



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

**GLUKOZ AKTİVASYONUNUN RETROTRANSPOZON TY2  
TRANSKRİPSİYONUNA ETKİLERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ**

**Elif ARİK**

**Prof. Dr. Sezai TÜRKEKEL  
(Danışman)**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BURSA 2007**

II

T.C  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLUKOZ AKTİVASYONUNUN RETROTRANSPOZON TY2  
TRANSKRİPSİYONUNA ETKİLERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ

Elif ARİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİMDALI

Bu tez 26 / 07 / 2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sezai TÜRKEL  
Danışman

Prof. Dr. Beyza ENER

Doç. Dr. Elif DEMİRKAN

**ÖZET**

Maya retrotranspozonu Ty2-917 virüslerin retroviridae gurubunda yer alır ve maya hücrelerinde retrovirüslere benzer bir mekanizma ile çoğalır. Ty2-917 hem aktivatör ve hem de represör yerler içeren çok kompleks bir transkripsiyon düzenleme bölgesine sahiptir. Ty2 herhangi bir transkripsiyon faktörü kodlamaz ve bundan dolayı da transkripsiyonunun düzenlenmesi tümüyle maya tarafından kodlanan faktörlere bağlıdır. Bu çalışmada glukoz sinyalinin maya retrotranspozonu Ty2-917'ye olan etkileri araştırıldı. *S. cerevisiae* hücrelerinin glukoz veya sukroz içeren ortamda üretilmesi fazla miktarda Ty2 transkripsiyonuna yol açtı. Buna karşın, maya hücrelerinin gliserol laktat veya etanol içeren ortamlarda üretilmesi Ty2-917'nin transkripsiyonunda fazla miktarda azalma ile sonuçlandı. Bununla birlikte maya hücreleri fermentatif üreme ortamına aktarıldığında Ty2-917 transkripsiyonu 13 kat aktive edildi. Buna ek olarak sonuçlarımız glukoz sinyalinin Gcr1p aracılığı ile iletildiğini gösterdi. Ayrıca, cycline bağlı protein kinaz olan Pho85 ile etkileşen cyclin Pcl6'nın da Ty2 transkripsiyonunun glukozla aktivasyonu için gerekli olduğu bulundu. Bu araştırmanın sonuçları retrovirüs benzeri element olan Ty2-917 transkripsiyonunun maya hücreleri içinde metabolik değişikliklere göre düzenlenebildiğini gösterdi.

**Anahtar Kelimeler:** Transkripsiyon, Glukoz Aktivasyonu, Ty elementleri, *S. cerevisiae*, Retrotranspozon, Cyclin,

**ABSTRACT**

The yeast retrotransposon Ty2-917 belongs to retroviridae group and propagates with a retroviral-like mechanism within yeast cells. Ty2-917 has a complex transcriptional regulatory region which contains both activation and repression sites. Ty2 does not encode any transcription factors and hence its transcriptional regulation is completely dependent on the yeast encoded factors. In this study, the effects of glucose signaling on the transcription in the yeast retrotransposon Ty2-917 were analyzed. Growth of *S. cerevisiae* in glucose or sucrose medium led to a high level of Ty2 transcription. On the contrary, Growth of the yeast cells in glycerol lactate or in ethanol medium resulted in a dramatic decrease in the transcription of Ty2-917. However, when the yeast cells were transferred to a fermentable growth medium, Ty2-917 transcription was activated by 13-fold. In addition, our results indicated that the glucose signaling is exerted through Gcr1p for the activation of Ty2 transcription. Moreover, it was also found that the cyclin Pcl6, which interacts with cyclin dependent protein kinase complex Pho85, is also required for the glucose activation of Ty2. The results of this research demonstrated that the transcription of retroviral-like element Ty2-917 can be regulated in response to metabolic changes within yeast cells.

