



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

**METAVİRÜS TY3'DE FRAMESHİFT'E SİNYAL İLETİM YOLLARININ
ETKİLERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ**

Güliz KAPLAN

**Prof. Dr. Sezai TÜRKEL
(Danışman)**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYO**

LOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2010

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

**METAVİRÜS TY3'DE FRAMESHİFT'E SİNYAL İLETİM YOLLARININ
ETKİLERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ**

Güliz KAPLAN

Bu Tez 09 / 06 /2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

**Prof.Dr. Sezai TÜRKEK
Danışman**

Prof. Dr. Beyza ENER

Doç. Dr. Cem ERGÜL

ÖZET

Programlı Ribozomal Frameshift translasyonun elongasyon aşaması sırasında oluşan bir kontrol mekanizmasıdır. Programlı Ribozomal Frameshift ile aynı mRNA'dan farklı oranlarda farklı proteinler sentezlenir. Retrovirüslerde gag ve pol polypeptidlerinin belirli oranlarda sentezi için kullanılan bu kontrol mekanizmasının farklı organizmaların hücresel genlerinde de görüldüğü bulunmuştur. Programlı Ribozomal Frameshift farklı mRNA'larda +1 veya -1 yönde olabilir ve farklı frekanslarda gerçekleşmektedir. Ty3, *S. cerevisiae*'da doğal olarak bulunan ve maya hücrelerindeki replikasyon mekanizması retrovirüslere benzeyen bir virüstür. Bu araştırmada metavirüs Ty3'de Programlı Ribozomal Frameshift'e glukoz ve azot sinyal iletim yollarının etkileri araştırıldı. Ty3'de frameshift oranının maya hücrelerinin üreme koşullarına göre değişebildiği bulundu. Glukoz sinyal iletim yolunun Ty3'de ribozomal Frameshift oranını kontrol edebildiği gösterildi. Ty3'de frameshift oranının gliserol laktatda üretilen *S. cerevisiae* hücrelerinde çok fazla gerçekleştiği ve bunun da protein kinaz Snf1p'ye bağlı olduğu gösterildi. Bu sonuçlara ek olarak, Ty3'de frameshift oranının haploid ve diploid hücrelerde farklı olduğu bulundu. Ayrıca, azot sinyal iletim yolunun ise metavirüs Ty3'de frameshift'e etkisi olmadığı gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Frameshift, sinyal iletimi, Ty elementleri, Glukoz sinyali, *S. cerevisiae*.

ABSTRACT

Programmed Ribosomal Frameshift is a type of control mechanism which occurs during the translation elongation stage. As a result of Programmed Ribosomal Frameshift, different proteins synthesized with a different ratios from the same mRNA. This control mechanism is commonly used for the synthesis of Retroviral gag and pol polypeptides with a certain ratios and it is also found in different cellular genes of different organisms. Programmed Ribosomal Frameshift can occur at different rates at +1 or -1 directions at different mRNAs. TY3 is present within *S. cerevisiae* naturally and it replicates via retroviral-like mechanisms within the yeast cells. The effects of glucose and nitrogen signaling pathways on the Programmed Ribosomal Frameshift in TY3 were investigated in this research. It was found that the frameshift rate can vary depending on the growth conditions of the yeast cells. It was shown that the glucose signaling pathway controls the frameshift rate in TY3. It was also shown that the frameshift occurs at very high levels in glycerol lactate grown yeast cells in a protein kinase Snf1p dependent manner. Moreover, it is also found that the frameshift rate is very different in haploid and diploid yeast cells. In addition, it was also shown that the nitrogen signaling pathway has no effect on the frameshift rate in metavirus Ty3.

Key Words: Frameshift, signal transduction, Ty elements, Glucose signaling, *S. cerevisiae*.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2. 1. Ty Retrotranspozonlarının Genel Özellikleri.....	3
2. 2. Metavirüs Ty3'ün Yapısı ve Özellikleri.....	7
2. 3. Ribozomal Frameshift Mekanizması ve Önemi.....	8
2. 4. <i>S. cerevisiae</i> 'da Glukoz Sinyal İletimi.....	11
2. 5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'de Azot Sinyal İletimi.....	14
2. 6. Translasyon Elongasyon Faktörleri ve PRF.....	16
3.MATERYAL VE YÖNTEM	17
3. 1. Araştırmada Kullanılan Maya Suşları.....	17
3. 2. <i>S. cerevisiae</i> Suşlarının Üretilmesi.....	17
3. 3. Araştırmada Kullanılan Plazmitler.....	18
3. 4. Plazmitlerin <i>E. coli</i> 'ye Transformasyonu ve Çoğaltılması.....	21
3. 5. Plazmitlerin <i>S. cerevisiae</i> 'ya Transformasyonu.....	22
3. 6. <i>S. cerevisiae</i> Transformantlarının Üretilmesi.....	23
3. 7. β -Galaktozidaz Aktivitelerinin Ölçümleri.....	24
4. BULGULAR.....	25
4. 1. Ty3 de PRF Oranına Gen Dozunun Etkileri.....	25

4. 2. Haploid <i>S. cerevisiae</i> 'da Glukoz Sinyalinin Ty3 de PRF Oranına Etkileri.	25
4. 3. Diploid <i>S. cerevisiae</i> 'da Glukoz sinyalinin Ty3'de PRF Oranına Etkileri.	27
4. 4. Elongasyon faktörü EF1 α 'nın Ty3'de PRF oranına Etkileri.	27
4. 5. Protein Kinaz Snf1'in Ty3'de PRF oranına Etkileri.	28
4. 6. Azot Sinyal İletim Yolunun Ty3'de PRF oranına Etkileri.	29
5. TARTIŞMA	31
6. KAYNAKLAR	35
7. EKLER.....	40
Ek 1: Araştırmada Kullanılan Besi Yerleri ve Çözeltilerin Hazırlanması.	40
Ek 2: β - Galaktosidaz Aktivitesinin Hesaplanması.....	42
TEŞEKKÜR.....	43
ÖZGEÇMİŞ	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α : Alfa

β : Beta

⁰C: Santigrat derece

μ : Mikron

μ g: Mikrogram

μ l: Mikrolitre

Δ : Delta

%: Yüzde

a.a: Aminoasit

ATP : Adenozin Trifosfat

Bp-Bç: Base pair, Baz çifti

BCY 1: Bypass of Cyclase Mutations

Bla: beta laktamaz

CaCl₂: Kalsiyum Klorür

CA: Kapsid

cAMP: siklikAMP(Halkasal Adenozin MonoFosfat)

cDNA: Komplementer DNA (Deoksiribonükleik asit)

Cyc1: Sitokrom C1

DNA: Deoksiribonükleik asit

E. coli: *Escherichia coli*

EF3: Elongation factor 3 (Sentez faktörü 3)

Env: Envelop, Retroviral Zarf Proteini

FS: Frameshift

FF: Framefusion

GAG: Group Spesific Antigen (Kapsit proteinleri)

GAL: Galaktoz

GPCR: G-Proteine Bağlı Reseptör

g: Gravity (santrifuj birimi)

gr: Gram

HIS: Histidin
HXT: Heksoz transporter
Kb: Kilobaz
LAC: Laktoz
lac-Z: β -Galaktozidaz geni LacZ
LB: Luria Bertani
LTR: Long Terminal Repeat
M: Molar
MAL: Maltoz
MAP Kinaz: Mitojen Aktive Kinaz
MAT: Mating tipi
mg: Miligram
MIG 1: Multicopy Inhibitors of Gal Genes
ml: Mililitre
mM: Milimolar
mRNA: Messenger ribonükleik asit
mTOR: Target of Rapamycin
nm: Nano metre
NC: Nükleokapsid
OD: Optical Density (optik yoğunluk)
ONPG: O-Nitro-Phenyl- β -D- Galaktosidase
ORF: Open Reading Frame
P: Fosfat
pH: Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PKA: Protein Kinaz A
POL: Polyprotein
PRF: Programmed Ribosomal Frameshift
R1: EcoR1
rRNA: Ribozomal Ribonükleik asit
SC- Ura: Syntethic Complete minus Uracil
SDS: Sodyum Dodesil Sülfat
SER/THR Kinaz: Serin/Thereonin Kinaz

SNF: Sucrose Non-fermenting

S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*

SUC: Sukroz

SSN: Supressor of Snf

TE: Tris EDTE

TPK: Takashi's Protein Kinase

TUP1: Timidilat Uptake

tRNA: Taşıyıcı Ribonükleik asit

TY: Transposon Yeast

UAS: Upstream Activation Sequence

URA: Uracil

VLP: Virus Like Particle

YNB: Yeast Nitrogen Base

YPD: Yeast extract Pepton Dextrose

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2. 1. Ty virüslerinin üreme döngüsünün şematik gösterimi	6
Şekil 2. 2. Ty1’de frameshift bölgesinin nükleotid dizisi	9
Şekil 2. 3. Ty3’de frameshift bölgesinin nükleotid dizisi ve frameshift	10
Şekil 2. 4. HIV-1’de Frameshift bölgesi nükleotid dizisi	11
Şekil 2. 5. <i>S. cerevisiae</i> ’da Gpr1’e bağlı glukoz algılama mekanizması	13
Şekil 2. 6. Aminoasit dengesi ve mTOR’un kontrolü	15
Şekil 3. 1. Kontrol plazmiti pΔ312 yapısı ve işlevsel bölgeleri	19
Şekil 3. 2. pMB38-Ty3 FS/FF plazmitlerinin yapısı ve işlevsel bölgeleri	20

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3. 1. Araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşları ve özellikleri	17
Çizelge 4. 1. Gen dozunun Ty3'de PRF oranına etkileri	25
Çizelge 4. 2. Haploid suş'da glukoz sinyalinin Ty3 PRF oranına etkileri	26
Çizelge 4. 3. Diploid suş'da glukoz sinyalinin Ty3 PRF oranına etkileri	27
Çizelge 4. 4. Elongasyon faktörü EF1 α 'nın Ty3'de PRF oranına etkileri	28
Çizelge 4. 5. Protein Kinaz Snf1'in Ty3 PRF oranına etkileri	29
Çizelge 4. 6. Azot sinyal iletim yolunun Ty3'de PRF oranına etkileri	30

1. GİRİŞ

Bazı genlerden kodlanan mRNA'ların translasyonu sırasında translasyonu yapan ribozomlar belirli sıklıkta okuma çerçevesini değiştirebilirler. Programlı Ribozomal Frameshift (PRF) olarak adlandırılan bu işlem özellikle retrovirüslerin replikasyon döngüsünde çok önemli bir yer tutmaktadır. Retrovirüslerin mRNA'larının translasyonu sırasında gag ve pol polipeptidlerinin belirli oranlarda transle edilmesi PRF ile gerçekleşmektedir. Normal okuma çerçevesinde 1. kodondan translasyona başlayan ribozomlar gag-pol kesişim bölgesine geldiklerinde normal çerçevede translasyona devam ettiklerinde gag polipeptidi sonundaki stop kodona ulaşarak translasyonu durdururlar. Fakat belirli frekansta ribozomaların bir bölümü gag-pol kesişim bölgesinde +1 veya -1 yönde 1 nükleotid kayarak okuma çerçevesini değiştirip yeni çerçevede translasyona devam ederek gag-pol füzyon polipeptidini sentez ederler. PRF ilk keşfedildiğinde çoğunlukla retrovirüslere özgü bir translasyonel kontrol mekanizması olarak görülmüştür. Fakat daha sonra yapılan araştırmalarda çeşitli virüslerde, bakterilerde ve hatta bazı insan genlerinin translasyonu sırasında aynı mRNA'dan farklı oranlarda en az iki çeşit polipeptid üretimi için kullanılan bir kontrol mekanizması olduğu görülmüştür (Farabaugh 1995, 1996).

Programlı Ribozomal Frameshiftin moleküler mekanizması özellikle *S. cerevisiae*'da model virüsler olan Ty virüsleri (Transposon yeast) kullanılarak açıklanabilmiştir. Ty virüsleri *S. cerevisiae* genomunda doğal olarak bulunan ve retrovirüslere benzer mekanizma ile çoğalabilen virüslerdir. *S. cerevisiae* virüslerinden olan Ty1 ve Ty3 virüslerinin retroviral gag ve pol homoloğu olan TYA ve TYB polipeptidleri PRF ile sentez edilmektedir. TYB polipeptidi TYA-TYB füzyon peptidi olarak her iki virüste de moleküler mekanizmaları farklı olmakla birlikte +1 yönde gerçekleşen frameshift ile sentezlenir (Farabaugh 1995, 1996). *S. cerevisiae*'da mutant izolasyonunun çok kolaylıkla yapılabilmesi, transformasyonunun çok etkin ve vektör çeşitliliğinin fazla olması, *S. cerevisiae*'nın kolay ve hızlı üremesi, istendiği takdirde metabolik sinyal iletim yollarının kontrol edilip değiştirilebilmesi bu eukaryotik

mikroorganizmayı moleküler viroloji araştırmalarında uygun bir model organizma yapmaktadır (Alves-Rodrigues ve ark. 2006).

