırmada apoptoz uyarıcı maddeler olarak kullanılan salisilik Asit, sodyum nitro prusid, ve menadion çözeltilerinin hazırlanması ve deneylerde uygulanan konstrasyonları ise Ek.3’de verildi.



4- BULGULAR

4.1. *CYCI* Geni Promotor Yapısının Biyoinformatik Analizi

CYCI geni transkripsiyonu farklı metabolik sinyallere göre kontrol edilmektedir. Araştırmamızda apoptozu uyarabilmek için kullanılan kimyasal maddeler aynı zamanda stresle aktive edilen transkripsiyon faktörlerini de aktive etmektedir. *S. cerevisiae*'da stres şartlarına göre aktive edildiği bilinen en önemli transkripsiyon faktörleri Msn2/4p, Hsf ve Yap grubu transkripsiyon faktörleridir. Transkripsiyon kontrolünde yer alan transkripsiyon aktivatör ve represör proteinlerinin hedef genlerin promotor bölgelerine bağlanıp bağlanmadıkları deneysel olarak EMSA (Electrophoretic Gel Mobility Shift Assay) ve DNaz-1 Foot-Print (DNaz-1 ayak izi) olarak bilinen tekniklerle gösterilmektedir. Günümüzde transkripsiyon faktörlerinin DNA üzerinde bağlandığı korunmuş nükleotid dizileri (consensus sequences) bilindiğinden potansiyel olarak hangi transkripsiyon faktörünün hedef genin promotor bölgesine bağlandığı da biyoinformatik olarak tayin edilmektedir. Bunun için *S. cerevisiae*'da günümüze kadar rapor edilmiş transkripsiyon faktörlerinin DNaz-I foot print tekniği ile hedef promotorlarda bağlandığı dizileri içeren veri bankaları oluşturulmuştur. Bunlardan birisi de *S. cerevisiae* ile ilgili olup YEASTRACT olarak adlandırılmaktadır. Bu veri bankası www.yeasttract.com web adresinden araştırmacıların kullanımına açık olup herhangi bir abonelik de gerektirmemektedir (Anonim, 2017b).

S. cerevisiae *CYCI* geni kodlama bölgesi ve bu kodlama bölgesinin +/- 1 Kbç'lik DNA sekansı da *Saccharomyces cerevisiae* Genom Database'de (SGD) verilmektedir (Anonim, 2017a). *CYCI* promotorunun translasyon başlangıç kodonundan (1. ATG'den) itibaren 1000 bç uzunluktaki akış yukarı promotor bölgesinin (upstream sekans) nükleotid dizisi de SGD'den alınarak bu promotor bölgesine bağlanan transkripsiyon faktörleri de YEASTRACT veri tabanında tayin edildi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *CYCI* geni promotor bölgesine bağlanan stress transkripsiyon faktörleri.

Hap1p	Yap1p	Cin5p
Hap2p	Hsf1p	Rap1p
Hap4p	Msn2p	Abf1p
Hap5p	Msn4p	

CYCI promotor bölgesine bağlandığı deneysel olarak gösterilen transkripsiyon faktörleri incelendiğinde çoğunluğunun stres ile aktive edilen transkripsiyon faktörleri olduğu görülmektedir (Çizelge 4.1). *CYCI* promoturunda bulunup çeşitli stres şartlarına göre aktive edilen faktörler ve aktive edildikleri şartlar aşağıda kısaca verilmiştir.

Msn2/4p (Multicopy Suppressor of Snf): Msn2/4p heterodimer olarak hedef promotora bağlanan bu transkripsiyon faktörleri oksidatif stress, ozmotik stress, ısı şoku, toksik metal stresi, dondurup kırma (Freez/thaw) gibi birçok strese yanıt olarak hedef genlerin transkripsiyonunu kontrol ettiği bilinmektedir (Martinez-Pastor ve ark., 1996).

yAP grubu (Yeast Activating proteins) transkripsiyon faktörleri: Bu gruptaki faktörlerin özellikle oksidatif stres ve metal stresine yanıt olarak aktive edildiği ve oksidatif strese direnç için gerekli genlerin aktivasyonunu sağladığı bulunmuştur (Wysocki ve Tamas 2010, Morano ve ark. 2012). *CYCI* promotoruna bağlandığı gösterilen Cin5p'de yAP grubu transkripsiyon faktörü olup hedef promotor bölgelerine Tup1/Ssn6 represör proteinlerinin bağlanmasını sağladığı bu nedenle bazı stres şartlarında hedef genlerin transkripsiyonunun baskılanmasına neden olduğu rapor edilmiştir (Nevitt ve ark. 2004). *CIN5* aynı zamanda Yap4 olarak da bilinmektedir.

Hap (Heme Activator Protein) grubu transkripsiyon faktörleri: *CYCI* geni transkripsiyonuna etki eden faktörlerden birisi de ortamdaki demir iyon konsantrasyonudur. Transkripsiyon faktörleri olan Hap1p, Hap2p, Hap3p, Hap4p ve Hap5p *CYCI* promotor bölgesinde UAS sekanslarına bağlandıkları spesifik olarak bağlandığı uzun süredir bilinmektedir. Hap1p çinko parmak yapısı özelliğinde olan (zinc finger) transkripsiyon faktörü olup hedef genleri heme ve oksidatif solunum şartlarında aktive eden bir faktördür (Guarente ve ark. 1984; Ha ve ark. 1996).