**Key Words:** Transcription, Glucose activation, Ty elements, *S. cerevisiae*, Retrotransposon, Cyclin.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
ÇİZELGELER DİZİNİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Ty Elementlerinin Genel Özellikleri	3
2.1.1. Model Sistem Olarak Retrotranspozonlar	6
2.1.2. Ty2 Elementlerinin Genetik Yapısı	8
2.2. <i>S. cerevisiae</i> 'da Glukozun Metabolik Etkileri	10
2.2.1. <i>S. cerevisiae</i> 'da Glukoz Sinyalinin Algılanması	12
2.2.2. Pho85'in Glukoz Sinyali İletimindeki Önemi	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM	15
3.1. Araştırmada Kullanılan <i>S. cerevisiae</i> Suşları	15
3.2. <i>S. cerevisiae</i> Suşlarının Transformasyon İçin Üretilmesi	16
3.3. Araştırmada Kullanılan Plazmidler	16
3.4. Plazmidlerin <i>E. coli</i> 'ye Transformasyonu ve Saflaştırılması	18
3.5. Plazmidlerin <i>S. cerevisiae</i> 'ya ya Transformasyonu	18
3.6. <i>S. cerevisiae</i> Transformantlarının Üretilmesi	19
3.7. $\beta$ -galaktosidaz Aktivitelerinin Ölçülmesi	20
4. SONUÇLAR	22
4.1. Farklı Karbon kaynaklarının Ty2 Transkripsiyonuna Etkileri	22
4.2. Glukozun Ty2 Transkripsiyonuna Etkileri	23
4.3. Ty2-917 transkripsiyona sukroz ve 2-DOG'un etkileri	25
4.4. Gcr1p'nin TY2'de Glukoz Aktivasyonuna Etkileri	26
4.5. Pho85 Cyclini Pcl6'nın Ty2 Transkripsiyonuna Etkisi	28
5. TARTIŞMA	30
6. KAYNAKLAR	34

EKLER	42
Ek 1. Araştırmada Kullanılan Üreme Ortamları ve Çözeltilerin Hazırlanması	42
Ek 2. $\beta$ -Galaktozidaz Aktivitesinin Hesaplanması	46
TEŞEKKÜR	47
ÖZGEÇMİŞ	48

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

Bla	- $\beta$ -laktamaz
CAMP	- Cyclic Adenosine Monophosphate
CaCl <sub>2</sub>	- Kalsiyum Klorür
CDK	- Cyclin-dependent protein kinase
c DNA	- Copy DNA, Complementary DNA
CLN	- Cyclin
Col E	- Kolişin plazmiti Replikasyon Orijini
CT-Box	- CTTCC dizisi
DAS	- Downstream Activating Site
DRS	- Downstream Repressing Site
DTT	- 1,4-Dithio-DL-threitol
E.C.3.2.1.26	- İntertaz enzimi Enzyme classification sayısı
EDTA	- Ethylenediamine tetraacetic acid
ENV	- Envelop (Viral kılıf proteini)
GAL	- Galactose Metabolism
GCR	- Glycolysis Regulatory Protein
Gly	- Glycerol
Gpr	- G-protein coupled receptor
Grr	- Glucose Repression-Resistant
HCl	- Hidroklorik asit
HIV	- Human Immunodeficiency Virus
His	- Histidin mutanti
HXT	- Hexose Transporter
IN	- İntegraz
ISWI	- Imitation of Switch
KanM	- Kanamycin
KCL	- Potasyum klorür
Lak	- Laktat
LB	- Luria Broth
LTR	- Long Terminal Repeat
M	- Molar
MAT	- Mating Type

## VIII

MgCl <sub>2</sub>	- Magnezyum Klorür
MgSO <sub>4</sub>	.Magnezyum Sülfat
MIG1	- Multicopy Inhibitor of GAL Genes-1
mRNA	- Mesenger RNA
Mth	- MSN 3 homologu
NaCl	- Sodyum Klorür
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	- Sodyum Karbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	- Disodyum Hidrojen ortofosfat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	- Sodyum dihidrojen fosfat
NHP	- Non Histone Protein
OD	- Optical Density
ONPG	- Orto Nitro Phenyl Galactoside
PCL	- Pho85 Cyclin
PH	- Hidrojen iyonu konsantrasyonu
Pho 85	- Fosfat metabolizması
PEG	- Poly Etilen Glikol
PKA	- Protein Kinase A
PR	- Proteaz
PMSF	- Phenylmethanesulfonyl fluoride
RGT	- Restores Glucose Transport
RH	- RNaseH
RNA	- Ribonükleik Asit
RNase-H	- Ribonükleaz-H
rpm	- Revolution Per Minute
RT	- Revers Transkriptaz
SAGA	- Spt-Ada-Gcn5-Acetylase
SC	- Synthetic Complete
SDS	- Sodium Dodesil Sülfat
SNF	- Sucrose Non-Fermenting
SPT	- Supressor of Ty
SSN6	- Supressor of Snf-6
SUC2	- Sucrose Fermentation-2
SWI	- Switch
TE	- Tris Edta Buffer