Metavirüs olarak sınıflandırılan Ty3 virüsünde PRF'in translasyonun devam aşamasında nasıl gerçekteğiğinin moleküler mekanizması daha önce yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir (Farabaugh ve ark. 1993). Fakat farklı metabolik sinyallerin bu virüste PRF'e etkileri henüz incelenmemiştir. Daha önce tamamlanan bir araştırmada Ty1'de PRF'in glukoz sinyal iletim yolu ile kontrol edildiği bulunmuştur (Türkel ve ark. 2009). Bu tez araştırmasında ise farklı üreme koşullarının Ty3'de PRF'e etkileri araştırıldı. Elde edilen sonuçlar Ty3 tipi PRF'in glukoz sinyal iletim yolu ile kontrol edilebildiğini göstermektedir. Araştırmamızda oluşturulan deneysel koşullarda azot sinyal iletim yolunun ise Ty3'de PRF'e herhangi bir etkisi belirlenemedi. Bu sonuçlara ek olarak araştırmamızda Ty3'de frameshift oranının kontrolünde gen dozunun ve genlerin birbirine göre oranının da önemli olduğu bulundu. Bu tez araştırmasında elde edilen sonuçlar her ikisi de +1 yönde olmasına rağmen Ty1 ve TY3 tipi PRF'in metabolik sinyal iletim yollarına göre farklı şekilde kontrol edildiğini göstermektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2. 1. Ty Retrotranspozonlarının Genel Özellikleri

Transpozonlar bir hücrenin genomunda farklı yerlere, transpozisyon olarak adlandırılan bir süreçle hareket edebilen DNA dizileridir. Bu süreç ile mutasyonlara ve genomdaki DNA miktarının değişmesine sebep olurlar. Retrotranspozonlar bir RNA ara ürün aracılığı ile kendilerini kopyalayarak hareket ederler. Transpozonlar ilk defa mısır bitkisinde Barbara McClintock tarafından 1948'de keşfedilmiştir, bu keşfinden dolayı ona 1983'te Nobel ödülü verilmiştir. McClintock bu transpozonların neden olduğu insersiyon, delesyon ve translokasyon tipi mutasyonları fark etmiştir. Retrotranspozonlar uzun uç tekrar dizilerine (LTR) sahip olup olmadıklarına göre iki gruba ayrılırlar. LTR'li retrotranspozonların LTR dizilerinde promotor bölgesi ve kodlama bölgelerinde de retrotranspozisyon için gerekli olan en az iki enzimin genleri bulunur. LTR'siz retrotranspozonlar da promotor içerirler ve RNA polimeraz II tarafından transkripsiyonları yapılabilir. LTR'li retrotranspozonlar retrovirüslere çok benzerler ama retrovirüslerden farklı olarak *env* genine sahip değildirler. *Env* genini edinmek veya kaybetmek yoluyla birbirlerine dönüşebilirler. Virüs benzeri retrotranspozonlar başka hücrelere bulaşmazlar (Kidwell 2005).

Ty elementleri (Transpozon yeast) *Saccharomyces cerevisiae* mayasının retrotranspozonlarıdır. Başlangıçta bu retroelementler ile daha fazla ilgilenmek açıkça onların retrovirüsler ile olan benzerliklerinden kaynaklanmaktadır. Maya retrotranspozonu, Ty, birçok özelliği yönünden retrovirüsler için çok uygun bir modeldir. Çeşitli maya retrotranspozonları genel yapı olarak birbirine çok benzerdir. Ty retrovirüsleri gag ve pol genleri ile analog olan proteinleri kodlayan sigma (Σ) denilen 5- 5,3 kb 'lık internal domainleri içerirler (Ciriacy 1995).

Transpozon elementleri ökaryotik genomu şekillendirmede önemli role sahiptirler. Kromozomların yapısında, duplikasyonlar, delesyonlar veya yeniden

düzenlemeler ile sonuçlanan ektopik (anormal bir yerdeki) rekombinasyon için homolog bölgeler sağlarlar (Voytas ve Boeke 1993).

Saccharomyces cerevisiae'da retrotranspozonların Ty1-Ty5 olarak isimlendirilen 5 farklı ailesi tanımlanmıştır. Bu 5 ailedeki tüm Ty retrotranspozonları retrovirüslere benzerler. 5'-3' uçlarında direkt tekrarlar (LTR) bulunur, mRNA ara ürününün revers transkripsiyonu ile replike olurlar. LTR retrotranspozonları 2 farklı gruba ayrılır. Bunlar; Ty1/ *Copia* ve Ty3/ *Gypsy* grup retrotranspozonlarıdır. Ty3, *S. cerevisiae*' de bulunan Ty3/ *Gypsy* grup'unun tek örneğiymişken Ty1/ *Copia* grup elementlerinin 4 farklı ailesi bulunur. Ty1 ve Ty2 yakından akrabadır ve aralarında oldukça fazla sekans benzerliği vardır. Ty4, düşük-kopya-sayısı elementlerinin ailesindedir ve Ty1 ile Ty2' ye sadece uzaktan ilgilidir. Ty5 ailesinin bir bilinen üyesi kromozom 3' ün sol telomerine yakın bulunan ve fonksiyonu olmayan elementtir (Voytas ve Boeke 1993, Kim ve ark. 1998).

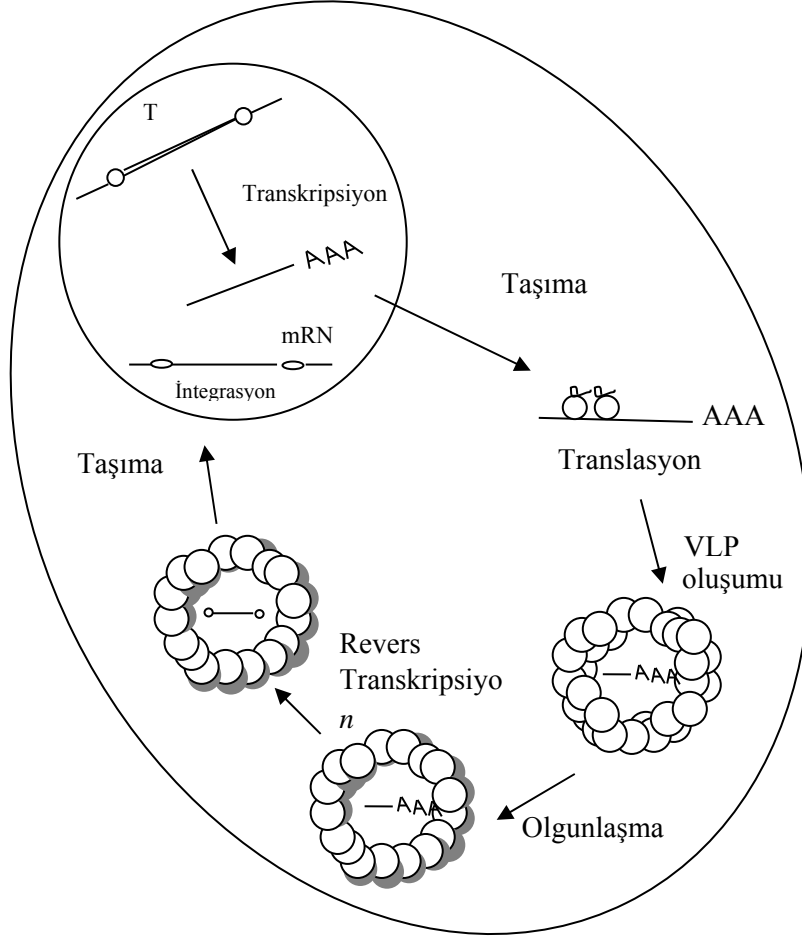
Ty1 retrotranspozonları üreme döngüleri için gerekli tüm proteinleri kodlarlar. Ty1' in kodlama bölgesi (5.2 kb), TYA ve TYB olarak bilinen 2 tane çakışık açık okuma çerçevelerini (ORFs) içerir. Bu genler sırasıyla retroviral *gag* ve *pol* ile analogtur. TYA ORF'u virüs benzeri yapılar (VLP) için gerekli yapısal (kapsit) proteini kodlar. İkinci ORF TYB ise TY1 transpozisyonu için gerekli enzimleri (reverse transkriptaz, integraz, proteaz, RNaseH) kodlar (Roth 2000).

Ty3 bir diğer *S. cerevisiae* retrotranspozon'udur. Ty3 virüsü 50-60 nm çapındadır. Ty3 virüsü yapısal proteinler (kapsid (CA) ve nükleokapsid (NC)), revers transkriptaz ve integrazdan oluşmuştur. Ayrıca Ty3 mRNA' sını içerir ve primer olarak kullanılan tRNA içerir (Roth 2000). Başlangıçta diğer maya retrotranspozonları gibi retrotranspozon olarak adlandırılan Ty3, retrovirüslere olan yapısal benzerlikleri nedeniyle Retrovirales ordosunda bulunan Metaviridae familyasının Metavirüs genusu içinde bir virüs olarak yeniden tanımlanmıştır (Capy 2005).

Ty4 virüsü ise *S. cerevisiae*'nin genomunda az sayıda bulunan bir elementtir. Ty4' ün genomik organizasyonu, Ty1/*Copia* grubunda bulunan diğer retrotranspozonlar

ile homologtur. Ty4 elementinin kodlama bölgesinde, +1 mod'ta 226 bp çakışık, 2 açık okuma çerçevesi (TY4A ve TY4B) bulunmaktadır (Stucka ve ark. 1992). Ty4 retrotranspozonu, maya suşlarında her haploid genomda sadece 1-3 kopya olarak bulunur. Ty4 transkripsiyonu, LTR'ye bağlı negatif düzenleyici elementler tarafından baskılanır. Bu nedenle düşük miktarda transkribe edildiği rapor edilmiştir (Hug ve Feldmann 1996).

Retrotranspozonlar, yeni genomik bölgelere mRNA'larının revers transkripsiyonu sonucu oluşan yeni kopyaları aracılığı ile taşınırlar. Ty transpozisyonu *S. cerevisiae*'da seyrek olan bir durumdur. Transpozisyon, her bir bölünme başına her bir Ty1 elementi için sadece $10^{-5} - 10^{-7}$ oranında meydana gelir. Diğer bir ifade ile logaritmik olarak üremekte olan *S. cerevisiae* hücrelerinde her $10^5 - 10^7$ maya hücresinden birinde 90 dakikada bir Ty virüsü genomda farklı bir bölgeye integre olur. Ty retrotranspozonlarının üreme döngüsünün basamakları Şekil 2. 1'de gösterilmiştir. Nükleusta genomik Ty transkripsiyona uğrar ve Ty mRNA'sı proteinlerinin sentezlendiği yer olan sitoplazmaya taşınır. Virüs benzeri parçacık (VLPs) içinde Ty mRNA'sı, tRNA ve revers transkriptaz, integras ve proteaz enzimleri bulunur. VLP içinde Ty mRNA'sından revers transkripsiyonla Ty cDNA'sı sentezlenir. Ty cDNA'sı da nükleusa aktarılarak yeni kromozomal bölgeye integre olur (Roth 2000).



Şekil 2. 1. Ty virüslerinin üreme döngüsünün şematik gösterimi.

2. 2. Metavirüs Ty3'ün Yapısı ve Özellikleri.

Ty3'te LTR bölgeleri sigma elementi olarak adlandırılır ve 340 bp uzunluğundadır. LTR bölgeleri arasında kalan ve Ty3A, Ty3B polipeptidlerinin kodlandığı iç bölge ise 4,7 kb'dir. Ty3'ün daha önceki çalışmalarda *S. cerevisiae*'dan elde edilen kopyalarından biri Ty3-1 olarak adlandırılmıştır (Hansen ve ark. 1988). Ty3-1'in retrovirüslere benzerlik gösteren bazı özellikleri aşağıda verilmiştir.

- a) 5'-3' uçlarda LTR'ları bulunur.
- b) Eksi zincirde DNA sentezi için potansiyel primere (met tRNA) bağlayıcı bölge yer almaktadır.
- c) Potansiyel olarak artı zincirde DNA sentezine sokulan pürin zengini bölge bulunur.
- d) Ty3 elementi promotordan başlayarak tek çeşit mRNA olarak transkribe edilir (Hansen 1988).

Ty3 transkripsiyonunun *S. cerevisiae* hücrelerinde mating (eşleşme) feromonu kontrolü altında olduğu ve alfa faktör ile uyarılan hücrelerde Ty3 transkripsiyonunun aktive edildiği gösterilmiştir (Bilanchone ve ark. 1993). Ty3 virüsü promotörünün yer aldığı LTR bölgesinde alfa faktörü ile uyarılan transkripsiyon faktörünün bağlandığı PRE (Pheromone response element) dizileri bulunmaktadır (Bilanchone ve ark. 1993). Ty3 virüsünün *S. cerevisiae* genomunda daha çok tRNA genlerinin bulunduğu kromozom bölgelerine integre olduğu bulunmuştur (Hansen ve ark. 1988).

Metavirüs Ty3 *S. cerevisiae* genomunda suşa göre değişmekle birlikte 1 ila 4 kopya olarak bulunabilir. TY3'ün kodlama bölgesi yer değiştirme (transpozisyon) için gereken yapısal ve katalitik proteinleri kodlayan TY3A ve TY3B denilen ORF'ları içerir. Bu kodlama bölgeleri retroviral gag ve pol kodlama bölgeleri ile önemli yapısal ve işlevsel benzerlik göstermektedir. Tam virüs olarak bulunan Ty3 virüslerine ek olarak haploid maya genomları birde TY3 elementlerinin LTR bölgeleri (solo LTR elementleri) bulunmaktadır. Solo Ty3 LTR bölgeleri bazı *S. cerevisiae* suşlarında 30 kopya kadar bulunabilir (Kim ve ark. 1998).

2. 3. Ribozomal Frameshift Mekanizması ve Önemi.

Frameshift, mRNA üzerinde translasyonun elongasyon aşaması sırasında okuma çerçevesinin 5' yönde -1 yada 3' yönde +1 yönde değişmesi ile olur. Kayma olasılığını azaltan mutasyonel değişimler, frameshifti azaltma ve elimine etme eğilimindedir. Frameshiftin oluşması için literatürde 3 model vardır. Bunlar; 1) Faktör bağlayıcı model, 2) Durdurucu model, 3) Çözücü-açıcı model 'dir (Brierley ve Ramos 2005).