Hap1p'nin bağlanma dizisi *CYCI* promotorunda tayin edilmiş olup optimum bağlanma sekansı N: A/T/G/C olmak üzere N3 TA N CGG N3 TA olarak belirlenmiştir. Aynı bağlanma dizisinin Cyc1p'nin etkileştiği Cyc7p nin kodlandığı *CYC7* geni promotor bölgesinde de olduğu gösterilmiştir (Ha ve ark., 1996). Hap2p, , Hap3p, Hap4p ve Hap5p ise hetero-tetramer (Hap2p/3p/4p/5p) olarak bulunan transkripsiyon faktörü kompleksidir. CCAAT sekansı bağlanma kompleksi olarak da bilinmektedir (Olesen ve Guarente 1990). Hap2p/3p/4p/5p kompleksinin de *CYCI* promotorunun UAS2 olarak adlandırılan sekansına spesifik olarak bağlandığı ve oksidatif şartlarda solunumla ilgili (Krebs döngüsü genleri) hedef genlerin transkripsiyonlarını heme ve oksijene bağlı olarak aktive ettiği bilinmektedir (Olesen ve Guarente 1990).

Rap1p ve Abf1p faktörleri: Rap1p (Repressor /Activator Protein-1) ve Abf1p (ARS Binding Factor) *CYCI* promotoruna özgül faktörler değildir. Bu iki protein daha çok kromatin oluşturma özelliği olan faktörlerdir. Özellikle Rap1p'nin telomerlere de bağlandığı bilinmektedir (Azad ve Tomar 2016). Rap1p ve Abf1p *S. cerevisiae* genomunda lokal kromatin yapıları oluşturan faktörler olarak da adlandırılır. Oluşan kromatin yapılarında her iki faktör de aktivatör olarak işlev görebilir (Ganapathi ve ark. 2011). Abf1p ve Rap1p'nin özellikle ribozomal protein kodlayan genlerin regülasyonundan sorumlu faktörler olduğu da öne sürülmektedir.

Hsf1p: Bu transkripsiyon faktörü (Heat Shock Factor 1) genel olarak sıcaklık stresine yanıt olarak birçok genin aktivasyonu için gereklidir. Hsf1p sıcaklık stresi ve çeşitli çevresel sinyallere yanıt olarak da bağlandığı promotorlardan transkripsiyonel aktivasyon sağladığı bilinmektedir. Hsf1p'nin NGAAN tekrarlı nükleotid dizisine bağlandığı rapor edilmiştir (Yamamoto ve ark. 2005, Yamamoto ve Sakurai 2006).

4.2. Salisilik Asidin *CYCI* transkripsiyonuna Etkisi

Salisilik asitin *S. cerevisiae*'da apoptozu indüklendiği daha önce rapor edilmiştir (Sapienza ve ark. 2008). Salisilik asitin *CYCI* geni transkripsiyonuna etkilerini incelemek için literatürde açıklanan konsantrasyonlarda logaritmik aşamada *S. cerevisiae* üreme ortamına eklendi. *CYCI* geni glukoz baskılaması ile kontrol edildiğinden deneyler hem glukoz repres ve hem de derepres şartlarda yapıldı. Salisilik

asitin en düşük dozda bile uygulanması ile hem repres ve hemde derepres şartlarda *CYCI* transkripsiyonunun tamamen baskılandığı görüldü (Çizelge 4.2).

Glukoz baskılamasının olduğu üreme koşullarında *CYCI* ekspresyonu 170 ünite olarak tayin edildi. Maya hücrelerinin derepres ortama aktarılması ile de *CYCI* transkripsiyonunda yaklaşık 10-kat artış olduğu ve transkripsiyonun 170 üniteden 1542 üniteye aktive edildiği görülmektedir (Çizelge 4.2). Apoptozu uyarmak için üreme ortamına salisilik asit uygulandığında ise salisilik asit konsantrasyonundan bağımsız bir şekilde hem repres ve hem de derepres şartlarda *CYCI* transkripsiyonunun yüzlerce kat azalarak tamamen baskılandığı görüldü (Çizelge 4.2). *CYC1-LacZ* gen füzyonu ekspresyonunun 2 mM salisilik asit varlığında 1-2 üniteye azaldığı görüldü. Salisilik asit konsantrasyonundaki artışın ise *CYCI* transkripsiyonunda daha fazla baskılanmaya neden olmadığı görüldü.

Çizelge 4.2. Salisilik asit'in yaban tip *S. cerevisiae*'da *CYCI* geni transkripsiyonuna etkileri.

Üreme ortamı	Repres şartlar (%2 Glukoz)	Derepres şartlar (%2 Gliserol/laktat)
Normal ortam	170*	1542
2 mM SA	2	5
4 mM SA	2	≤ 1
10 mM SA	≤ 1	≤ 1

*Ekspresyon seviyesi yaban tip maya suşunda (Y00000/YST124) nmol ONPG/dakika/mg protein olarak verilmiştir.