TUP1	- Timidin Uptake-1
Ty	- Transposon Yeast
UAS	- Upstream Activating Sequence
URA	- Urasil Sentezi
YNB	- Yeast Nitrogen Base
YPAD	- Yeast Extract Peptone Adenin Dextrose
YP	- Yeast Extract and Peptone
YPD	- Yeast Extract Peptone Dextrose
VLP	- Virus Like Particle
A <sub>600</sub>	- 600 nm'deki Absorbans
2DOG	- 2-Deoksi-D-Glukoz
$\alpha$	- Alfa
$\beta$	- Beta
$\epsilon$	- Epsilon
$\lambda$	- Lamda
bç	- Baz çifti
g	- Gravity
kbç	- Kilo baz çifti
kDa	- Kilo Dalton
M	- Molar
ml	- Mililitre
mg	- Miligram
nm	- Nanometre
$\mu$	- Micron
$\mu$ l	- Mikrolitre
$\mu$ g	- Mikro Gram
w/v	- Weight / Volume (ağırlık/hacim)
v/v	- Volume/ Volume (hacim/hacim)
°C	- Santigrad
$\Delta$	- Delta (Delesyon)
%	- Yüzde

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

<b><u>Sekil.</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1. Retrotranspozonların hayat döngüsü	4
2.2. <i>S. cerevisiae</i> retrotranspozonları ve genel yapıları	6
2.3. Ty2-917' de transkripsiyon kontrol bölgeleri	9
2.4. <i>S. cerevisiae</i> ' de glukoz sinyalinin algılanması ve iletilmesi.	13
3.1. Ty2-lacZ gen füzyonunu içeren plazmidin yapısı	17
5.1. Glukozun Ty2 transkripsiyonunu aktive etme modeli	32

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<b><u>Çizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
3.1. Bu araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşlarının genotipleri	15
4.1. Farklı Karbon kaynaklarının Ty2-917’de transkripsiyonuna etkileri	23
4.2. Ty2-917 transkripsiyona farklı glukoz konsantrasyonlarının etkileri.	24
4.3. Ty2-917 transkripsiyona sukroz ve 2-Deoksi-D-Glukoz’un etkileri.	25
4.4. Ty2-917’nin glukoz aktivasyonuna Gcr1p’nin etkileri.	27
4.5. Pho85 Cyclin’i Pcl6’nın Ty2-917 transkripsiyonuna etkileri	29

## 1- GİRİŞ.

*Saccharomyces cerevisiae* genomunda 5 farklı gurup retrovirüs benzeri element belirlenmiştir. Genel olarak bu elementler Ty (Transposon Yeast) olarak adlandırılırlar. Ty elementleri eukaryotik retrovirüslere önemli benzerlikler gösteren ve genom içinde RNA aracılığı ile yer değiştirebilen elementlerdir. Bu elementlerden birisi olan Ty2-917 maya suşlarına göre farklılık göstermekle birlikte genel olarak genomda az sayıda (13 kopya) bulunur (Kim ve ark.1998). Ty2-917'nin *S. cerevisiae* hücreleri arasında enfeksiyonla yayılmadığı varsayılmaktadır. Ty2-917 *S. cerevisiae* populasyonlarında eşleşme ve sporulasyonla yayılır.

Ty2-917'nin nükleotid dizisi tümüyle bilinmektedir. Transkripsiyon kontrol bölgeleri ile protein kodlayan bölgeleri de daha önceki çalışmalarda belirlenmiştir (Liao ve ark. 1989, Farabaugh ve ark. 1987, Farabaugh 1995, 1996). Ty2-917 genomundan tek RNA kodlanır. Poliadenilasyondan sonra diğer mRNA'lar gibi sitoplazmaya taşınan bu mRNA hem translasyonda kullanılır hem de genetik materyal olarak virüs benzeri parçacıklarca (VLP) paketlenir (Boeke ve ark. 1985).