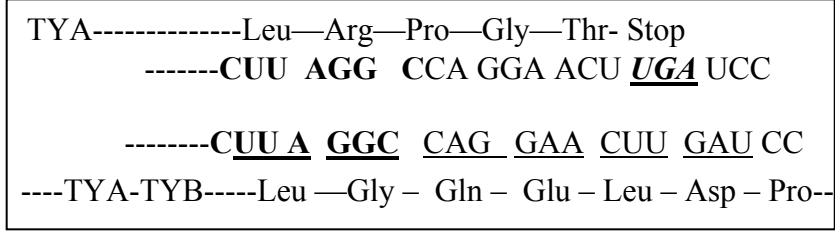
1. model, frameshift işlemine katkıda bulunmaktan yada düzenlemekten sorumlu proteinler için uyarıcı RNA bağlayıcı bölge olarak hareket eder. 2. model, ribozomal durdurma uyarıcı RNA ile karşı karşıya geldiğinde meydana gelir ve frameshift mekanizmasının anahtar elementidir. 3. model, çözücü-açıcı modelde uyarıcı RNA'lar özellikle ribozomla ilişkili kod çözme merkezinin ilerisinde olan çözücü-açıcı mRNA yapılarından sorumlu olan RNA helikazın hareketine dirençlidir (Brierley ve Ramos 2005).

Translasyon sırasında ribozomal frameshift bölgelerinde duraklamayı uzatan 3 tip stimülatör vardır. Bunlar; 1) Boş (Aç) kodonlar, 2) Çerçevdeki anlamsız kodonlar, 3) RNA ikincil yapıları 'dır. Ökaryotik ribozomal frameshift sinyalleri 2 tane temel mRNA elementini içerir. Bunlar; 1) Kaygan diziler (ribozomun mRNA'da okuma çerçevesini değiştirdiği yerler), 2) mRNA'daki uyarıcı ikincil yapılarıdır (çoğu kez mRNA pseudoknatlarından oluşur) (Ian ve ark. 2005).

Ty3'te frameshift bölgesindeki GCG-AGU-U dizisinin translasyonu sırasında frameshift meydana gelir. 3 kodonun önceden +1 yönde frameshifti indüklediği bilinir, CUU,GCG,CCG, frameshifti daha yüksek seviyeye %3,3'den %8,2'ye iletir. Bu kodonlardan başka hiçbir kodon frameshift oranını iletmez. 2 faktör frameshift oranını etkiler (Vimaladithan ve Farabaugh, 1994).

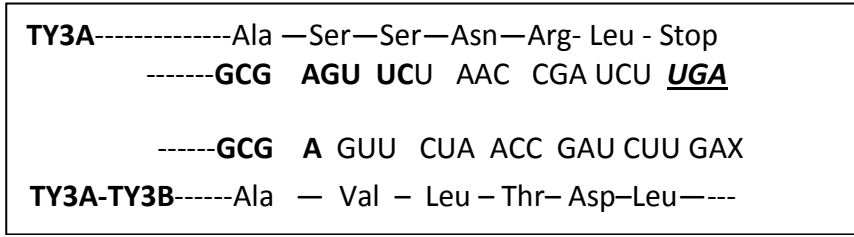
Programlı ribozomal frameshiftin moleküler mekanizmasının anlaşılmasında *S. cerevisiae* Ty1 ve Ty3 virüsleri ile yapılan çalışmalar çok önemli bir yer tutmaktadır. Her iki virüste de frameshift +1 yönünde olmasına rağmen moleküler mekanizmaları

tamamen farklıdır (Farabaugh 1996). Ty1 ve Ty2’de frameshift aynı mekanizma ile gerçekleşir. Bu virüslerde gag-pol kesişim bölgesinde bulunan frameshift dizisi CUU AGG C kodonlarından oluşur. Bu kodonların okunması sırasında AGG kodonunu tanıyan tRNA-Arg’ın sitoplazmada az bulunması ribozomal bekleme (pause) neden olmaktadır. Bu bekleme sırasında da CUU kodona bağlı bulunan tRNA-Leu +1 yönünde bir nükleotid kayarak UUA kodonuna bağlanır (Şekil 2. 2). Bunun sonucu olarak translasyon yeni çerçevede devam ederek gag-pol füzyonu protein sentezlenir (Belcourt ve Farabaugh 1990).



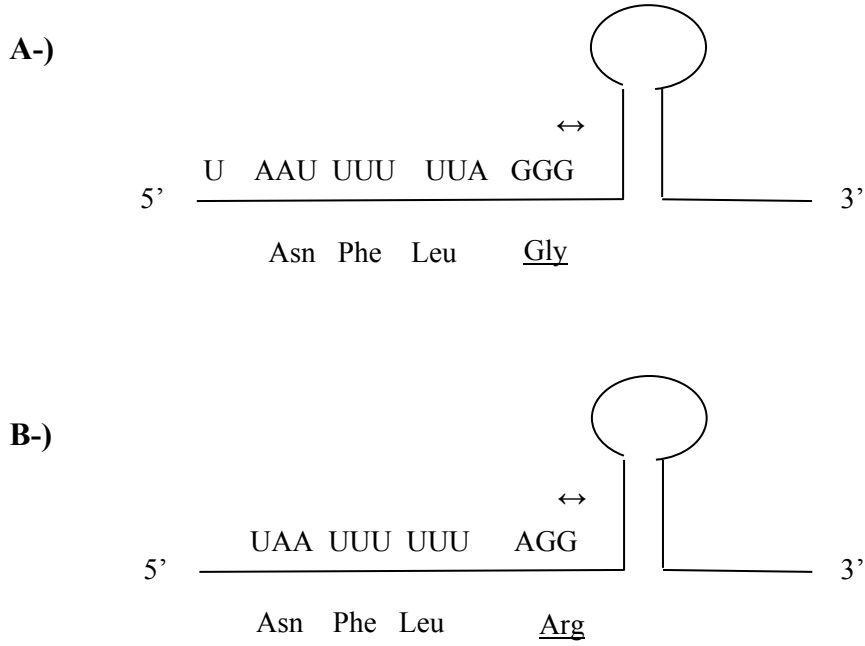
Şekil 2. 2: Ty1’de frameshift bölgesinin nükleotid dizisi.

Ty3 virüsünde ise gag-pol kesişim bölgesinde bulunan frameshift dizisi ise GCG AGU U kodonlarından oluşur. Bu bölgedeki serin amino asidi kodonunu tanıyıp bağlanan ser-tRNA’sının sitoplazmik konsantrasyonunun düşük olması ve mRNA üzerinde aşağıda verilen (şekil 2. 3) frameshift bölgesinin 12 nükleotid uzağındaki mRNA dizisi (context effect) Ty3 tipi frameshifti stimüle eden özellikler olarak belirlenmiştir (Farabaugh ve ark. 1993). Ty3’ün frameshift bölgesinde ribozomun beklemesi sırasında (ribosomal pause) tRNA-ser yerine +1 yönde 1 nükleotid atlayarak valin tRNA’sı GUU kodonuna bağlanmaktadır (Şekil 2. 3). Bunun sonucu olarak translasyon yeni çerçevede devam ederek gag-pol füzyonu protein sentezlenir (Farabaugh ve ark. 1993).



Şekil 2.3: Ty3’de frameshift bölgesinin nükleotid dizisi ve frameshift.

Viral ribozomal frameshift, tipik olarak XXXYYYYZ’nin 7’li kaygan dizisi tarafından yönetilir ve RNA ikincil yapıları (genellikle pseudoknot) tarafından takip edilir. HIV’de bu kaygan dizi U UUU UUA’dır ve bilinen tüm HIV-1 alt tiplerinde tamamen korunur. Translasyon esnasında mRNA üzerinde ilerleyen ribozom ve buna bağlı t-RNA kompleksi, pseudoknot yapısı ile karşılaştığında 1 nükleotid geri kayar ve -1 yönde frameshift meydana gelir ve yeni diziyeye göre protein sentezine devam edilir. HIV-1’de mRNA’nın normal translasyonu (sıfır çerçevede) esnasında sadece Gag proteini sentez edilir ve translasyon yapan ribozomlar gag kodlama bölgesi sonundaki stop kodonunda %90-95 olasılıkla translasyonu sonlandırır (Şekil 2. 4-A). Fakat HIV-1 mRNA’sının gag-pol kodlama bölgesi keşisimindeki yapısı nedeni ile translasyon yapan ribozomlar gag kodlama bölgesi sonundaki stop kodonuna gelmeden -1 yönde 1 nükleotid kayarak okuma çerçevesini değiştirirler. Yaklaşık %5-10 oranında gerçekleşen bu frameshift olayı sonucu okuma çerçevesini değiştiren ribozomlar yeni çerçevede translasyona devam ederek gag-pol polipeptidlerini sentezleyip pol polipeptidi sonundaki stop kodonda translasyonu sonlandırırlar (Şekil 2. 4-B). Normal translasyon ve frameshift bölgesinin nükleotid dizisi ile -1 nükleotid frameshift Şekil 2. 4-A ve B’de gösterilmiştir (Gareiss ve Miller 2009).



Şekil 2. 4: HIV-1'de Frameshift. A: Normal translasyon. B: -1 nükleotid frameshift

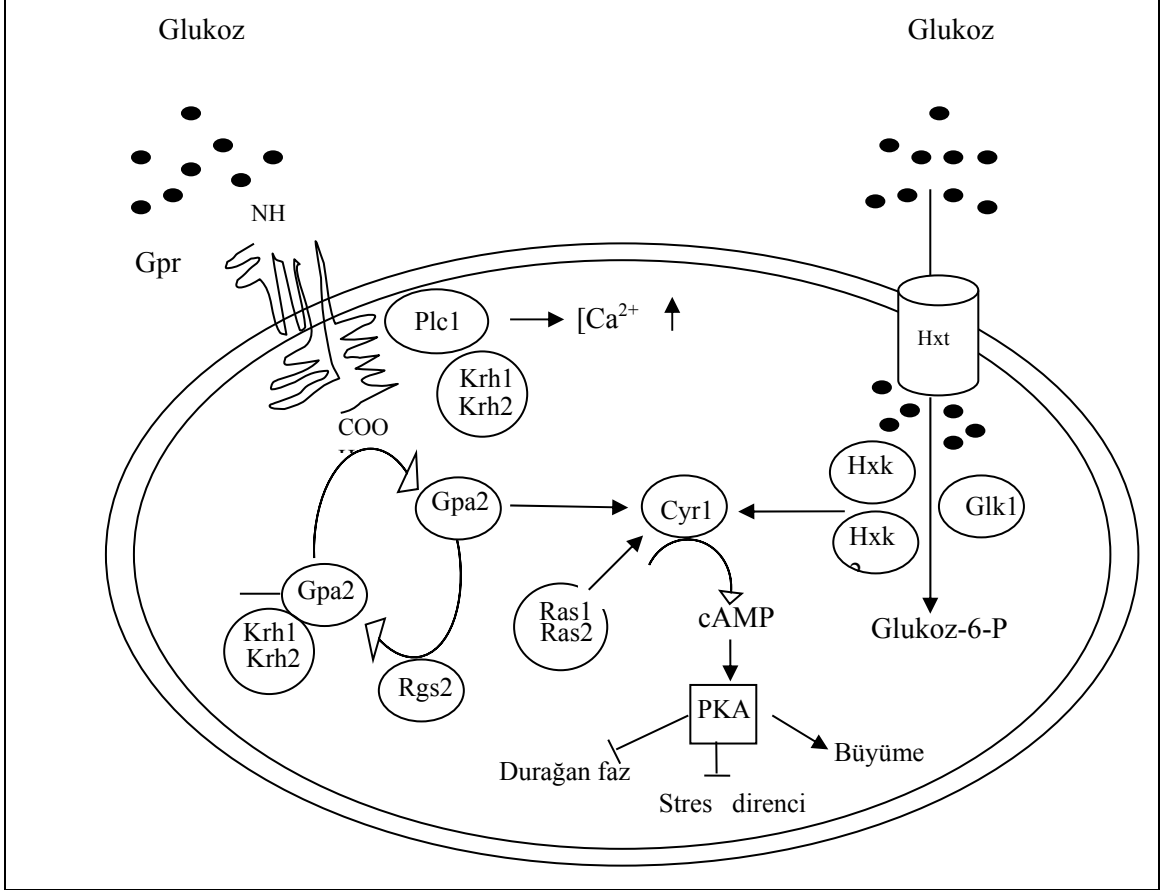
2. 4. *S. cerevisiae*'da Glukoz Sinyal İletimi.

Glukoz, *S. cerevisiae*'da hem karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde ve hem de birçok metabolik olayın kontrol edilmesinde önemli etkiye sahip bir bileşiktir. Glukozun kullanılması çeşitli algılama ve sinyal iletim yollarını içerir ve bu sinyal iletim yollarının bir bölümü şekil 2. 5'de gösterilmiştir. Glukoz hücreye glukoz taşıyıcı HXT (Hexose transporter) kanallar ile alınır. Hekzokinaz1 (Hxk1), Hekzokinaz2 (Hxk2) ve Glukokinaz1(Glk1) ile glukoz fosforilasyonu olur. Hücre içine alınan glukoz glikolitik yolda metabolize edilir.

Glukoz *S. cerevisiae*'da tercih edilen bir karbonhidrattır. Buna ek olarak üreme ortamına glukoz ilave edilmesi *S. cerevisiae*'ya bir hormon gibi etki ederek çok sayıda genin anlatımında (genlerin yaklaşık %30'u) önemli derecede artış veya azalma görülmektedir (DeRisi ve ark. 1997, Wang ve ark. 2004). Üreme ortamında glukozun varlığı *S. cerevisiae* membranında bulunan sensör proteinlerce algılanır. Bu sensör

proteinler Snf3, Rgt2, ve Gpr1'dir (Gancedo 2008). Snf3 düşük konsantrasyonlardaki glukozu (%0.1 veya daha az) algılayan reseptördür. Rgt2 ve Gpr1 ise yüksek glukoz konsantrasyonu ile aktive edilerek glukoz sinyalini sitoplazmaya aktarırlar (Santangelo 2006, Gancedo 2008). Glukoz sinyalinin sitoplazmaya iletilmesi ile çeşitli protein kinazlar ve bunlara bağlı olarak da çeşitli düzenleyici enzimler ve transkripsiyon faktörlerinin aktiviteleri kontrol edilerek *S. cerevisiae* hücrelerinin metabolizmaları ve gen anlatımları kontrol edilmektedir (Gancedo 1998, Santangelo 2006).