Snf1p çok fonksiyonlu bir protein kinaz olup *S. cerevisiae*'da glukoz sinyali, apoptoz ve otofaji sinyali iletiminde de yer aldığı rapor edilmiştir (Hedbacker ve Carlson 2009, Hong ve Carlson 2007). *Snf1p*'nin glukoz baskılaması altında inaktif olduğu, glukoz baskılanmasının olmadığı derepres şartlarda ise aktif olduğu bilinmektedir. Salisilik asite bağlı apoptoz sinyali iletiminde *Snf1p*'nin etkisini

incelemek için *CYCI* transkripsiyonu $\Delta snf1$ mutant suşunda da ölçüldü. $\Delta snf1$ mutantları gliserol laktat ortamında üremediğinden bu mutant suşun transformantları önce log faza kadar glukoz ortamında üretildi, daha sonra hücreler steril saf ile yıkanıp derepres şartlara transfer edilip salisilik asitin etkisi incelendi. *CYCI* transkripsiyonunun $\Delta snf1$ mutant suşunda daha düşük seviyede transkribe edildiği, yaban tip suşta 170 ünite olan transkripsiyonun $\Delta snf1$ mutantında 111 üniteye azaldığı görüldü (Çizelge 4.3). Derepres şartlarda ise *CYCI* transkripsiyonunda aktivasyon olmadığı, transkripsiyonun bazal seviyenin de altında gerçekleştiği görüldü. $\Delta snf1$ mutant suşuna apoptotik faktör olan salisilik asitin ilave edilmesi ise bu maya suşunda da *CYCI* transkripsiyonunun tamamen durmasına neden olduğu bulundu (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. *Snf1p*'in apoptoz sinyalinde *CYCI* geni transkripsiyonuna etkileri.

Üreme ortamı	Repres şartlar (%2 Glukoz)	Derepres şartlar (%2 Gliserol/laktat)
Normal ortam	111*	81
2 mM SA	≤ 1	≤ 1
4 mM SA	≤ 1	≤ 1
10 mM SA	≤ 1	≤ 1

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

4.3. Oksidatif Stresin *CYCI* Transkripsiyonuna Etkisi

Oksidatif hasarlar ve reaktif oksijen türleri mitokondriyal hasarlara yol açmaktadır. Mitokondriyal hasarlar da apoptozun başlamasına yol açmaktadır. Bu nedenle oksidatif stres ajanlarının yaban tip maya suşunda *CYCI* transkripsiyonuna etkileri hem repres ve hem de derepres üreme koşullarında incelendi. Oksidatif stres ajanı olarak sodyum nitro prusid (SNP) ve menadion kullanıldı (Todorova ve ark. 2009, Redza-Dutordoir ve Averill-Bates 2016). Menadion'a bağlı oksidatif stresin repres

şartlarda *CYCI* transkripsiyonuna etki etmediği yalnız derepres şartlarda *CYCI* transkripsiyonunda önemli miktarda azalmaya yol açtığı (1542 üniteden- 1160 üniteye) bulundu (Çizelge 4.4). SNP'ye bağlı stres in ise hem repres ve hem de derepres şartlarda *CYCI* transkripsiyonunda önemli azalmaya yol açtığı tayin edildi (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Oksidatif stresin *CYCI* geni transkripsiyonuna etkileri.

Üreme ortamı	Repres şartlar (%2 Glukoz)	Derepres şartlar (%2 Gliserol/laktat)
Normal ortam	170*	1542
Menadion (40 µM)	191	1160
SNP (3 mM)	146	1279

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

4.4. Stres Şartlarının Protein Sentezine Etkileri

CYCI transkripsiyonuna etki eden önemli apoptotik faktörün salisilik asit olduğu bulunduktan sonra bu stres ajanının *S. cerevisiae*'da protein sentezine etki edip etmediği de incelendi. *S. cerevisiae* hücreleri normal ve verilen konsantrasyonlarda salisilik asit içeren ortamda üretildi. Üreme ortamından çöktürülen maya hücreleri permeabilized edilerek çözümler protein konsantrasyonları Lowry metodu ile tayin edildi. Salisilik asitin maya hücrelerinde önemli ölçüde protein sentezini de inhibe ettiği görüldü. Normal şartlarda 376 mg/ml/OD600 olan protein konsantrasyonu salisilik asit konsantrasyonuna da bağlı olarak en az 3-4 kat azaldı ve 80-118 mg/ml/OD600 olarak tayin edildi (Çizelge 4.5). Salisilik asitin Δ snf1 mutantı hücrelerde de yaban tip hücreye benzer şekilde protein sentezini inhibe ettiği görüldü. Dsnf1 mutant hücreleri fenotipik olarak yaban tip suşa göre yavaş üreme gösterdiklerinden normal şartlardaki protein konsantrasyonları da yaban tip suşa göre biraz düşük olarak ölçüldü (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Salisilik asitin protein sentezine etkileri.