Ty2-917 mRNA'sından kapsit proteinleri (GAG) ile RNA'dan DNA sentezi ve genoma integrasyon için gerekli olan proteinleri (POL) kodlanmaktadır. POL proteini frameshift sonucu GAG-POL füzyonu olarak transle edilir ve daha sonra proteolitik olarak işlevsel alt birimler olan revers transkriptaz, integraz ve RNaseH peptidlerine ayrılır (Farabaugh 1995, 1996). Bu özellikleri nedeniyle Ty2-917 eukaryotik retrovirüslere benzerlik göstermektedir.

*S. cerevisiae*'da glukozun karbon kaynağı olarak kullanılması birçok metabolik yolun aktivasyonuna veya baskılanmasına neden olur (Carlson 1999, Schneper ve ark. 2004). Üreme ortamında glukoz bulunması hücre membranında bulunan reseptörlerce algılanarak glukoz sinyali hücre içine aktarılır. Bunun sonucu olarak da *S. cerevisiae* transkriptomunda önemli değişiklikler oluşur (Rolland ve ark. 2002, Schneper ve ark. 2004). Transkriptomdaki değişiklik de hücre metabolizmasında, hücre döngüsünde değişikliklere neden olur. Sitoplazmada glukoz sinyali ile hedef proteinlerin fosforlanmasını katalizleyen protein kinazlardan en önemlisi cAMP'ye bağlı protein Kinaz A'dır (PKA). Fakat glukoz sinyali ile sitoplazmada cAMP konsantrasyonundaki artışın çok kısa süreli olduğu bulunmuştur. Glukoz sinyalinin hücre içinde hedef

proteinlere iletilmesini sağlayan diğer bir protein kinaz ise Pho85'dir. Pho85 bir çeşit cycline bağlı protein kinaz (CDK) olup farklı metabolik sinyallere gşe 10 farklı cyclin (Pcl) ile etkileşerek aktif hale gelebilir (Carroll ve O'Shea 2002).

*S. cerevisiae*'da global olarak transkriptom profilini değiştirebilen metabolik değişikliklerin Ty2-917'de de transkripsiyona etkilerinin olup olmadığını araştırılması retrovirüslere olan benzerliği nedeniyle önem kazanmaktadır. Ty2-917 genomundan herhangi bir transkripsiyon faktörü kodlanmaz ve bu nedenle de bu elementin transkripsiyonu tamamen konak olarak bulunduğu *S. cerevisiae* tarafından kodlanan transkripsiyon faktörlerine bağlıdır. Bu tez araştırmasında Ty2-917'nin transkripsiyonuna glukoz sinyal iletimin etkileri araştırıldı. Normal ve mutant *S. cerevisiae* suşları kullanılarak üreme ortamında bulunan farklı karbon kaynaklarının Ty2-lacZ gen füzyonlarından Ty2 promotoruna bağlı olarak yapılan transkripsiyona etkileri belirlendi. Glukoz sinyal iletim yolunda yer alan Pho85-Pcl6 kompleksi ve transkripsiyon faktörü Gcr1p'nin Ty2-917 transkripsiyonuna etkileri araştırıldı.