S. cerevisiae'da glukoz sinyal iletim yollarından biri olan Ras-cAMP yolu Protein Kinaz-A'yı (PKA) aktive ederek etkisini göstermektedir. Gpr1 ATP'den cAMP sentezini yapan adenilat siklaz enzimini aktive ederek cAMP sentezini uyarır. Sitoplazmik cAMP PKA'nın düzenleyici alt birimi olan Bcy1p'e bağlanarak katalitik alt birim olan Tpk1p'nin serbest hale geçmesini sağlar. Gelişmiş-yüksek eukaryotlarda olduğu gibi, maya adenilat siklaz aktivitesi de G-proteinleri tarafından kontrol edilir. *S. cerevisiae*'daki 2 küçük G proteini Ras1 ve Ras2 adenilat siklaz aktivitesi için gereklidir. Son zamanlarda bir de G-protein'e bağlı reseptör sistemi (GPCR) tanımlanmıştır. Bu sistem cAMP sentezinin glukoz-indükleyen aktivasyonunu spesifik olarak kontrol eder. *S. cerevisiae*'da cAMP sinyali; metabolizma, stres direnci ve proliferasyonun kontrolünde temel rol oynar (Rolland ve ark. 2002).



Şekil 2. 5: *S. cerevisiae*'da Gpr1'e bağlı glukoz algılama mekanizması.

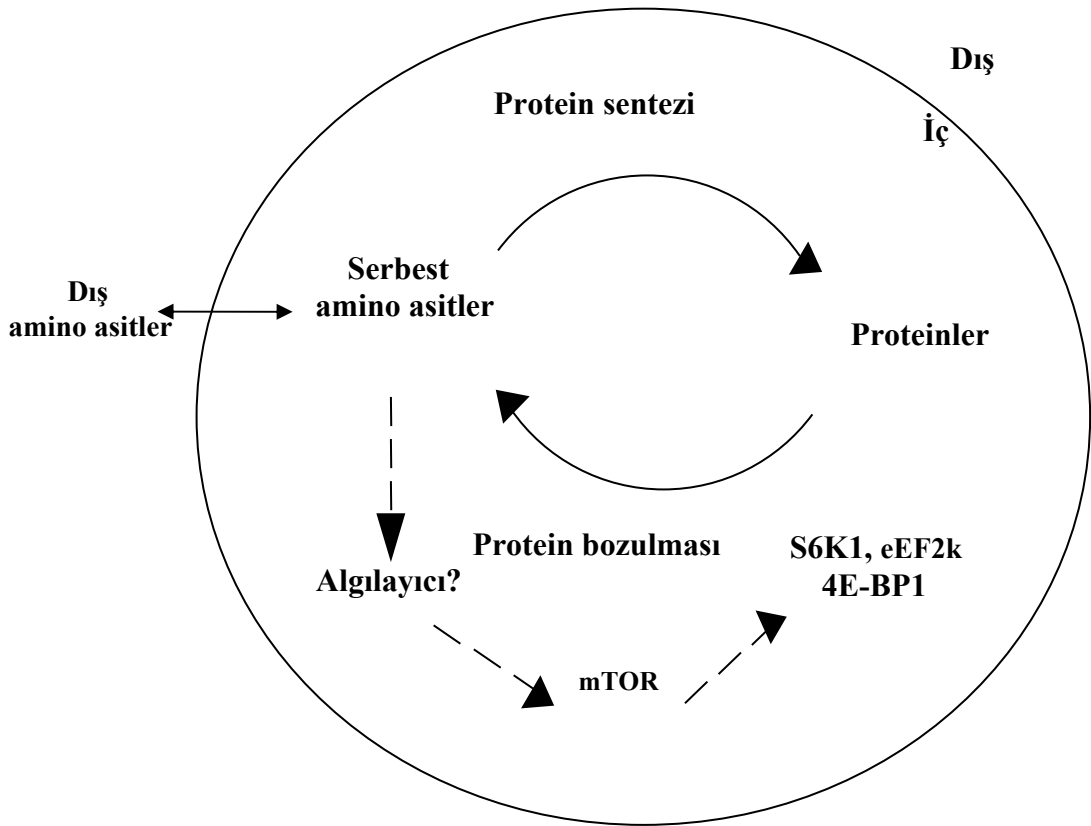
S. cerevisiae üreme ortamında %2 veya daha yüksek konsantrasyonlarda glukoz bulunması glukoz baskılaması (glucose repression) olarak adlandırılan metabolik ve genetik durumun oluşumuna neden olur. Glukoz baskılaması durumunda fermente edilmeyen karbonhidrat kaynakları (gliserol, laktat, etanol) ve sukroz, galaktoz, maltoz gibi karbonhidratların kullanımı ile ilgili enzim veya yapısal protein kodlayan genlerin transkripsiyonu baskılanmaktadır. Glukoz baskılaması altındaki genlerin çoğunun transkripsiyonu Mig1p-Ssn6p-Tup1p kompleksinden oluşan transkripsiyon faktörleri tarafından engellenir, baskılanır (Gancedo 1998, Gelade ve ark. 2003).

S. cerevisiae hücrelerinin yüksek glukoz (%2 veya daha fazla) içeren üreme ortamından düşük glukoz içeren (%0.1 veya daha az) ortama aktarılması veya fermente edilmeyen (gliserol, laktat, etanol) karbon kaynağı içeren ortamlarda üretilmeleri ise glukoz baskılamasının kaldırılmasına neden olur. Derepresyon olarak adlandırılan bu durumda ise *S. cerevisiae* metabolizması yeniden programlanarak *S. cerevisiae* hücrelerinin alternatif karbonhidratları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmaları sağlanır. Derepresyon veya düşük glukoz sinyalini sitoplazmada algılayan faktör ise bir çeşit protein kinaz olan Snf1p'dir (Smets ve ark. 2010). Snf1p glukoz baskılamasına neden olan Mig1p kompleksine etki ederek glukoz baskılamasının sonlandırılmasını sağlar. Snf1p ayrıca genel metabolik sensör olarak da işlev görür (Smets ve ark 2010, Hong ve Calson 2007). Bu özelliği ile Snf1p memeli hücrelerinde bulunan ve düşük enerji seviyesi (yüksek AMP konsantrasyonu) ile aktive edilen AMP'ye bağımlı Protein Kinaz'a önemli işlevsel ve yapısal benzerlik göstermektedir (Hardie 2007).

2. 5. *Saccharomyces cerevisiae*'de Azot Sinyal İletimi.

mTOR (Target of Rapamycin) eukaryotlarda translasyon sisteminin birçok bileşeninin düzenlenmesinde önemli işlevleri olan çok alt birimli bir proteindir. mTOR sinyali bazı hormonlar (örneğin insülin) ve aminoasitler tarafından uyarılır. TOR sinyali, hücre dışı aminoasit düzeyinden ziyade hücre içi aminoasit düzeyine tepki gösterir (Proud 2004). Son zamanlarda elde edilen veriler, muhtemelen hücre içi sensör molekülü aracılığı ile, hücre içi serbest amino asit seviyesinin mTOR aktivitesini

etkilediğini göstermektedir. Hücre içindeki serbest amino asit miktarı, hücre dışından alınan amino asit miktarı ve proteinlerin yıkımı sonucu açığa çıkan amino asit miktarı ile protein sentezi sırasında kullanılmakta olan amino asit miktarı mTOR aktivitesinin kontrolü için önemli değişkenlerdir. Aminoasitler ile mTOR aktivitesinin kontrolü şekil 2. 6’te gösterilmiştir.



Şekil 2. 6. Aminoasit dengesi ve mTOR'un kontrolü.

2. 6. Translasyon Elongasyon Faktörleri ve PRF.

Ribozomal frameshift, translasyonun elongasyon aşamasında olur. mRNA translasyonunun elongasyon aşaması, Metabolik enerjinin önemli bir miktarının gerektiği ve polipeptidlerin sentezlendiği aşamadır. Memelilerde translasyon elongasyonu, ökaryotik elongasyon faktörleri yada eEFs denilen ribozomal olmayan protein grubunu gerektirir. Bu proteinlerin aktiviteleri memeli hücrelerinde fosforilasyon ile kontrol edilmektedir. Elongasyon faktörlerini fosforlayıp translasyonun elongasyon aşamasını kontrol eden faktörler EF Kinazlar olarak bilinmektedir (Donovan ve Bodley, 1991). Elongasyon faktörü EF1 çeşitli alt birimlerden oluşur ve aminoasıl-tRNA'ların (amino asit taşıyan tRNA) ribozoma alınmasında gereklidir. Ribozomal translokasyonu gerçekleştiren faktör ise EF2'dir (Kapp ve Lorsch 2004). EF1 ve EF2'nin aktiviteleri fosforilasyon ile kontrol edilmektedir (Kapp ve Lorsch 2004, Monnier ve ark. 2001). EF kinazların aktivitelerinin MAP kinaz sinyal yolu tarafından ve nutrient-duyarlı mTOR sinyal yolu tarafından kontrol edildiği bulunmuştur. EF kinazlar tarafından EF'lerinin aktivitelerinin kontrol edilmesi translasyonun yavaşlatılmasına neden olur ve böylece bazı özel üreme koşulları altında enerji korunur (Browne ve Proud 2002).

Elongasyon faktörü 3 (EF3), Fungal canlılara özgü bir elongasyon faktörüdür. EF3 molekül ağırlığı 116 kDa olan monomerik bir proteindir. EF3'ün işlevi tam olarak belirli olmamakla birlikte ribozomal okuma çerçevesinin korunması için gerekli olduğu öne sürülmektedir (Chakraborty 1999).

Başlama, sentez ve sonlandırma aşamalarından oluşan translasyonda çeşitli hatalar da olabilir. Bu hatalar: başlama bölgesinin seçiminin değiştirilmesi, ribozomun okuma çerçevesini değiştirmesi, hatalı amino asitin bağlanması, erken sonlandırma gibi translasyon hataları olabilir. Translasyonda oluşan bu tür hatalar sonucu hatalı proteinler üretilir. Translasyonun doğru olarak tamamlanması hem cis hem de trans etkili faktörlere bağlıdır (Valente ve Kinzy 2003).

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3. 1. Araştırmada Kullanılan Maya Suşları.

Bu araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşlarından YST124, YST125, YST159, ve YST214 Frankfurt Üniversitesi *S. cerevisiae* koleksiyonundan sağlandı. *S. cerevisiae* suşu YST101 ise Dr. A. Hinnebusch'tan (National Institutes of Health, ABD) sağlandı. *S. cerevisiae* suşlarının genotipleri çizelge 3.1'de verildi.

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

<i>S. cerevisiae</i> Suşu	Genotipi ve ilgili mutasyonlar
YST101	MAT α , ura3-52.
YST124	MAT a, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0.
YST125	MAT a/ α , his3 Δ 1/his3 Δ 1, leu2 Δ 0/leu2 Δ 0, lys2 Δ 0/LYS2, MET15/met15 Δ 0, ura3 Δ 0/ura3 Δ 0.
YST159	MAT a, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0, YDR477w::kanMX4 (snf1 mutanı)
YST214	MAT a/ α , his3 Δ 1/his3 Δ 1, leu2 Δ 0/leu2 Δ 0, lys2 Δ 0/LYS2, MET15/met15 Δ 0, ura3 Δ 0/ura3 Δ 0, YBR118w::kanMX4/YBR118w (Heterozigot EF1 alfa mutanı)

3. 2. *S. cerevisiae* Suşlarının Üretilmesi.

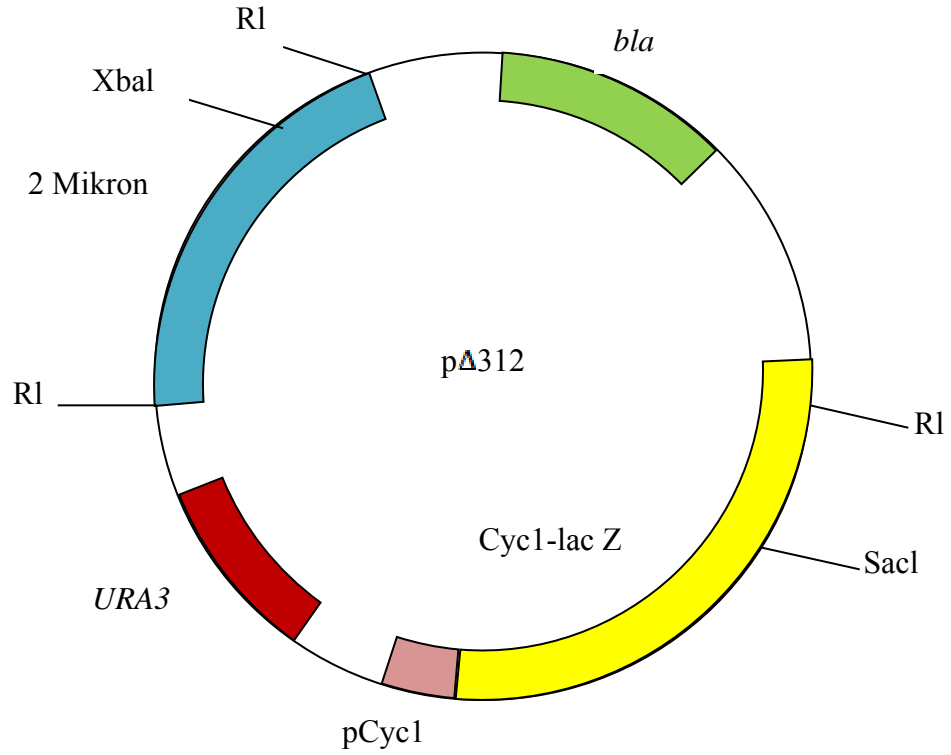
Araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşları YPD (Yeast Ekstrakt, Pepton, Dekstroz) (Ek1) besiyeri içeren 2 ml'lik kültür tüplerinde canlı suşlar olarak yukarıda belirtilen kaynaklardan sağlandı. *S. cerevisiae* suşları steril kürdanlar ile tüplerden alınarak YPD petrilere yayma ekimi yapılarak stok petrilere oluşturuldu. Stok *S. cerevisiae* petrilere araştırmalarımız süresince + 4 °C'deki soğutucu dolapta saklandı.