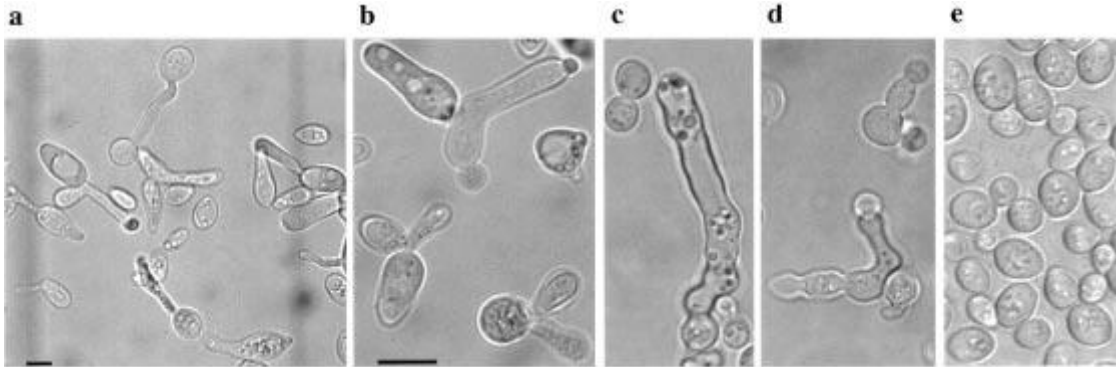
Üreme ortamı	YST124 (yaban tip suşu)	YST159 (Δ snf1 mutant suşu)
Normal ortam	376*	304
2 mM SA	118	88
10 mM SA	80	55

* Protein konsantrasyonları mg/ml/OD600 olarak verilmiştir. (SD±%10)

4.5. Stres Şartlarının Hücre Bölünmesi ve Morfolojisine Etkileri

S. cerevisiae'da apoptoz ilk kez *cdc48* mutantlarında durağan fazda morfolojik olarak karakterize edilmiştir. Apoptozun *S. cerevisiae* hücrelerinde morfolojik anomaliler meydana getirdiği, bölünen hücrelerin mitoz sonrası G1'de birbirinden ayrılamadığı, hücre içinde küçük kesecikler oluşturduğu bilinmektedir ve bu yapılar ışık mikroskobu ve elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir (Madeo ve ark. 1997) (Şekil 4.1).

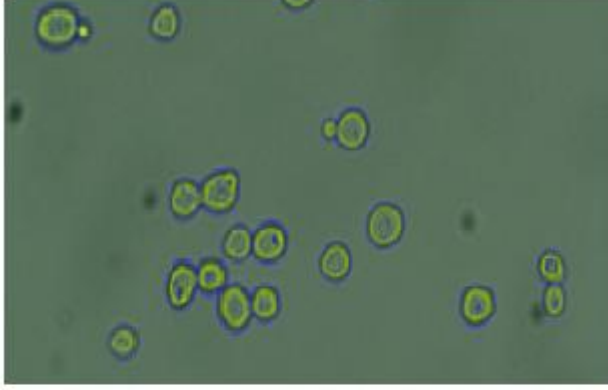
Araştırmamızda uygulanan apoptoz uyarıcı şartların *S. cerevisiae* hücrelerine etkileri ışık mikroskobunda da incelendi. Salisilik asit ve asetik asite 4 saat süre ile maruz bırakılan yaban tip *S. cerevisiae* (YST124 suşu) hücrelerinin görüntüleri ışık mikroskobunda 100x10 objektifinde immersiyon yağı kullanılarak görüntülendi. Elde edilen mikroskob görüntüleri fotoğraf olarak kayıt edilerek Şekil 4.2'de verildi. Sonuçlar normal ortamda üretilen *S. cerevisiae* fenotipi ile karşılaştırıldı.



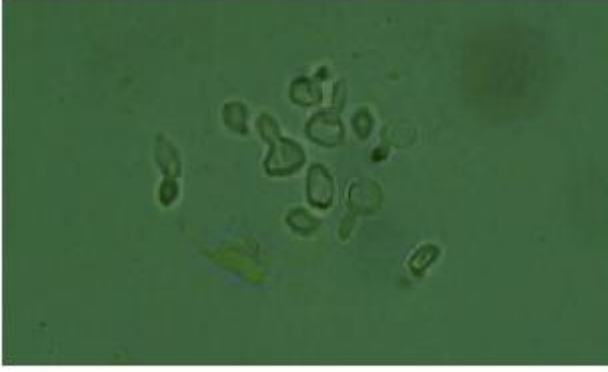
Şekil 4.1. *S. cerevisiae*'da durağan fazda *cdc48* mutantlarında morfolojik değişiklikler. Şekilde 5 günlük maya kültürlerinin faz kontrast mikroskop görüntüleri verilmektedir. a-d panellerinde *cdc48* mutant suşu, e paneli ise normal yaban tip *S. cerevisiae* suşunun 5 günlük kültür ortamında görüntüleri verilmiştir (Madeo ve ark. 1997'den alınmıştır).

Normal ortamda üretilen *S. cerevisiae* hücrelerinin fenotipi ile karşılaştırmalı olarak analiz edildiğinde salisilik asite maruz bırakılan maya hücrelerinde hücre eksenlerinde uzama olduğu da görülmektedir (Şekil 4.2). Salisilik asit uygulamasının *S. cerevisiae* hücrelerinin çoğunda Madeo ve ark. (1997) tarafından rapor edildiği şekilde bölünme sonrası ayrılamama, tomurcuklanmada anormali gibi fenotipik özellikler yol açtığı görülmektedir (Şekil 4.2). Apoptoz gelişimi sürecinde oluşan apoptotik kesecikler (apoptotic bodies) *S. cerevisiae*'da ışık mikroskobu ile kolaylıkla izlenebilmektedir (Şekil 4.1, b-e panelleri). Araştırmamızda elde edilen görüntüler incelendiğinde salisilik asite maruz bırakılan hücrelerde vakuolar fragmentasyon yapılarının oluştuğu veya oluşmaya başladığı da görülmektedir (Şekil 4.2). Salisilik aside maruz bırakılan *S. cerevisiae* hücrelerinin yapıları normal ortamda üretilen maya hücreleri ile karşılaştırıldığında fenotipik farklılar daha kolay ayırt edilmektedir. Asetik asit çok güçlü bir oksidatif stres oluşturarak hızlı bir apoptoz süreci başlatmaktadır (Sousa ve ark. 2013). Asetik asitin üreme ortamına eklenmesi ile hızlı bir şekilde ürmeyi durdurduğu için bu araştırmada *CYCI* ekspresyonuna etkisi incelenmemiştir. Bununla birlikte asetik asitin *S. cerevisiae* hücre morfolojisine etkileri mikroskop ile incelenerek fotoğraflanmıştır. Asetik asitin *S. cerevisiae* hücrelerinde vakuolde büyüme, tomurcuklanma (mitoz ve G1 aşaması) aşamasında önemli düzensizlikler yol açtığı görülmektedir (Şekil 4.2)