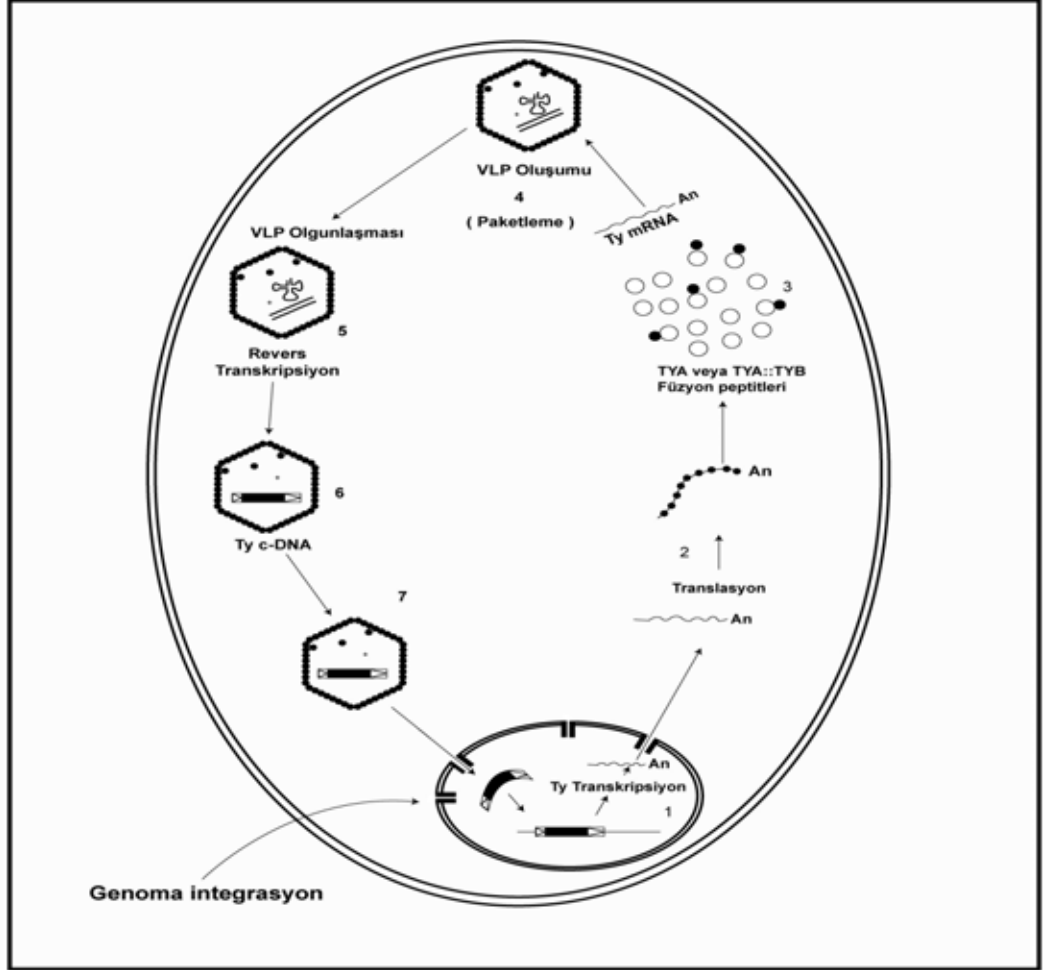
## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2. 1. Ty Elementlerinin Genel Özellikleri

*Saccharomyces cerevisiae* genomundaki bazı genlerin promotor veya yapısal bölgelerinde insersiyon tipi mutasyonlar belirlenmiştir. Bu mutant kromozom bölgelerinin analizi ile de insersiyonların hareketli genetik elementler olduğu bulunmuştur. İlk çalışmalar sonucu bu hareketli genetik elementler Ty (Transpozon yeast) olarak adlandırılmıştır (Cameron ve ark. 1979, Farabaugh ve Fink. 1980). Daha sonra yapılan ayrıntılı çalışmalar sonucu bu elementlerin DNA transpozonlarından farklı olarak genom içinde RNA aracılığı ile bir kromozom bölgesinden başka bir bölgeye veya başka bir kromozoma aktarıldıkları bulunmuştur (Boeke ve Sandmeyer 1991). Ty elementlerinin bu özellikleri nedeniyle daha çok retrovirüslere benzer özellikleri olduğu belirlenmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise Ty retrotranspozonlarının sitoplazmada virüs benzeri partiküller oluşturdukları bulunmuştur (Garfinkel ve ark. 1985). Özellikle Ty1 transkripsiyonu promoturu GAL1 promotörü ile değiştirilerek çok fazla aktive edildiğinde sitoplazmada bu virüs benzeri yapıların sayılarının çok arttığı bulunmuştur (Garfinkel ve ark. 1985). Retrovirüslerden farklı olarak Ty elementleri envelop proteini (ENV) kodlamazlar. Bu nedenle retrovirüslerden farklı olarak hücrelerarası enfeksiyona neden olmazlar (Wickner 1989, Ciriacy 1995, Roth 2000) (Şekil 2.1).