Ayrıca YPD petrilinde üretilen *S. cerevisiae* suşlarından steril şartlarda alınan örnekler 1 ml steril % 20'lik gliserol içeren mikrofüj tüplerine alınarak -70 °C'deki derin dondurucuda sürekli stoklar olarak saklandı. *S. cerevisiae* suşlarına plazmitler transformasyon ile aktarıldığında oluşan transformant hücreler için urasil içermeyen sentetik tam SC-Ura (Synthetic Complete, minus uracil) ortamı kullanıldı (Rose ve ark. 1990). Araştırmamızda kullanılan besiyerlerinin içerikleri ve hazırlanışları Ek 1'de verildi.

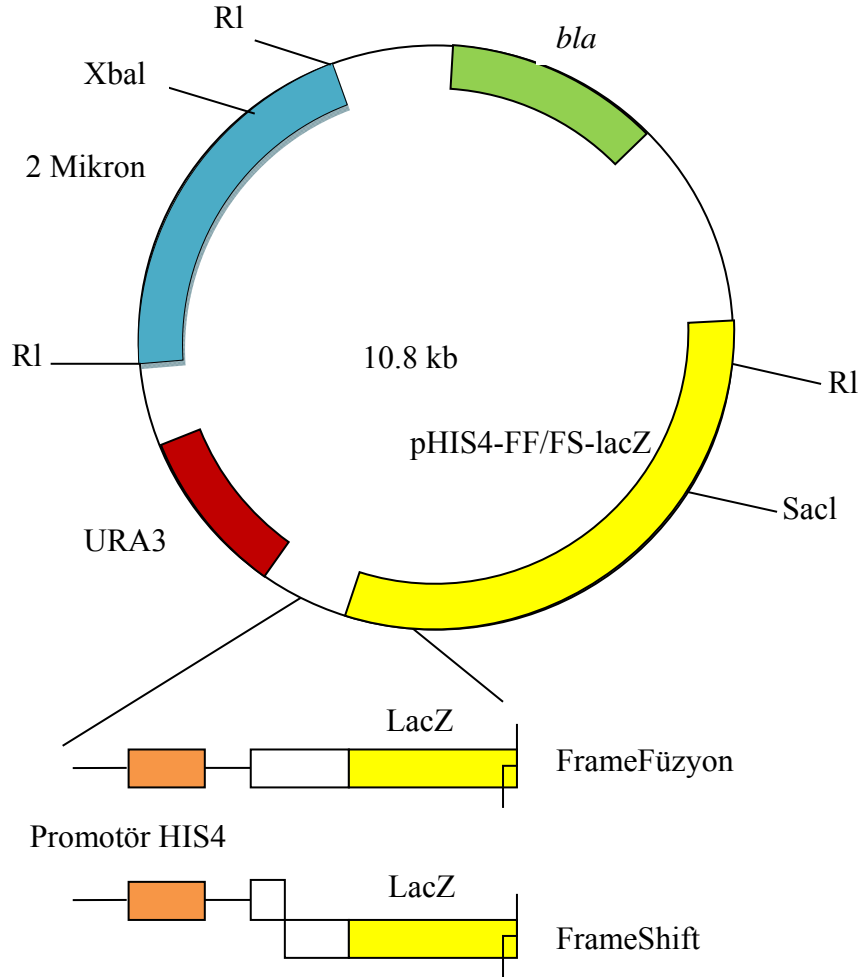
3. 3. Araştırmada Kullanılan Plazmitler.

Bu araştırmada Ty3 virüsünde frameshift oranını belirlemek için pMB38-Ty3FF (Ty3-FF) ve pMB38-Ty3FS (Ty3-FS) plazmitleri kullanıldı. Bu plazmitler *S. cerevisiae*'da otonom olarak replike olabilmek için 2µ plazmitinin gerekli bir bölgesini içerirler. Plazmitlerin içerdiği *URA3* geni ise *S. cerevisiae*'ya transformasyonu için seçici marker genidir. Bu nedenle *URA3* geni mutanlığı *S. cerevisiae* hücrelerinin urasil biyosentezi metabolik yolunu tamamlayıp urasil okzotrofu *S. cerevisiae* hücrelerinin urasil içermeyen minimal ortamda üremelerini sağlar. pMB38 plazmitleri bir çeşit mekik (Shuttle) vektörü olup *E. coli*'de amplifikasyonları için ayrı bir replikasyon orijini (Cole) ve *E. coli*'deki transformantlarının seçilebilmesi için β-laktamaz (bla) geni içerirler. β-laktamaz geni ampisilin ve penisilin benzeri antibiyotiklere direnç sağlar (Belcourt ve Frabaugh 1990). pMB38-Ty3FF plazmiti translasyonel frameshift bölgesinin frame füzyon yapılmış halini içerirken, pMB38-Ty3FS ise Ty3 virüsünün frameshift bölgesini içerir (Belcourt ve Frabaugh 1990, Farabaugh ve ark. 1993). Bu plazmitlerin yapısal özellikleri şekil 3.1'de verildi.

Araştırmalarımız süresince *S. cerevisiae* *Cyc1-lacZ* ve *Gpd1-lacZ* gen füzyonlarını içeren yapısı pMB38 vektörleri gibi olan plazmitler de kontrol gen füzyonunu içeren plazmitler olarak kullanıldı (Rose ve ark. 1981). 2 mikron-URA3 tipi plazmitlerin *S. cerevisiae* hücrelerine transformasyonla aktarıldıklarında ve seçici ortamda üretildiklerinde hücre içinde stabil olarak kaldıkları ve hücrelerde 2-3 kopya olarak buldukları daha önce yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (Liao ve ark. 1989).



Şekil 3. 1. Kontrol plazmiti pΔ312 yapısı ve işlevsel bölgeleri. pΔ312 *S. cerevisiae*'da replikasyon için 2 mikron replikasyon orijini ve seleksiyon için *URA3* geni içerir. *E. coli*'de replikasyon ve seleksiyon için de ayrıca seçilebilir marker gen olarak *bla* (β -laktamaz) ve ColE1 replikasyon orijini içerir. *Sac1*, *Xba1* ve *R1* (Eco R1) ilgili restriksiyon enzimleri tanıma bölgelerini göstermektedir.



Şekil 3. 2. pMB38-Ty3 FS/FF plazmitlerinin yapısı ve işlevsel bölgeleri. Frameshift plazmidleri bir *HIS4* promotoru ve Ty3 elementinin Frameshift bölgesini içerir. Framefüzyon plazmidleri ise framshift bölgesini içermez. Bütün plazmidler seçici bir marker olarak *URA3* geni, Autonom replikasyon için bir 2 μ plazmiti replikasyon orijini ve bakteride amplifikasyon ve seleksiyon için Cole1 replikasyon orijini ve *bla* geni içerirler.

3. 4. Plazmitlerin *E. coli*'ye Transformasyonu ve oğaltılması.

Araştırmalarımızda kullanılan Ty3-FS, Ty3-FF, Cyc1-lacZ ve Gpd1-lacZ plazmitleri stoklardan alınarak çoğaltılmak için önce *E. coli*'ye transformasyonla aktarıldı. Bunun için önce *E. coli* DH5 α hücreleri -70°C'deki stoklardan steril Şartlarda alınarak LB (Luria-Bertani) (Ek1) petrilere çizgi ekimi yapıldı ve petrilere 1 gece 37 °C'de bekletilerek *E. coli* hücrelerinin üremeleri sağlandı. Daha sonra bu petrilere taze *E. coli* kolonileri seçilerek 10 ml LB sıvı ortamına ekim yapıldı ve 16-18 saat, 37°C'de çalkalamalı inkübatörde 140 devir/dakika hızla karıştırılarak (standart Şartlar) n kültürler elde edildi. Bu n kültürlerden 100 μ l alınarak 10 ml'lik taze LB sıvı besiyerine ekim yapıldı ve *E. coli* için standart Şartlarda logaritmik faza kadar üremeleri sağlandı. Bakteri hücreleri, MgCl₂, CaCl₂ yöntemi kullanılarak kompetent hale getirildi (Ausubel ve ark. 1987). Kompetent bakteriden 150 μ l alındı ve yaklaşık 0.1-0.5 μ g plazmit eklendi. Plazmit *E. coli* karışımı buz içinde 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda karışım 42 °C'de 2 dakika ısı Şokuna uğratıldı ve tekrar 2 dakika buzda bekletildi. Daha sonra bakteri-plazmit karışımına 850 μ l LB ilave edildi ve 37 °C'de 1 saat bekletildi. Bu işlemden sonra da transformant bakterilerin seçimi için 100 μ l'lik bakteri karışımı LB-Ampisilin petrilere ekildi ve petrilere 37 °C'de 1 gece bekletildi (Ausubel ve ark. 1987). LB-Ampisilin'de üreyip koloni oluşturan transformantlardan tek koloni alınarak tekrar LB-Ampisilinli petrilere çizgi ekimi yapıldı. Plazmit izolasyonu için bu petrilere steril Şartlarda iyi izole olmuş bakteri kolonileri seçilerek 10 ml'lik sıvı LB-Ampisilin ortamına ekim yapıldı ve standart Şartlarda 1 gece (16-18 saat) remeleri sağlandı.

E. coli'ye transform edilen plazmidler Amresco-Cyclo-Prep miniprep plasmid DNA saflaştırma kiti kullanılarak izole edildi. Bu kit ile 1ml *E. coli*'den 2-15 μ g plazmit DNA'sı saflaştırılabilmektedir. Saflaştırma işleminde üretici firma tarafından verilen yöntem izlendi. Plazmid DNA'ları 100 μ l'lik 1 \times TE (pH: 7.4) zeltisi içinde -20°C'de saklandı.

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

Plazmitlerin *S. cerevisiae* hücrelerine transformasyonunda lityum asetat polietilenglikol yöntemi bazı değişiklikler yapılarak aşağıda verildiği şekilde kullanıldı (Ito ve ark. 1983). Transformasyon için önce *S. cerevisiae* suşlarını içeren stok petrilere steril şartlarda örnekler alınarak 10 ml sıvı YPD ortamına ekim yapıldı. *S. cerevisiae* suşlarını içeren sıvı besiyerleri 30 °C'de 140 devir/dakika hızla karıştırılmalı inkübatörde (standart şartlar) 16-18 saat üretilerek ön kültürler elde edildi. Bu ön kültürlerden 1 ml alınarak taze YPD besiyerine ekim yapıldı ve kültürler standart şartlarda logaritmik faza kadar (OD₆₀₀ : 0.8-1.0) üretildi. Daha sonra *S. cerevisiae* hücreleri 5 dakika 1000 g hızda masa üstü santrifüjde çöktürüldü ve 10 ml steril distile suda yıkandı. Yıkanan hücreler santrifüjleme ile yeniden çöktürüldü ve 3.5 ml taze hazırlanmış steril lityum asetat-TE çözeltisinde (Ek1) süspansiyon edildi ve standart şartlarda çalkalamalı inkübatörde 1 saat inkübe edildi. Lityum asetatla muamele edilmiş *S. cerevisiae* hücrelerinden mikrofüj tüplerine 500 µl alınarak içine 3-5 µg plazmit DNA'sı ile beraber 40-50 µg denatüre edilmiş herring sperm DNA'sı ilave edilip 30 °C'de 30 dakika etüvde inkübe edildi. Daha sonra tüplere 1ml %50 'lik steril Polietilenglikol (PEG 3500) eklendi ve 30 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler 42 °C'de 5 dakika ısı şokuna maruz bırakıldı. Bundan sonra, maya hücreleri 13000 g hızda mikrosantrifüjde 1 dakika santrifüjleme ile çöktürüldü ve 1 ml steril distile su ile yıkandı ve tekrar çöktürülüp 150 µl steril saf suda çözüldü. *S. cerevisiae* suşlarının süspansiyonlarından 100 µl kadar alınıp urasil içermeyen sentetik tam minimal üreme ortamı (SC -Ura + %2 glukoz) petrilere yayma ekimi yöntemi ile ekildi. *S. cerevisiae* YST 101 suşu ise aminoasit okzotrofu olmadığından YNB+%2 glukoz içeren petrilere ekildi.

Petriler 30°C'deki etüvde 3-4 gün inkübe edilerek transformant kolonilerin oluşumu sağlandı. Transformant kolonilerden her bir suş ve plazmit için 6-8 koloni seçilerek taze SC-Ura glukoz petrilere küçük pasajlar yapıldı ve bu pasajların üremesi için petrilere tekrar 30 °C'deki etüvde 3-4 gün bekletildi. Bu şekilde petrilere üretilen *S. cerevisiae* transformantları 4 °C'deki buzdolabında saklandı ve β-galaktozidaz deneyleri için sıvı kültürlerin hazırlanmasında kullanıldı (Guarente 1983).

3. 6. *S. cerevisiae* Transformantlarının Üretilmesi.

Ty3 virüsünde standart şartlarda ve normal üreme ortamındaki frameshift hızını belirlemek için haploid (YST124) ve diploid (YST125) *S. cerevisiae* suşları transformantları 25 ml'lik erlenlerde 5 ml SC- Ura + %2 glukoz içeren sıvı besiyerinde her bir plazmit için 3'lü olarak standart şartlarda 16-18 saat üretilerek ön kültürler elde edildi. Bu ön kültürlerden 150-200 µl alınarak tekrar 5 ml'lik taze SC-Ura +%2 glukoz içeren 25ml'lik erlenlere ekim yapıldı ve bu maya transformantlarının standart şartlarda logaritmik faza kadar üremeleri sağlandı. Logaritmik faz sonunda maya hücreleri çöktürülerek aşağıda açıklandığı şekilde (bölüm 3.7) β -galaktozidaz aktivitelerinin ölçümü için hazırlandı.