***S. cerevisiae*'da normal üreme ortamında fenotip**



Asetik asitin *S. cerevisiae* hücre yapısına etkisi



Salisilik asitin *S. cerevisiae* hücre yapısına etkisi



Şekil 4.2. Asetik asit ve salisilik asitin *S. cerevisiae* hücrelerine etkilerinin mikroskobik analizi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Apoptoz çok hücreli organizmalarda doku, organ gelişiminin tamamlanması ve organizmaların hayatlarını sağlıklı olarak devam edebilmesi için gerekli olan bir süreçtir. Apoptoz ile yıpranmış, yaşlı veya enfekte olmuş hücreler herhangi bir atık bırakmadan programlı bir şekilde yok edilir. Apoptoz sinyal yolağının moleküler bileşenleri ilk kez bir çeşit nematod olan *C. elegans*'da tanımlanmıştır (Ellis ve ark. 1986). *C. elegans*'da tanımlanan ve apoptoz için gerekli olan genlerin homologlarının memelilerde de bulunduğu keşf edilmiştir. Ökaryotik model organizma olarak kullanılan *S. cerevisiae*'da da apoptoz süreci olduğu ve çeşitli sinyal yollarıyla da aktive edildiği daha sonra bulunmuştur (Madeo ve ark. 1997, Madeo ve ark. 2002, Carmaona-Gutierrez ve ark. 2010).

Apoptozda mitokondriyel permeabilitenin bozulması ve bunu izleyen süreçte mitokondriyel elektron taşıma zincirinde yer alan sitokrom C'nin sitoplazmaya geçerek apoptoz sürecini başlattığı çok iyi bilinmektedir (Guaragnella ve ark. 2012). *S. cerevisiae*'da bulunan Sitokrom C isoform-1 veya genel olarak adlandırıldığı şekilde Cyc1p fonksiyonel ve yapısal olarak memeli sitokrom C proteini ile benzerlikler gösterir. Apoptoz sürecinde sitokrom C geni transkripsiyonunun devam edip etmediği *S. cerevisiae*'da gösterilmemiştir. Bu nedenle bu çalışmada apoptozu neden olan bazı maddelerin *CYCI* transkripsiyonuna etkileri incelenmiştir.

CYCI geni glukoz baskılanması ile de kontrol edildiğinden araştırma hem glukoz varlığında ve hem de derepres şartlarda yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar önemli bir pro-apoptotik ajan olan salisilik asitin hem repres ve hem de derepres şartlarda *CYCI* geni transkripsiyonunu yüzlerce kat baskıladığını göstermiştir. Oksidatif stres ise mitokondriyel hasarlara ve buna bağlı olarak apoptozu yol açan önemli bir stres şartıdır. Araştırmamızda incelenen oksidatif stres şartlarının *CYCI* geni transkripsiyonuna etkisinin düşük seviyede kaldığı görülmektedir. Elde edilen sonuçlar salisilik asitin protein sentezine de etkisi olduğunu, uygulanan konsantrasyona bağlı olarak protein miktarında 4-5 kat kadar azalmaya yol açtığını göstermektedir. Protein kinaz olan Snf1'in apoptoz, otofaji ve glukoz sinyal iletim yolağı gibi işlemlerde yer alır. Snf1

proteinini içermeyen mutant *S. cerevisiae* suşunda yapılan çalışmada ise yaban tip suş ile yaklaşık olarak aynı sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar da Snf1'in salisilik asite bağlı *CYCI* transkripsiyonu düzenlenmesinde yer almadığını öne sürmektedir.