*S. cerevisiae* genomunun tümüyle bilinmesi Ty elementlerinin genom içinde dağılımının da daha iyi analiz edilmesini sağlamıştır. Yapılan genom analizinde *S. cerevisiae*'da 5 farklı tipte Ty elementi (Ty1-Ty5) olduğu bulunmuştur (Kim ve ark. 1998). Bu elementlerin ortak özellikleri 5' ve 3' uçlarında uzun direkt tekrarlı bölgeler (Long Terminal Repeats, LTR) olmasıdır (Şekil 2.2). Ty elementlerinin DNA uzunlukları da farklıdır. Ty1, Ty2 ve Ty4 elementleri yapısal ve genom organizasyonları olarak birbirine benzerlik gösterirler ve yaklaşık olarak 6 kilobaz çifti (Kbç) uzunluğundadırlar. Ty1 ve Ty2 arasındaki homoloji %95'dir (Kim ve ark. 1998). Bu elementlerin LTR bölgelerinin uzunlukları da 330 baz çifti (bç) kadardır. Ty1 en fazla transkribe edilen maya retrotranspozonudur. Yapılan bir çalışmada *S. cerevisiae*'daki toplam RNA miktarının yaklaşık %30 Ty mRNA'sından oluşmaktadır (Elder ve ark. 1983). Ty4 elementinden transkribe edilen mRNA'ların çoğunun tam

olmadığı da (truncated transkript) belirlenmiştir (Hug ve Feldman 1996). Ty elementleri tam Ty elementi olarak *S. cerevisiae* genomunda bulunmakla birlikte aynı veya farklı Ty elementleri arasındaki rekombinasyonlar sonucu sadece LTR bölgelerinden (solo LTR's) oluşan kısa parçalar olarak da *S. cerevisiae* genomunda bulunmaktadırlar (Roeder ve ark. 1980, Scherer ve Davis 1980, Sutton ve Liebman 1992).



**Şekil 2. 1.** Retrotranspozonların hayat döngüsü.

Ty elementlerinin virüslere olan benzerlikleri de tekrar değerlendirilmiştir. Genom dizilerindeki benzerlik nedeniyle Ty1, Ty2 ve Ty4 elementleri Retrovirales Ordo'sunun Pseudoviridae Familyasının Pseudovirüs Genusu içinde sınıflandırılmıştır (Capy 2005). Ty3 retrotranspozonunun genom organizasyonu Ty1 gurubundan oldukça farklıdır.

Genom büyüklüğü yaklaşık 3 Kbç kadardır ve POL bölgesindeki protein dizilişi de Ty1 gurubuna göre farklılık gösterir (Şekil 2.2). Bu nedenle Ty3 retrotranspozonu aynı Retrovirales Ordo'sunun Metaviridae Familyasının Metavirüs Genusu içinde yer almaktadır (Capy 2005). *S. cerevisiae* genomunda tam Ty ve LTR dizisi olarak toplam 331 adet Ty elementleri ile ilgili DNA dizisi belirlenmiştir. Ty elementleriyle ilgili bu DNA'ların toplam uzunluğunun da *S. cerevisiae* genomunun yaklaşık %3.1 oluşturduğu hesap edilmiştir (Kim ve ark. 1998).

Ty retrotranspozonlarının transkripsiyonları RNA polimeraz II tarafından yapılır ve tek çeşit mRNA transkribe edilir. (Jerome ve Jaehning 1986, Nonet ve ark. 1987). Transkripsiyon 5'LTR'daki promotor tarafından başlatılır ve 3' LTR'da sonlanır (Şekil 2. 2). Ty mRNAlarının translasyonu sonucu ilk olarak TYA veya TYA-TYB füzyonu şeklinde iki polipeptid oluşur. TYA daha kısa bir protein olup proteolitik kesimler sonucu Ty Virüs Benzeri Partiküllerin (Ty-VLP) kapsid kısmını oluşturan proteinlerdir. Bu özelliği nedeniyle TYA retrovirüslerdeki GAG polipeptidine benzer. TYB polipeptidi translasyon sırasında ribozomal frameshift sonucu TYA-TYB füzyonu olarak transle edilir (Clare ve Farabaugh 1985, Farabaugh 1995, 1996). Daha sonra proteolitik kesimler sonucu da proteaz, revers transkriptaz, RNaz-H ve integras proteinlerini oluşturur. Bu özelliği nedeniyle de TYA-TYB füzyon proteini retrovirüslerdeki GAG-POL protein füzyonuna benzerlik gösterir (Farabaugh 1995, 1996).