Ty3'de frameshift oranına farklı karbon kaynaklarının etkisini belirlemek için *S. cerevisiae* transformantları SC-Ura + %2 gliserol, %2 sodyum laktat içeren üreme ortamlarında standart şartlarda üretilerek hazırlandı ve β -galaktozidaz aktiviteleri belirlendi.

Ty3'de glukoz sinyalinin etkilerini belirlemek için standart şartlarda SC-Ura %2 gliserol, %2 sodyum laktat içeren ortamda logaritmik faza kadar üretilen *S. cerevisiae* kültürlerine son konsantrasyonu %2 olacak şekilde steril glukoz ilave edildi ve *S. cerevisiae* kültürleri standart şartlarda 4-5 saat daha inkübe edilerek çöktürüldü. Bu şekilde hazırlanan *S. cerevisiae* transformantlarındaki β -galaktosidaz aktiviteleri aşağıda açıklandığı şekilde belirlendi.

Ty3'de frameshift oranına azot sinyal iletim yolunun etkilerini belirlemek için *S. cerevisiae* YST101 suşu kullanıldı. SC-Ura ortamı çeşitli aminoasitleri içerdiğinden azot sinyal iletim yolunun Ty3'de frameshiftte etkilerini belirlemek için *S. cerevisiae* transformantları amonyum içermeyen YNB+ %2 glukoz içeren üreme ortamında üretildi (Ek1). Bu üreme ortamına azot kaynağı olarak son konsantrasyonu %0.1 olacak şekilde glutamin veya prolin ilave edildi. *S. cerevisiae* YST101 transformantları yukarıda açıklandığı şekilde standart şartlarda hazırlanarak logaritmik faza kadar

üretildi ve logaritmik faz hücreleri çöktürülerek β -galaktosidaz aktivitelerinin belirlenmesi için aşağıda açıklandığı şekilde hazırlandı.

3. 7. β -Galaktozidaz Aktivitelerinin Ölçümleri.

Hücreler 1000 g hızda 5 dakika santrifüj ile çöktürüldü. Çöken hücreler 1ml distile suda süspanse edildi ve tekrar çöktürüldü. Çöktürülen hücreler 200 μ l Breaking Buffer 'da (Ek1) süspanse edildi. Daha sonra bu *S. cerevisiae* süspanسیونlarına 20 μ l Kloroform ve 20 μ l %0.1 SDS katılarak 10-15 saniye vortekslendi ve *S. cerevisiae* lizatları elde edildi. Permeabilize edilen *S. cerevisiae* lizatlarından 20 μ l alınıp 980 μ l Z-Buffer (Ek1) içine eklendi ve sıcak su banyosunda 30 °C'de 2 dakika ön inkübasyona bırakıldı. Daha sonra reaksiyon tüplerine 200 μ l ONPG (Orto Nitro Phenyl Galactoside) ilave edildi ve yavaşça karıştırıldı. Reaksiyonlar, sarı rengi görünür hale gelene kadar 30 °C'de sıcak su banyosunda bekletildi ve 1 M Na₂CO₃ çözeltisinden her tüp için 500 μ l katılarak β -galaktosidaz reaksiyonları durduruldu. β -galaktosidaz aktiviteleri daha önce tanımlandığı şekilde hesaplandı (Ausubel ve ark. 1993, Guarente ve Ptashe 1981). β -galaktosidaz aktivitesi ölçümlerinde kullanılan permeabilize edilmiş *S. cerevisiae* lizatlarının protein miktarları Lowry yöntemi (Ek1) kullanılarak belirlendi. (Guarente ve Ptashe 1981). Her plazmid için aynı maya suşunun 3 farklı transformant seçilip β -galaktosidaz aktiviteleri 3'erli olarak ölçüldüğünden bir transformant için 9 sonuç elde edildi. Deneyler aynı şartlar altında tekrarlandı ve böylece bir transformant için 18 β -galaktosidaz ölçümü yapılmış oldu. Her grup deney için standart sapmanın daha önce rapor edildiği gibi %10 - %15 aralığında olduğu bulundu. β -galaktosidaz aktiviteleri nmol ONPG / min/ mg protein olarak verildi (Ek 2).

Frameshift oranı, Ty3-FS vektöründen ekspres edilen β -galaktosidaz aktivitesinin Ty3-FF vektöründen elde edilen β -galaktosidaz aktivitesine bölünerek belirlendi (Farabaugh ve ark 1993).

4. BULGULAR

4. 1. Ty3 de PRF Oranına Gen Dozunun Etkileri.

Ty3’de PRF oranına gen dozunun etkilerini incelemek için haploid ve diploid *S. cerevisiae* suşlarını kullanıldı. Ty3-FS, Ty3-FF ve kontrol gen füzyonu plazmitlerini içeren haploid ve diploid *S. cerevisiae* suşları standart şartlarda %2 glukoz içeren üreme ortamında logaritmik faza kadar üretilerek bu gen füzyonlarından ekspres edilen β -galaktozidaz aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlar haploid ve diploid *S. cerevisiae* suşlarında standart üreme ortamı koşullarında Ty3 virüsünde frameshiftin yaklaşık olarak aynı oranda gerçekleştiğini gösterdi (çizelge 4. 1). Her iki *S. cerevisiae* suşunda Ty3 frameshift oranı yaklaşık olarak %4 olarak belirlendi. Araştırmamızda kontrol gen füzyonu olarak kullanılan Cyc1 ekspresyonunun da haploid ve diploid *S. cerevisiae* suşlarında aynı oranda gerçekleştiği bulundu.

Çizelge 4. 1. Gen dozunun Ty3’de PRF oranına etkileri.

<i>S. cerevisiae</i> Suşları	%Frameshift	Cyc1-lacZ
YST124 (Haploid)	4.41 \pm 0.3	199 \pm 5
YST125 (Diploid)	4.03 \pm 0.4	171 \pm 20

4. 2. Haploid *S. cerevisiae*’da Glukoz Sinyalinin Ty3 de PRF Oranına Etkileri.

Standart üreme koşullarında Ty3 tipi frameshift oranı belirlendikten sonra haploid *S. cerevisiae* suşunda Ty3’de frameshift oranına glukoz sinyal iletim yolunun etkileri araştırıldı. Bunun için Ty3 FS, Ty3 FF ve Cyc1 gen füzyonlarını içeren *S.*

cerevisiae transformantları karbon kaynağı olarak gliserol laktat içeren üreme ortamında logaritmik faza kadar üretildi. Bu aşamada *S. cerevisiae* kültürünün yarısı (5 ml) alınarak β -galaktozidaz aktiviteleri belirlendi. Kültürün diğer 5 ml'lik kısmına ise son konsantrasyonu %2 olacak şekilde glukoz ilave edilerek 4-5 saat daha üreme ortamında inkübe edildi ve süre sonunda hücreler çöktürülerek bu hücrelerin de β -galaktozidaz aktiviteleri belirlendi.

Haploid *S. cerevisiae* glukozlu ortamda üretildiğinde % 4.41 olan frameshift oranının, gliserollü ortamda üretildiğinde yaklaşık 2.5 kat artarak %12 olduğu bulundu (Çizelge 4. 2). Gliserol laktatlı ortamda logaritmik faza kadar üretilen *S. cerevisiae* kültürlerine glukoz verildiğinde ise frameshift oranının tekrar standart koşullarda gözlenen frameshift seviyesine (ortalama olarak %4) azaldığı bulundu. Bu sonuç Ty3 tipi frameshift oluşumunun glukoz sinyali ile kontrol edildiğini göstermektedir. Kontrol gen füzyonu olarak kullanılan Cyc1 ekspresyonunun da beklendiği şekilde gliserol laktat içeren ortamda glukoz baskılamasının olmaması nedeni ile önemli miktarda arttığı fakat glukoz eklendiğinde ise glukoz baskılaması nedeni ile tekrar azaldığı belirlendi (Çizelge 4. 2). Kontrol gen füzyonu Cyc1 ile elde edilen bu sonuç araştırmamızda kullanılan *S. cerevisiae* suşunda uygulanan deneysel şartlarda glukoz sinyal iletim yolunun işlediğini göstermektedir.

Çizelge 4. 2. Haploid *S. cerevisiae*'da glukoz sinyalinin Ty3'de PRF oranına etkileri.

Gen Anlatımı	Glukoz	Gliserol laktat	Gly/Lakt'dan Glukoza
%FS	4.41 \pm 0.3	12 \pm 2	4 \pm 0.3
Cyc1-lacZ	199 \pm 5	11195 \pm 337	2221 \pm 74

4. 3. Diploid *S. cerevisiae*'da Glukoz sinyalinin Ty3'de PRF Oranına Etkileri.

Haploid *S. cerevisiae* suşunda glukoz sinyal iletim yolunun TY3'de PRF'e etkileri belirlendikten sonra bu işlem için gen dozajının önemi incelendi. Bunun için aynı işlem diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde tekrarlandı. Fakat beklenmedik bir şekilde Ty3'de PRF'in glukoz sinyal iletimi ile diploid *S. cerevisiae* suşunda oldukça farklı bir şekilde kontrol edildiği bulundu. Gliserol laktat içeren üreme ortamında Ty3'de frameshift oranı %1 olarak gerçekleşti (Çizelge 4.3). Gliserol laktat ortamına glukoz ilave edildiğinde ise frameshift oranının yaklaşık olarak standart, normal seviyelere yükselerek %3 olarak gerçekleştiği bulundu (Çizelge 4.3). Bu sonuçlar glukoz sinyaline göre Ty'de frameshift'in kontrolünde gen dozajının da önemli olduğunu göstermektedir. Araştırmamızda kontrol gen füzyonu olarak kullanılan Cyc1'in diploid *S. cerevisiae* suşunda da glukoz sinyali ile haploid suşta olduğu gibi kontrol edildiği görüldü. Gliserol laktat içeren ortamda aktive edilen Cyc1 ekspresyonunun üreme ortamına glukoz eklenmesi ile tekrar baskılanarak 2.5-3 kat azaldığı bulundu (Çizelge 4. 3).

Çizelge 4. 3. Diploid *S. cerevisiae*'da glukoz sinyalinin Ty3'de PRF oranına etkileri

Gen Anlatımı	Glukoz	Gliserol laktat	Gly/Lakt'dan Glukoza
%FS	4.03 ± 0.4	1 ± 0.25	3.1 ± 0.2
Cyc1-lacZ	171 ± 20	8272 ± 1041	3034 ± 79

4. 4. Elongasyon faktörü EF1 α 'nın Ty3'de PRF oranına Etkileri.

Elongasyon faktörü 1 α 'nın Ribozomal frameshift'in kontrolünde işlevi olduğu ve EF1 α geninin kopya sayısının translasyonel hataların düzeltilmesi için önemli olduğu daha önce yapılan araştırmalarda belirlenmiştir (Song ve ark. 1989, Farabaugh ve Vimaladithan 1998). Bu nedenle Ty3'de frameshift oranına EF1 α 'nın etkisi incelendi. EF1 α gerekli bir gen olduğundan bu genin delesyonu letaldir. Bu nedenle

EF1 α 'nın glukoz sinyaline de bağı olarak Ty3'de frameshift oranına etkileri tek kopya olarak EF1 α içeren heterozigot *S. cerevisiae* suşunda incelendi. Elde edilen sonuçlar hem haploid ve hem de normal diploid *S. cerevisiae* suşları ile karşılaştırıldı (Çizelge 4. 4). Standart üreme koşullarında Ty3'de frameshift oranının EF1 α heterozigotu *S. cerevisiae* suşunda haploid ve diploid suşa göre yaklaşık % 40-50 oranında azalarak % 2.4 olarak gerçekleştiği belirlendi. Gliserol laktat içeren üreme koşullarında ise EF1 α heterozigotu *S. cerevisiae* suşunda frameshift oranının diploid suşa benzer şekilde kontrol edildiği görüldü. Bu sonuçlar glukoz sinyal iletimi ile Ty3'de frameshiftin kontrol edilmesinde EF1 α gen dozunun önemli olmadığını göstermektedir. Araştırmamızın bu bölümünde kontrol gen füzyonu olarak kullanılan Gpd1 ekspresyonunun da beklendiği şekilde glukoz varlığında baskılandığı, gliserol laktat içeren ortamda ise aktive edildiği görüldü.

Çizelge 4. 4. Elongasyon faktörü EF1 α 'nın Ty3'de PRF oranına etkileri

Maya suşları	%FS		Gpd-lacZ	
	Glukoz	Gliserol-Laktat	Glukoz	Gliserol-Laktat
Diploid	4.03 \pm 0.4	1 \pm 0.5	1752 \pm 20	4113 \pm 59
Heterozigot (Δ ef1 α /EF1 α)	2.4 \pm 0.5	1 \pm 0.3	1246 \pm 119	4273 \pm 185

4. 5. Protein Kinaz Snf1'in Ty3'de PRF oranına Etkileri.

Snf1 kinaz düşük glukoz sinyali ile aktive olan ve buna yanıt olarak da hücre metabolizmasını kontrol eden bir sitoplazmik protein kinazdır. Araştırmalarımızda Ty3'de frameshiftin düşük glukoz ortamında aktive edilmesinde Snf1'in herhangi bir işlevi olup olmadığı da snf1 mutanı *S. cerevisiae* suşu kullanılarak araştırıldı. Snf1 mutanı *S. cerevisiae* hücreleri gliserol laktat ortamında canlılıklarını korumakla birlikte bölünemezler. Bu nedenle bu *S. cerevisiae* suşunun transformantları önce glukozda üretilip sonra gliserol laktat ortamına aktarılıp gliserol laktatlı ortamda 24 saat inkübe

edildi. Çizelge 4. 5’de de görüldüğü gibi snf1 mutanlığı *S. cerevisiae* hücrelerinde Ty3’de frameshift oranının glukoz sinyalinde etkilenmediği ve gliserol laktat içeren ortamda frameshift oranında herhangi bir artış veya azalma olmadığı belirlenmedi. Kontrol gen füzyonu Cyc1 ekspresyonu Snf1 kinaza bağılı olarak kontrol edildiğinden snf1 mutanlığı hücrelerde düşük seviyede olup glukoz sinyalinde etkilenmemektedir. Bu sonuçlar düşük glukoz içeren ortamda Ty3’de frameshift oranının kontrolü için Snf1’in gerekli olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4. 5. Protein kinaz Snf1’in Ty3’de PRF oranına etkileri.