Güçlü bir pro-apoptotik madde olan salisilik asitin sitokromlara etkisi daha önceden rapor edilmemiştir. Salisilik asit etkisi ile yaklaşık 72 saat sonra Cyc1p'nin mitokondriden sitoplazmaya geçişi rapor edilmiştir (Kodo ve ark. 2013). Bizim çalışmamızda ise salisilik asite yaklaşık 4 saat maruz bırakılan maya hücrelerinde *CYCI* transkripsiyonunun tamamen durduğu görülmüştür. Aynı maya hücrelerinin mikroskopik analizi ise 4 saat salisilik asit ile inkübasyonun apoptozun tamamlanması için yeterli olmadığı, hücrede çoklu vakuol benzeri yapılar ve G1-de döngünün durdurulması gibi fenotipik özellikler tayin edilmiştir. Bu durumda transkripsiyon durdurulduktan sonra mitokondride bulunan Cyc1p'nin apoptozu başlatmak için yeterli olduğu öne sürülebilir. Yapılan bir çalışmaya göre Cyc1p'nin mitokondride 7330 adet olarak bulunduğu rapor edilmiştir (Ghaemmaghami, ve ark. 2003). Bu durumda *CYCI* transkripsiyonunun durdurulmasının Cyc1p'nin apoptozdaki işlevini etkilemesi beklenmemelidir. Ayrıca, araştırma sonuçlarımız bazı apoptotik sinyallerin (salisilik asit gibi) daha önce rapor edilmediği şekilde çok hızlı ve çok güçlü bir şekilde transkripsiyonel baskılamaya yol açtığını göstermektedir. Apoptotik sinyaller ve bunlara bağlı olarak kaspaz aktivasyonu ile bazı global represörler de hedef genlerden transkripsiyonu baskılamak üzere hedef genlerin promotor sekanslarına bağlanabilir. Farklı apoptotik sinyallerin hangi genlerde transkripsiyonel baskılamaya yol açtığı ayrıca incelenmelidir. *CYCI* geni promotor bölgesinde yapılan biyoinformatik analizde bazı represör proteinlerin bağlandığı YEASTRACT veritabanından bulunmuştur. Fakat bu sonuçların in-vivo olarak da doğrulanması gerekir. *CYCI* geni promotor yapısı çok fazla transkripsiyon faktörü tarafından kontrol edilmektedir. Represör proteinler olan Rap1p ve Cin5p potansiyel olarak *CYCI* promotoruna bağalabilecek faktörlerdir (Anonim 2017b). Bu durumda Rap1p ve Cin5p apoptoz ile (özellikle salisilik asit ile) aktive edilen represör proteinler olarak *CYCI* de transkripsiyonu baskılayan faktörler olabilir. Fakat bu önerinin in-vivo olarak da doğrulanması gerekir.

S. cerevisiae genetik araştırmalarda kullanılan önemli bir model organizmadır. *S. cerevisiae* hızlı bir şekilde çeşitli kimyasalların (ilaç, gıda katkı maddesi, endüstriyel ürünler vd) apoptoza yol açıp açmadıklarını test etmek için de kullanılabilir. Test edilecek kimyasal maddeler ile birkaç saat inkübe edilen *S. cerevisiae* suşlarının mikroskop ile incelenmesi dahi ilgili maddenin pro-apoptotik potansiyeli hakkında bilgi sağlar. Elde edilen sonuçlar önemli bir apoptotic madde olan salisilik asitin hücre sel sinyal yollarına ve *CYCI* geni transkripsiyonuna etkilerinin incelenmesinde *S. cerevisiae*'nin kullanılabileceğini göstermektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

Azad, G.K., Tomar, R.S. 2016. The multifunctional transcription factor Rap1: a regulator of yeast physiology. *Front Biosci.*, 21: 918-930.

Botstein, D., Fink, G.R. 2011. Yeast: An Experimental Organism for 21st Century. *Genetics*, 189: 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.

Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Büttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G., Madeo, F. 2010. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death and Differentiation*, 17: 763–773

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.

Christiano, R., Nagaraj, N., Fröhlich, F., Walther, T.C. 2014. Global proteome turnover analyses of the yeasts *S. cerevisiae* and *S. pombe*. *Cell Reports*, 9: 1959–1965.

Ellis, H.M., Horvitz, H.R. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44: 817-829.

Fan, T.-J., Han, L.-H., Cong, R.-S., Liang, J. 2005. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37: 719–727.

Forsburg, S.L., Guarente, L. 1988. Mutational analysis of upstream activation sequence 2 of the *CYCI* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: a HAP2-HAP3- responsive site. *Mol. Cell. Biol.*, 8: 647-654.

Ganapathi, M., Palumbo, M.J., Ansari, S.A., He, Q., Tsui, K., Nislow, C., Morse, R.H. 2011. Extensive role of the general regulatory factors, Abf1 and Rap1, in determining genome-wide chromatin structure in budding yeast. *Nucleic Acids Res.*, 39: 2032–2044.

Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., Weissman, J.S. 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, 425(6959): 737-741.

Goffeau, A., Barrel, B.G., Bussey, H., Dawis, R.W., Feldman, 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: 546-567.

Guaragnella, N., Zdravlevic, M., Antonacci, L., Passarella, S., Marra, E., Giannattasio, S. 2012. The role of mitochondria in yeast programmed cell death. *Front. Oncology*, 2: 00070.

Guarente, L., Lalonde, B., Gifford, P., Alani, E. 1984. Distinctly regulated tandem upstream activation sites mediate catabolite repression of the *CYC1* gene of *S. cerevisiae*. *Cell*, 36: 503-511

Ha, Nhuan., Hellauer, K., Turcotte, B. 1996. Mutations in target DNA elements of yeast HAP1 modulate its transcriptional activity without affecting DNA binding. *Nucleic Acids Res.*, 24: 1453-1459.

Hedbacker, K., Carlson, M. 2009. SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front. Biosci.*, 13: 2408-2420.