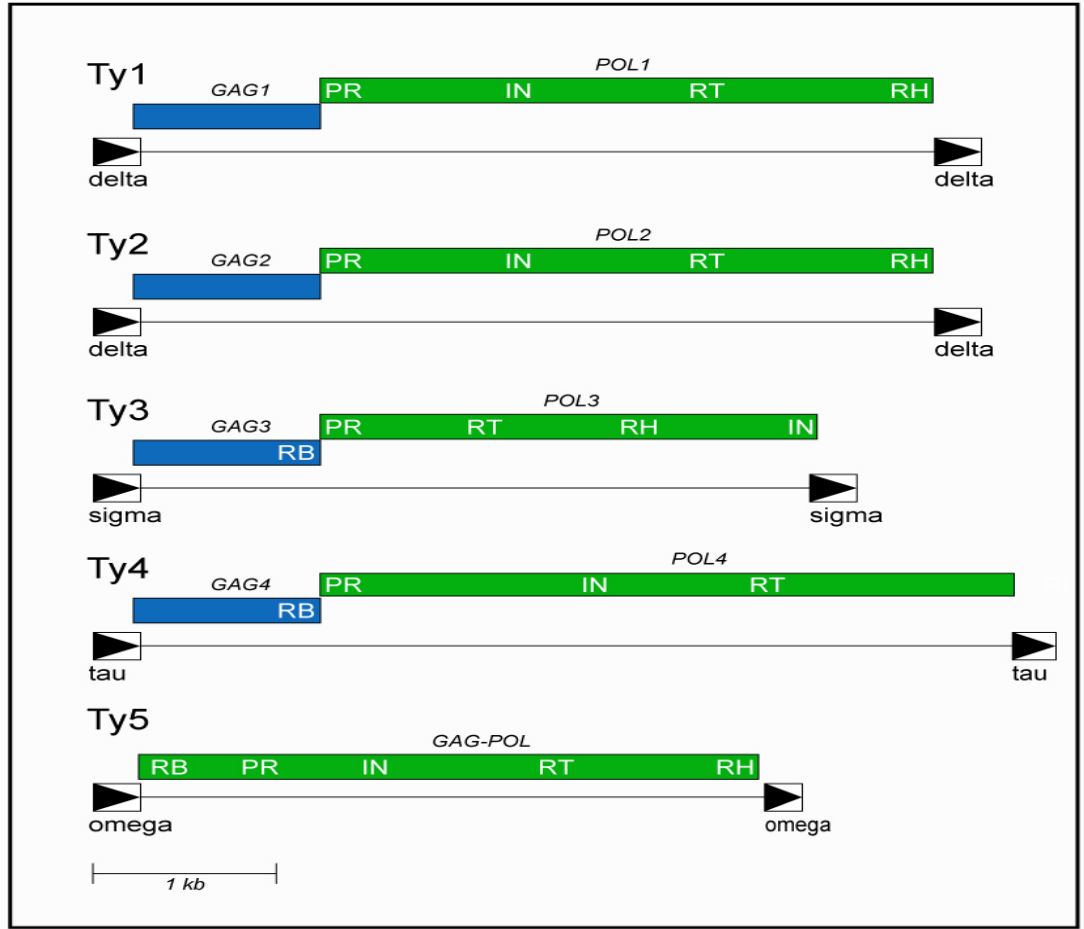
*S. cerevisiae*'da Ty elementleri sitoplazmada ökaryotik retrovirüslerde olduğu gibi virüs parçacıkları oluştururlar. Bu Ty-VLP'da iki adet Ty mRNA'sı bulunur. Bunun dışında revers transkripsiyonda primer olarak kullanılmak üzere bir tRNA molekülü de Ty-virüs benzeri partikül içinde bulunur. VLP'de mRNA'nın revers transkripsiyonunda primer olarak kullanılan tRNA'nın türü retrovirüs türüne göre değişir. Ty2-VLP'de primer olarak kullanılan tRNA normal olarak *S. cerevisiae*'da translasyon sırasında metionin taşıyan tRNAmet'dir (Voytas ve Boeke 1993, Roth 2000).

Ty retrotranspozonları *S. cerevisiae*'nın araştırılan bütün suşlarında bulunmuştur. Doğada Ty elementi içermeyen *S. cerevisiae* suşları çok az sayıdadır ve Ty'sız *S. cerevisiae* suşlarına çok çok nadir olarak rastlanır (Garfinkel ve ark. 2003). Ty elementleri hücreler arası enfeksiyonla yayılamaz. Buna rağmen *S. cerevisiae*



hücrelerinin sıklıkla haploid ve diploid aşamalara girmeleri Ty retrotranspozonlarının da *S. cerevisiae* popülasyonlarında yayılmasına neden olur.