Gen Anlatımı	Glukoz	Glukoz’dan Gliserol/Laktat’a
%FS	3.71 ± 0.6	4.2 ± 0.5
Cyc1-lacZ	123 ± 18	77 ± 5

4. 6. Azot Sinyal İletim Yolunun Ty3’de PRF oranına Etkileri.

S. cerevisiae’da azot sinyal iletim yolu da çok sayıda genin ekspresyonunu kontrol etmektedir. Azot sinyal iletim yolunun Ty3’de frameshiftte etki edip etmediği de test edildi. Ty3-FS, Ty3-FF ve Cyc1 gen füzyonları haploid *S. cerevisiae* suşuna transform edilerek transformantlar azot kaynağı olarak glutamin veya prolin içeren ortamlarda üretildi. Bu ortamlarda üretilen *S. cerevisiae* transformantlarında frameshift oranı belirlendiğinde azot sinyal iletim yolunun Ty3’de frameshift oranına çok önemli bir etkisinin olmadığı görüldü (Çizelge 4.6). Azot kaynağı olarak glutamin içeren ortamda frameshift oranı %5 olarak gerçekleşirken, prolin içeren ortamda frameshiftin biraz azalarak %3.5 olarak gerçekleştiği bulundu.

Çizelge 4. 6. Azot sinyal iletim yolunun Ty3'de PRF oranına etkileri

<i>Gen Anlatımı</i>	Glutamin	Prolin
%FS	5 ± 0.6	3.5 ± 0.3
Cycl-lacZ	1168 ± 3	1509 ± 94

5. TARTIŞMA

Programlı Ribozomal Frameshift (PRF) Retrovirüslerde ve çeşitli hücre genlerinde translasyonun elongasyon aşamasında gerçekleşen bir biyolojik reaksiyondur (Farabaugh 1995, 1996). Ribozomal frameshift sonucu aynı mRNA'dan farklı oranlarda çeşitli proteinlerin sentezi gerçekleşir. Programlı Ribozomal frameshift klinik önemi nedeni ile daha çok insan patojeni olan Retrovirüslerde analiz edilmiştir (Jacks ve ark. 1988a, 1988b., Plant ve Dinman 2008). Retrovirüslerde viral propagasyon için gerekli olan enzimlerin kodlandığı pol polipeptidi frameshift sonucu oluşur. Bu nedenle Retrovirüslerde Ribozomal frameshifti durduran çeşitli bileşikler de araştırılmaktadır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda bir çeşit aminoglikozid antibiyotiği olan "Guanidinoneomycin B'nin" HIV1'de frameshiftte neden olan mRNA yapısına bağlanarak frameshifti durdurabildiği bulunmuştur (Stable ve ark., 2008). *S. cerevisiae*'da yapılan çalışmalarda da bazı peptidil transferaz inhibitörlerinin frameshifti durduran anti-retroviral maddeler olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (Dinman ve ark. 1998).

S. cerevisiae genetik ve fizyolojik özellikleri nedeni ile son yıllarda viral araştırmalarda model organizma olarak kullanılmaya başlamıştır. Çeşitli virüsler *S. cerevisiae*'da başarılı bir şekilde üretilerek viral replikasyon mekanizmaları, viral proteinlerin hücre etkileri incelenmiştir (Alves-Rodrigues ve ark. 2006, Galao ve ark. 2007). *S. cerevisiae* kendi genomunda da retrovirüs benzeri genetik elementler içerir. Bu elementler hücre içinde üremeleri sırasında farklı kromozom bölgelerine integre olduklarından başlangıçta maya transpozonu olarak (Transpozon yeast, Ty) adlandırılmıştır (Cameron ve ark. 1979). Daha sonra yapılan araştırmalarda ise bu elementlerin *S. cerevisiae*'da 5 farklı çeşidinin bulunduğu (Ty1-Ty5) ve Retrovirüslerde olduğu gibi RNA aracılığı ile çoğaldıkları bulunmuştur (Boeke ve ark. 1985; Kim ve ark. 1998). Fakat retrovirüslerden farklı olarak Ty virüsleri envelop (zarf) proteini içermezler ve hücreden hücreye de geçemezler. Ty3 *S. cerevisiae* genomunda bulunan ve genom organizasyonu açısından insan retrovirüslerine en çok benzeyen bir virüstür

(Hansen ve ark. 1988). Ty3 virüsü yeni sınıflandırma sistemine göre metavirüs olarak tanımlanmaktadır (Capy 2005).

Ty3 virüsünde de diğer Retrovirüslerde olduğu gibi pol proteini gag-pol protein füzyonu ile ve +1 frameshift mekanizması ile sentezlenir. Ty3'de Ribozomal frameshiftin moleküler mekanizması oldukça iyi aydınlatılmıştır (Farabaugh ve ark. 1993). Bu virüste Ribozomal frameshift mRNA'da gag-pol kodlama bölgesi sınırında valyl-tRNA'nın GUU kodonuna çerçeve dışı bağlanması ile gerçekleşmektedir (Vimaladithan ve Farabaugh, 1994).

Programlı Ribozomal Frameshiftin moleküler mekanizması açıklanmasına rağmen bu olayın değişen hücresel şartlardan nasıl etkilendiği henüz incelenmemiştir. Bununla birlikte translasyonun devam aşamasında gerekli olan elongasyon faktörlerindeki mutasyonların ve mutasyon sonucu tRNA yapılarında oluşan değişikliklerin frameshift hızına etki ettiği rapor edilmiştir (Atkins ve Björk 2009). Elongasyon faktörü EF1 α 'da oluşan mutasyonun özellikle Ty1'de oluşan +1 frameshift hızını değiştirdiği rapor edilmiştir (Farabaugh ve Vimaladithan 1998). Daha sonra yapılan başka bir araştırmada da Ty1 tipi +1 frameshiftin glukoz sinyal iletim yolu ile kontrol edildiği bulunmuştur (Türkel ve ark. 2009). Bu tez araştırmasında ise glukoz ve azot sinyal iletim yollarının Ty3 tipi frameshiftte etkileri incelenmiştir.

Araştırmalarımızda elde edilen sonuçlar Ty3 tipi +1 frameshiftin glukoz sinyal iletim yolu ile kontrol edildiğini göstermektedir. Üreme ortamında glukoz bulunması durumunda ortalama olarak %4 olarak gerçekleşen frameshiftin üreme ortamında gliserol laktat bulunması durumunda haploid hücrelerde 3-4 kat artış gösterdiği ve %12 olarak gerçekleştiği gösterilmiştir. Haploid hücrelerden çok farklı olarak diploid hücrelerde gliserol laktat içeren üreme ortamında frameshiftin çok azalarak %1 olarak gerçekleştiği bulunmuştur. Bu sonuç frameshiftin gen dozajına göre de kontrol edildiği gösteren ilk sonuçtur. *S. cerevisiae*'da genlerin yaklaşık %30'unun glukoz sinyal iletim yolu ile kontrol edildiği bilinmektedir (DeRisi ve ark. 1997, Wang ve ark. 2004). *S. cerevisiae*'da düşük glukoz sinyalini algılayan protein kinaz Snf1p'dir (Smets ve ark. 2010). Snf1p'nin düşük glukoz içeren üreme koşullarında çok sayıda sitoplazmik ve

nükleer faktöre etki ederek hücre metabolizmasının yeniden programlanmasında önemli işlevi olduğu bulunmuştur (Usaitte ve ark. 2009). Bu nedenle araştırmamızda Snf1p'nin Ty3'de frameshift etkisi incelenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar düşük glukoz sinyali ile frameshift oranındaki artışın Snf1p kinaza bağlı olduğunu göstermektedir. Çünkü snf1 geni delesyonlu haploid *S. cerevisiae* hücrelerinde gliserol laktat içeren ortamda frameshift oranında herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Bununla birlikte snf1/SNF1 türü heterozigot *S. cerevisiae* hücrelerinde ise frameshift hızının haploid suş gibi değil de diploid *S. cerevisiae* suşu gibi kontrol edilmesi frameshift oranının kontrolünde diğer genlerin de etkisi olduğunu göstermektedir.

Elongasyon faktörü 1α 'nın (EF1 α) Ty1 tipi frameshift'in kontrolünde yer aldığı daha önce rapor edilmiştir (Farabaugh ve Vimaladithan 1998). Araştırmamızda EF1 α 'nın Ty3 tipi +1 frameshift etkileri de incelendi. EF1 α *S. cerevisiae* için gerekli bir gen olduğundan delesyonu letaldir. Bu nedenle araştırmamızda heterozigot EF1 α mutanlığı (Δ ef1 α /EF1 α) *S. cerevisiae* kullanılarak elde edilen sonuçlar normal diploid *S. cerevisiae*'dan (EF1 α /EF1 α) elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar EF1 α gen dozunun normal şartlarda Ty3'de +1 frameshift için gerekli olduğunu göstermektedir. Diploid *S. cerevisiae* suşu ile kıyaslandığında EF1 α için heterozigot olan *S. cerevisiae* suşunda normal şartlarda frameshift oranında yaklaşık %50'lik bir azalma belirlenmiştir. Fakat gliserol laktat ortamında üretilen *S. cerevisiae* suşlarında heterozigot suşta belirlenen frameshift oranının normal diploid suş gibi oluşması EF1 α 'nın glukoz sinyal iletimi için tek kopya olarak bulunmasının yeterli olduğunu göstermektedir.

Araştırmalarımızda azot sinyal iletim yolunun TY3'de frameshift oranına etkileri de incelenmiştir. *S. cerevisiae*'da tercih edilen azot kaynağı amonyum ve glutamindir (ter Schure ve ark. 2000). Zayıf azot kaynağı olarak kullanılan ve tercih edilmeyen bileşikler ise prolin, üre, allantoin gibi azotlu bileşiklerdir. (Cooper 2002). Azot sinyal iletim yolunda sitoplazmik sensör proteinler Ure2p ve Tor1p'dir (Usaitte ve ark. 2006). *S. cerevisiae*'da genlerin %25'i de azot sinyal iletim yolu ile kontrol edilmektedir (Usaitte ve ark. 2006). Bu nedenle azot sinyal iletim yolunun da Ty3'de frameshift oranına etkileri incelenmiştir. Fakat araştırmalarımızda elde ettiğimiz

sonuçlar Ty3'de frameshiftin azot sinyal iletim yolundan etkilenmediğini ne sürmektedir.

Translasyonun elongasyon aşamasını gerçekleştiren elongasyon faktörlerinin aktivitelerinin çeşitli protein kinazlarca kontrol edildiği bilinmektedir. Özellikle Elongasyon faktörü 2'nin aktivitesinin insan doku kültürü hücrelerinde glukoz sinyali ile kontrol edildiği bulunmuştur (Yan ve ark. 2003). Glukoz sinyalinin çeşitli protein kinazlar aracılığı ile Elongasyon faktörlerinin aktivitelerini kontrol etmesi ile Programlı Ribozomal Frameshift'in de kontrol edilebilen bir işlem olduğu n görülmektedir. Bu bağlamda özellikle *S. cerevisiae*'da Elongasyon faktörleri aktivitelerinin kontrol mekanizmalarının anlaşılması frameshiftin hücresel sinyaller ile nasıl kontrol edildiğinin açıklanabilmesi için önem kazanmaktadır. Araştırmamızda elde edilen sonuçlar TY3'de frameshiftin glukoz sinyali ile kontrol edilen bir işlem olduğunu göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

ALVES-RODRIGUES, I., R.P. GALAO, A. MEYERHANS, J. DIEZ. 2006. *Saccharomyces cerevisiae*: A useful model host to study fundamental biology of viral replication. *Virus Res.*, 2006: 120: 49-56.

ATKINS, J. F., and G. R. BJÖRK. 2009. A gripping tale of ribosomal frameshifting: Extragenic suppressors of frameshift mutations spotlight P-site realignment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 73: 178-210.

AUSUBEL, S. M., R. BRENT., R.E. KINGSTON., D.D. MOORE., J.G. SEIDMAN., J.A. SMITH, and K. STRUHL. 1993. *Current protocols in Molecular Biology*. (New York: Grene Publishing Associates and Willey-Interscience).

BELCOURT, M.F. and P.J. FARABAUGH. 1990. Ribosomal Frameshifting in the yeast retrotransposon Ty: tRNAs induce slippage on a 7 nucleotide minimal site. *Cell*, 62: 339-352.

BILANCHONE, V.W., J.A. CLAYPOOL., P.T. KINSEY and S.B. SANDMEYER. 1993. Positive and negative regulatory elements control expression of the yeast retrotransposon Ty3. *Genetics*, 134: 685-700.

BOEKE, J. D., D. J. GARFINKEL., C. A. SYLES. ve G. R. FINK. 1985. Ty elements transpose through an RNA intermediate. *Cell*, 40: 491-500.

BRIERLY, I., F.J.D. RAMOS. 2006. Programmed ribosomal frameshifting in HIV-1 and the SARS-CoV. *Virus Res.*, 119: 29-42.

BROWNE, G.J. and C.G. PROUD. 2002. Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. *Eur. J. Biochem.*, 269: 5360-5368.

CAMERON, J.R., Y. E. LOH., W.R. DAVIS. 1979. Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell*, 16: 739-751.