Hong, S.P., Carlson, M. 2007. Regulation of snf1 protein kinase in response to environmental stress. *J. Biol. Chem.*, 282: 16838-16845

Hongmei, Z. 2012. Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review. In "Apoptosis and Medicine", Ed: Ntuli, T.M., In Tech Publ. pp:1-21

Jürgensmeier, J.M., Krajewski, S., Armstrong, R.C., Wilson, G.M., Oltersdorf, T., Fritz, L.C., Reed, J.C., Otilie, S. 1997. Bax- and Bak-induced cell death in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell*. 8: 325-339.

Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, R. 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26: 239-257.

Kodo, N., Matsuda, T., Doi, S., Munakata, H. 2013. Salicylic acid resistance is conferred by a novel YRR1 mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 434: 42-47.

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.

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.

Mager, W.H., Winderickx, J. 2005. Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends Pharm. Sci.*, 26: 265-273.

Martinez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., Estruch, F. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.*, 15: 2227-2235.

Mazzoni, C., Falcone, C. 2008. Caspase-dependent apoptosis in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, 1783: 1320–1327.

McIlwain, D.R., Berger, T., Mak, T.W. 2013. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.*, 5:a008656.

Morano, K.A., Grant, C.M., Moye-Rowley, W.S. 2012. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190: 1157-1195.

Nevitt, T., Pereira, J., Rodrigues-Pousada, C. 2004. YAP4 gene expression is induced in response to several forms of stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2: 1365-1374.

Nunez, G., Benedict, M.A., Hu, Y., Inohara, N. 1998. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*, 17: 3237-3245.

Olesen, J.T., Guarente, L. 1990. The HAP2 subunit of yeast CCAAT transcriptional activator contains adjacent domains for subunit association and DNA recognition: model for the HAP2/3/4 complex. *Genes Dev.*, 4: 1714-1729.

Pollard, T.D., Earnshaw, W.C. 2008. Cell biology, Saunders-Elsevier press, Philadelphia, PA, USA.

Redza-Dutordoir, M., Averill-Bates, D.A. 2016. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta*, doi: 10.1016.

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.

Sapienza, K., Bannister, W., Balzan, R. 2008. Mitochondrial involvement in aspirin-induced apoptosis in yeast. *Microbiology*, 154, 2740-2747.

Sherman, F., Taber, H., Campbell, W. 1965. Genetic determination of isocytochromes c in yeast. *J Mol. Biol.*, 13: 21-39.

Sherman, F. 2005. The importance of mutation, then and now: studies with yeast cytochrome C. *Mutation Res.*, 589: 1–16.

Stolz, A., Hilt, W., Buchberger, A., Wolf, D.H. 2011. Cdc48: a power machine in protein degradation. *Trends Biochem. Sci.*, 36:515-523.

Sousa, M., Marta Duarte, A., Fernandes, T.R., Chaves, S.R., Pacheco, A., Leao, C., Corte-Real, M., Sousa, M.J. 2013. Genome-wide identification of genes involved in the positive and negative regulation of acetic acid-induced programmed cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*, 14:838.

Strich, R. 2015. Programmed cell death initiation and execution in budding yeast. *Genetics*, 200: 1003–1014.

Todorova, T.T., Petrova, V.Y., Vuilleumier, S., Kujumdzieva, A.V. 2009. Response to different oxidants of *Saccharomyces cerevisiae ure2* mutant. *Arch. Microbiol.*, 191: 837-845.

Wilkinson, D., Ramsdale, M. 2011. Proteases and caspase-like activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Soc. Trans.*, 39: 1502-1508.

Wright, R.M., Poyton, R.O. 1990. Release of two *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome genes, COX6 and CYCI, from glucose repression requires the SNF1 and SSN6 gene products. *Mol. Cell. Biol.*, 10: 1297-1300.

Wysocki, R., Tamas, M.J., 2010. How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *FEMS Microbiol. Rev.*, 34: 925–951.

Yamamoto, A., Mizukami, Y., Sakurai, H. 2005. Identification of a novel class of target genes and a novel type of binding sequence of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 280: 11911-11919.

Yamamoto, A., Sakurai, H. 2006. The DNA-binding domain of yeast Hsf1 regulates both DNA-binding and transcriptional activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 346: 1324-1329.

Anonim, 2017a. URL1: <https://www.yeastgenome.org/locus/S000003809> (24.11.2017, 11:00)

Anonim, 2017b. URL2: <http://www.yeasttract.com/findregulators.php> (24.11.2016, 14:00)

EKLER

EK 1: Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması

EK 2: β - Galaktozidaz aktivitesi hesaplanması

EK 3: Araştırmada Kullanılan Stres Ajanlarının Hazırlanması



EKLER

EK 1: Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması

1: YPD (Yeast Ekstrakt, Pepton, Dekstroz)

S. cerevisiae için üreme ortamı olarak kullanılan zengin, tam besiyeridir.

Önce 10 gram/litre Yeast Ekstrakt, 20 gram/litre Pepton saf suda çözülerek hazırlandı.

YPD petrilerini hazırlamak için sıvı besiyerine 20 gram/litre olacak şekilde 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. Glukoz otoklav işleminden sonra üreme ortamına son konsantrasyonu %2 olacak şekilde ilave edildi.

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

Maya transformantlarını petrilerde veya sıvı besiyerinde üretebilmek için seçici besiyeri olarak kullanıldı

1.7 gram/litre Yeast Nitrogen Base (YNB), 5 gram/litre Amonyum sülfat saf suda çözülerek otoklavda steril edildi. Otoklav işlemi sonrası 1.92 gram/litre urasil içermeyen amino asit karışımı (SC-Ura) (Sigma Y-1501) filtre ile steril edilerek ortama ilave edildi. Katı besiyerleri için son konsantrasyonu 20 gram/litre olacak şekilde agar agar ilave edildi, 121°C'de 25 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi. Glukoz %20'lik steril stok çözültiden deneylerde açıklanan konsantrasyonlarda kullanımdan hemen önce ilave edildi.

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

Bu çözelti CYC1-lacZ gen füzyonu plazmitini *S. cerevisiae* hücrelerine transformasyon yapmak için kullanıldı. Lityum asetat (FW: 102,02) son konsantrasyonu 1M olacak şekilde 0,45 µm por çaplı disk filtre ile steril edilerek hazırlandı, oda sıcaklığında depo edildi. 0,1M lityum asetat ise transformasyon işleminden hemen önce stok çözültiden seyreltilerek taze olarak hazırlandı.

4: Polietilen Gilikol (%50 PEG)

S. cerevisiae hücrelerinin transformasyonu için kullanıldı. Polietilen Glikol (PEG) (FW: 3,350) saf suda %50'lik stok çözelti olarak hazırlandı, 121°C'de 25 dakika otoklavda steril edildi.

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

SDS ve kloroform *S. cerevisiae* transformantlarını çöktürme işleminden sonra permeabilize edip hücre lizatlarını elde etmek için kullanıldı. SDS steril saf suda %0,1'lik stok çözelti olarak hazırlandı. Kloroform ise direk olarak stok çözeltilerden herhangi bir seyreltme yapılmadan kullanıldı.

6: Lizis tampon çözeltisi

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

Lizis Tampon Çözeltisi (Break Buffer) İçeriği:

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.

7: β -Galaktozidaz tampon çözeltisi (Z Buffer)

Maya transformantlarında β -galaktosidaz enzimatik aktivitesini tayin etmek için tampon çözelti olarak kullanıldı.

Çözelti içeriği aşağıdaki gibidir:

60 mM Na₂HPO₄.7H₂O,

40 mM NaH₂PO₄.H₂O,

10 mM KCl,

1 mM MgSO₄.7H₂O

50 mM β -Merkepto-etanol çözeltisi

Çözelti steril saf su ile hazırlandı ve +4°C'de saklandı.

8: Lowry Çözeltileri

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

Çözeltilerin bileşimi ve hazırlanması:

I: Lowry A çözeltisi: 20g Na₂CO₃ 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 CuSO₄ 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 °Cde 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.

9: 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: β - Galaktozidaz aktivitesi hesaplanması

CYC1-lacZ gen füzyonlarını içeren *S. cerevisiae* transformantlarından elde edilen hücre lizatlarından ölçülen 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 μ l Z buffer, 20 μ l lizat, 200 μ l ONPG, 500 μ l NaCO₃)

0.0045: ONPG'nin molar absorpsiyon katsayısı

t: β -galaktozidaz reaksiyon süresi (dakika)

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

P: Hücre lizatlarının protein konsantrasyonları (mg/ml)

β -Galaktozidaz aktivitesi birimi: Dakikada 1 mg protein tarafından hidroliz edilen nmol ONPG (nmol ONPG/dk/ mg protein) cinsinden verilmiştir

EK 3: Araştırmada Kullanılan Stres Ajanlarının Hazırlanması

Araştırmada apopozu aktive edebilmek için aşağıda verilen maddelerin suda çözünmüş şekilleri kullanıldı. Kullanılan bu kimyasal maddelerin stok çözeltileri 0,45 µM çaplı disk filtre ile steril edilerek steril stok çözeltileri hazırlandı. *S. cerevisiae* üreme ortamına daha önceden açıklanan konsantrasyonlarda ilave edildi.

a-) Salisilik Asit, (FW: 138.12)

Son konsantrasyonu 2-10 mM olacak şekilde kullanıldı. Salisilik asit suda çözünmez. Salisilik asit stok çözeltisi 0.5 M olarak %96'lık etanolde çözüldü. Bu stok çözeltilerden 5 ml'lik sıvı kültürlerle son konsantrasyonları 2mM, 4mM veya 10mM olacak şekilde eklendi.

b-) Sodyum Nitro Prusid (SNP), (FW: 297.95)

Son konsantrasyonu 3 mM olacak şekilde kullanıldı. Stok SNP çözeltisi 150 mM olarak saf suda hazırlanıp 0.45 µm disk filtreden geçirilerek steril edildi.

c-) Menadion, (FW: 172.18)

Son konsantrasyonu 50 µM olacak şekilde kullanıldı. Menadion %96'lık etanolde çözülerek 10 mM stok çözelti hazırlandı.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Canan KESKİN
Doğum Yeri ve Tarihi : Hatay, 18.06.1990
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lise : Dörtyol Atatürk Lisesi/ 2008
Lisans : Uludağ Üniversitesi/ 2013
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi/ 2017
İletişim (e-posta) : cananarslankeskin@gmail.com
Yayımları :

1- Canan Arslan, Sezai Türkel. 2016. Apoptotik Faktörlerin *S. cerevisiae*'da CYC1 Geni Transkripsiyonuna ve Hücre Morfolojisine Etkileri. V Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi. Konya, 16-21 Temmuz, 2016. (Sözlü sunum).