CAPY, P. 2005. Classification and nomenclature of retrotransposable elements. *Cytogenet. Genome Res.*, 110: 457-461.

CHAKRABURTTY, K. 1999. Functional interaction of yeast elongation factor 3 with yeast ribosomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 31: 163-173.

CLARK, D.J., V.W. BILANCHONE., L.J. HAYWOOD., S.L. DILDINE and S.B. SANDMEYER. 1988. A Yeast sigma composite element, TY3, has properties of a retrotransposon. *J. Biol. Chem.*, 263: 1413-1423.

- COOPER, T.G. 2002. Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26: 223-238.
- DeRISI, J.L., V.R. LYER, P.O. BROWN. 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 278: 680-686.
- DINMAN, J.D., M.J. RUIZ-ECHEVARRIA, S.W. PELTZ. 1998. Translating old drugs into new treatment: ribosomal frameshifting as a target for antiviral agents. *Trends Biotech.*, 16: 190-196.
- DONOVAN, M.G. and J.W. BODLEY. 1991. *Saccharomyces cerevisiae* elongation factor-II is phosphorylated by an endogenous kinase. *FEBS Lett.*, 291: 303-306.
- FARABAUGH, P.J., H. ZHAO and A. VIMALADITHAN. 1993. A novel programmed frameshift expresses the POL3 gene of retrotransposon Ty3 of yeast: Frameshifting without tRNA slippage. *Cell*, 74: 93-103.
- FARABAUGH, P.J. 1995. Post-transcriptional regulation of transposition by Ty retrotransposons of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 270: 10361-10364.
- FARABAUGH, P.J. 1996. Programmed translational frameshift. *Microbiol. Rev.*, 60: 103-134.
- FARABAUGH, P.J. and A. VIMALADITHAN. 1998. Effect of frameshift-inducing mutants of elongation factor 1 α on programmed +1 frameshift in yeast. *RNA*, 4: 38-46.
- GALAO, R.P., N. SCHELLER., I.A. RODRIGUES., T. BREINING., A. MEYERHANS and J. DIEZ. 2007. *Saccharomyces cerevisiae*: a versatile eukaryotic system in virology. *Microbial Cell Factories*, 6: 32.
- GANCEDO, J.M. 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 334-361.
- GANCEDO, J.M. 2008. The early steps of glucose signaling in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32: 673-704.
- GAREISS, P.C., B.L. MILLER. 2009. Ribosomal frameshifting: An emerging drug target for HIV. *Curr. Opin. Investigational Drugs*, 10: 121-128.
- GELADE, R., S.VAN DE VELDE., P.V. DICK and J.M. THEVELEIN. 2003. Multi-level response of the yeast genome to glucose. *Genome Biol.*, 4: 233.
- GUARENTE, L. and M. PATASHE. 1981. Fusion of *Escherichia coli* lacZ to the cytochrom c gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78: 2199-2203.

- GUARENTE, L. 1983. Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol.*, 101: 181-191.
- HANSEN, L.J., D.L. DOUGLAS and S.B. SANDMEYER. 1988. Ty3, a yeast retrotransposon associated with tRNA genes, has homology to animal retroviruses. *Mol. Cell. Biol.*, 8: 5245-5256.
- HARDIE, D.G. 2007. AMP-activated/SNF1 protein kinase: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 8: 774-785.
- HOLSBEEKS, I., O. LAGATIE., A.V. NULAND., S.VAN DE VELDE and J.M. THEVELEIN. 2004. The eukaryotic plasma membrane as a nutrient-sensing device. *TRENDS Biochem. Sci.*, 29: 556-564.
- HONG, S.-P., and M. CARLSON. 2007. Regulation of Snf1 protein kinase in response to environmental stress. *J. Biol. Chem.*, 23: 16838-16845.
- HUG, A.M., H. FELDMANN. 1996. Yeast retrotransposon Ty4: The majority of the rare transcripts lack a U3-R sequence. *Nucleic Acids Res.*, 24: 2338-2346.
- ITO, H., Y. FUKUDA, K. MURATA, and A. KIMURA. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, 153: 163-168.
- JACKS, T., H.D. MADHANI, F.R. MASIARZ, H.E. VARMUS. 1988a. Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus Gag-Pol region. *Cell*, 55: 447-458.
- JACKS, T., M.D. POWER, F.R. MASIARZ, P.A. LUCIW, P.J. BARR, H.E. VARMUS. 1988b. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 Gag-Pol expression. *Nature*, 331: 280-283.
- KAPP, L.D. and J.R. LORSCH. 2004. The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu. Rev. Biochem.*, 73: 654-704.
- KIM, J.M., S. VANGURI, J.D. BOEKE, A. GABRIEL, D.F. VOYTAS. 1998. Transposable elements and genome organization: A comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *Genome Res.*, 8: 464-478.
- LIAO, X -B., J.J. CLARE, and P.J. FARABAUGH. 1987. The upstream activation site of a Ty2 element of yeast is necessary but not sufficient to promote maximal transcription of the element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84: 8520-8524.
- MONNIER, A., R. BELLE, J. MORALES, P. CORMIER, S. BOULBEN, and O. MULNER-LORILLON. 2001. Evidence for regulation of protein synthesis at the elongation step by CDK1/cyclin B phosphorylation. *Nucleic Acids Res.*, 29: 1453-1457.
- PLANT E.P., and J.D. DINMAN. 2008. The role of programmed ribosomal frameshifting in coronavirus propagation. *Front Biosci.*, 13: 4873-4881.

- PROUD, C.G. 2004. mTOR-mediated regulation of translation factors by amino acids. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 313: 429-436.
- ROLLAND, F., J. WINDERICKX., J.M. THEVELEIN. 2002. Glucose-sensing and – signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research*, 2: 183-201.
- ROTH, J.F. 2000. The yeast Ty virus-like particles. *Yeast*, 16: 785-795.
- ROSE, M.D., F. WINSTON, and P. HIETER. 1990. *Methods in Yeast Genetics. A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- SANTANGELO, G.M. 2006. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70: 253-282.
- SMETS, B., R. GHILLEBERT, P. DE SNIJDER, M. BINDA, E. SWINNEN, C. DE VIRGILIO, J. WINDERICKX. 2010. Life in the midst of scarcity: adaptation to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 56: 1-32.
- SONG, J.M., S. PICOLOGLOU, C.M. GRANT, M. FIROOZAN, M.F. TUIITE, and S. LIEBMAN. 1989. Elongation factor EF-1 α gene dosage alters translational fidelity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 9: 4571-4575.
- STABLE, D.W., V. VENDITTI, N. NICCOLAI, L. ELSON-SCHWAB, Y. TOR, S.E. BUTCHER. 2008. Guanidinoneomycin B recognition of an HIV-1 RNA helix. *Chem. Biochem.*, 9: 93-102.
- STUCKA, R., C. SCHWARZLOSE., H. LOCHMULLER and H. FELDMANN. 1992. Molecular analysis of the yeast Ty4 element: homology with Ty1, copia, and plant retrotransposons. *Gene*, 122: 119-128.
- Ter SCHURE, E.G., A.W.R. NATAL, C.T. VERRIPS. 2000. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.*, 24: 67-83.
- THEVELEIN, J.M., R. GELADE., I. HOLSBEEKS., O. LAGATIE., Y. POPOVA., F. ROLLAND., F. STOLZ., S. VAN DE VELDE., P. VAN DICK., P. VANDORMAEL., A. VAN NULAND., K. VAN ROEY., G. VAN ZOEBROECK and B. YAN. 2005. Nutrient sensing systems for rapid activation of the protein kinase A pathway in yeast. *Biochem. Soc.*, 33: 253-256.
- TÜRKEK, S., Ö. BAYRAM., E. ARIK. 2009. Glucose signaling pathway and growth conditions regulate gene expression in retrotransposon Ty2. *Z. Naturforsch.*, 64c: 526-532.
- USAITE, R., K.R. PATIL, T. GROTKJAER, J. NIELSEN, B. REGENBERG. 2006. Global transcriptional and physiological responses of *Saccharomyces cerevisiae* to

Ammonium, L-Alanin, or L-Glutamine limitation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 6194-6203.

VALENTE, L., T.G. KINZY. 2003. Yeast as a sensor of factors affecting the accuracy of protein synthesis. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, 60: 2115–2130.

VIMALADITHAN, A. and P.J. FARABAUGH. 1994. Special Peptidyl-tRNA Molecules can promote translational Frameshifting without Slippage. *Mol. Cell. Biol.*, 14:8107-8116.

VOYTAS, D.F. and J.D. BOEKE. 1993. Yeast retrotransposons and tRNAs. *Trends Genet.*, 9: 421-427

WANG, Y., M. PIERCE, L. SCHNEPER, ve ark. 2004. Ras and Gpa2 mediate one branch of a redundant glucose signaling pathway in yeast. *Plos Biol.*, 2: E128.

YAN, L., A.C. NAIRN, H.C. PALFREY, M.J. BRADY. 2003. Glucose regulates EF-2 phosphorylation and protein translation by a protein phosphatase-2A-dependent mechanism in INS-1-derived 832/13 cells. *J. Biol. Chem.*, 278: 18177-18183.

7. EKLER

Ek 1: Araştırmada Kullanılan Besi Yerleri ve Çözeltilerin Hazırlanması.

1: YPD (Yeast Ekstrakt, Pepton, Dekstroz)

10 gram yeast ekstrakt, 20 gram pepton toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü. 121 °C’de 25 dakika otoklavda steril edildi.

YPD petrileri için YPD sıvı besiyerine 20 gram/litre olacak şekilde agar eklendi ve 121 °C’de 25 dakika otoklavda steril edildi.

Üreme ortamına karbon kaynağı olarak glukoz ilave edildi, %20’lik stok çözelti olarak hazırlanarak 121 °C’de 25 dakika otoklavda steril edildi. Kullanımdan hemen önce üreme ortamına son konsantrasyon %2 olacak şekilde ilave edildi.

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

6.7 gram YNB 1 litre distile suda çözüldü. 121 °C’de 25 dakika otoklavda steril edildi. YNB katı besiyerini hazırlamak için, 20 gram/litre olacak şekilde sterilizasyondan önce agar ilave edildi. Aminoasit kaynağı olarak urasil içermeyen aminoasit karışımı (Sigma Y-1501) 1.92 gram/litre olacak şekilde hazırlanıp filtre ile steril edildi YNB ortamına eklendi.

3: LB (Luria-Bertani Broth)

10 gram tripton, 5 gram yeast ekstrakt, 10 gram NaCl toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü. 121 °C’de 25 dakika otoklavda steril edildi.

LB-Ampisilin üreme ortamını hazırlamak için, filtre ile sterilize edilmiş ampisilin 100 mg/litre olacak şekilde bakteri transformantları ekim yapılmadan önce taze olarak üreme ortamına eklendi.

LB petrilerini hazırlamak için LB sıvı besiyerine sterilizasyondan önce 15 gram/litre agar eklendi ve 121 °C’de 25 dakika otoklavda steril edildi. Sterilizasyondan sonra besiyeri sıcaklığı 45-50 °C’ye düşüncü filtre ile sterilize edilmiş Ampisilin 100mg/litre olacak şekilde üreme ortamına eklendi.

4: Lityum Asetat-TE

3,5 ml 250 mM Lityum asetat; 10 mM Tris pH:8.0, 1 mM EDTA pH:8.0 ile çözümlenerek hazırlandı.

5: YNB

1,7 g/l Yeast Nitrogen Base

5 g/l (NH₄)₂SO₄

%2 Dekstroz

YNB katı besiyeri hazırlamak için ortama son konsantrasyonu %2 olacak şekilde agar agar ilave edildi.

6:Breaking Buffer

100 mM tris HCl pH:8.0

1 mM DL-Dithiothreitol

%20 (V/V) Gliserol

4mM Fenil Metil Sülfonil Fulorid

7: Z-Buffer

60mM Na₂HPO₄.7H₂O

40 ml NaH₂PO₄.H₂O

10mM KCl

1mM MgSO₄.7H₂O

50mM 2-Merkapto Ethanol

8: a) Lowry A

% 2'lik Na₂CO₃ (0.1 N NaOH ' da çözülmüş)

b) Lowry B

% 0.5 'lik CuSO₄ (% 1' lik NaK-tartarat' da çözülmüş)

Ek 2: β - Galaktosidaz Aktivitesinin Hesaplanması.

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

OD₄₂₀: sarı rengin absorbanası

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 \rightarrow ONPG'nin molar absorpsiyon katsayısı

Protein konsantrasyonu: mg/ml

Lizat hacmi: Değişken (ml)

Zaman \rightarrow Sarı rengin oluştuğu zaman (dak)

β -Galaktosidaz Unitesi dakikada hidroliz edilen nmol ONPG/mg protein olarak verilmiştir.

TEŞEKKÜR

Öncelikle, tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sezai TÜRKEL'e, yüksek lisansıma başlama ve devam etme sürecimde bana her zaman destek veren ve mikoloji konusunda bana çok şey katan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Beyza ENER' e, bugünlere gelmemde en büyük katkıya sahip olan ve hiçbir desteğini esirgemeyen aileme, başarıma her zaman inanan ve her konuda maddi manevi desteğini esirgemeyen eşime sonsuz teşekkür ederim. Araştırmalarımızın gerçekleşmesi için proje desteği sağlayan Uludağ Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri birimine (Proje no: 2009-42) ve araştırmalarım süresince deneylerimde bana yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

05.12.1984'te Bursa ilinde doğdu. İlkokul ve Ortaokulu Setbaşı İlköğretim Okulu'nda, Liseyi Cumhuriyet Lisesi'nde tamamladı. 2002 yılında Ege üniversitesi Biyoloji Bölümü'nü kazanarak lisans eğitimine başladı. 2007 yılında Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu ve aynı yıl Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuar'ında Biyolog olarak çalışmaya başladı. 2008 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Halen Mikoloji Laboratuar'ında Biyolog olarak çalışmaktadır.