Ty elementlerinde normal olarak transpozisyon frekansı  $10^{-4}$ - $10^{-5}$ /jenerasyondur. Bu yerdeğiştirme en iyi olasılıkla onbin ile yüzbin hücreden birinde her bölünmede bir yerdeğiştirme demektir (Boeke ve ark. 1985). Transpozisyon frekansı bazı mutajenik etmenlerce aktive edilebilir (Staleva ve Venkov 2001).



**Şekil. 2. 2.** *S. cerevisiae* retrotranspozonları ve genel yapıları.

### 2. 1. 1. Model Sistem Olarak Retrotranspozonlar

*S. cerevisiae* model ökaryotik organizma olarak özellikle metabolizmanın analizinde ve farklı metabolik yolların genetik kontrolünde yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikro-array teknolojisinin gelişmesiyle birçok sinyal iletim yolunun

gen ifadesine nasıl etki ettiği belirlenmiştir (Barbara ve ark. 2007, Lopez ve Baker 2000). *S. cerevisiae* kısa hayat döngüsü, haploid veya diploid olarak bulunabilmesi, transformasyonunun kolay olması, üreme ortamının ucuz ve basit olması, patojenik veya toksik bir etkisinin olmaması, endüstriyel bir mikroorganizma olması gibi nedenlerden dolayı ökaryotik moleküler genetik çalışmaları için uzun süredir iyi bir model sistem olarak kullanılmaktadır (Boone ve ark. 2007, Zee ve ark. 2006, Witt ve Flower 2006, Sanz 2007). *S. cerevisiae*'nın bu avantajları ve Ty retrotranspozonlarının retrovirüslere benzerlikleri nedeniyle bu elementlerin gen yapıları, gen ifadesi, genomdaki dağılımları ve genomda oluşturdukları mutasyon tipleri gibi olayların moleküler prensipleri *S. cerevisiae*'da yaygın olarak araştırılmaktadır.

Retrovirüslerde mRNA'dan cDNA sentezi ve cDNA'nın genoma tekrar integrasyonu için gerekli olan enzimler reverse transkriptaz, integraz, ve RNase H retroviral mRNA'nın POL olarak adlandırılan bölgesinden frameshift ile sentezlenir (Jacks ve ark. 1988). Translasyon sırasında oluşan frameshiftin moleküler mekanizması Ty elementlerinde yapılan çalışmalarla ayrıntılı olarak açıklanabilmiştir. Yapılan delesyon analizleriyle Ty1 elementinin TYA (GAG) ve TYB (POL) kodlama bölgelerinin çakıştığı bölgede stop kodon olduğu ve TYB sentezi için kodonların +1 okuma çerçevesinde olduğu görülmüştür (Clare ve Farabaugh 1985). Daha sonra yapılan araştırmalarda TYB'nin TYA ile füzyon proteini olarak sentez edildiği bulunmuştur. Bunun için de TYA-TYB çakışan bölgesinde translasyon yapan ribozomun +1 yönde 1 nükleotit kayarak +1 çerçevesinde translasyona devam eder (Belcourt ve Farabaugh 1990). Ribozomun okuma çerçevesini değiştirmesinin nedeni ise bu bölgedeki Arg kodonunun tanıyan tRNA'nın *S. cerevisiae* genomunda tek kopya olarak bulunması ve sitoplazmadaki miktarının da çok az olmasıdır. Arginin kodonunu okumakta olan ribozom bu tRNA'nın ribozoma bağlanmasındaki gecikme sırasında +1 nükleotit kayarak translasyona devam eder (Belcourt ve Farabaugh 1990, Farabaugh 1996).

Retrovirüslerin hücre içinde çoğalmalarını önlemek için frameshiftin durdurulması gerektiği öne sürülmüş ve anti-retroviral bileşiklerin araştırılmasında da model sistem olarak maya retrotranspozonları kullanılmıştır. Bunun için HIV-Ty gen füzyonları yapılarak antiretroviral maddelerin etkileri Nissley ve ark. (1996, 1998) tarafından analiz edilmiştir. Ayrıca bazı antibiyotiklerin *S. cerevisiae* virüslerindeki

frameshift etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar anisomycin benzeri antibiyotik olan preussin'nin frameshift bölgesinde kodonda -1 yönde 1 nükleotid kayma şeklinde olan frameshift'i durdurabildiğini göstermiştir (Dinman ve ark. 1998).

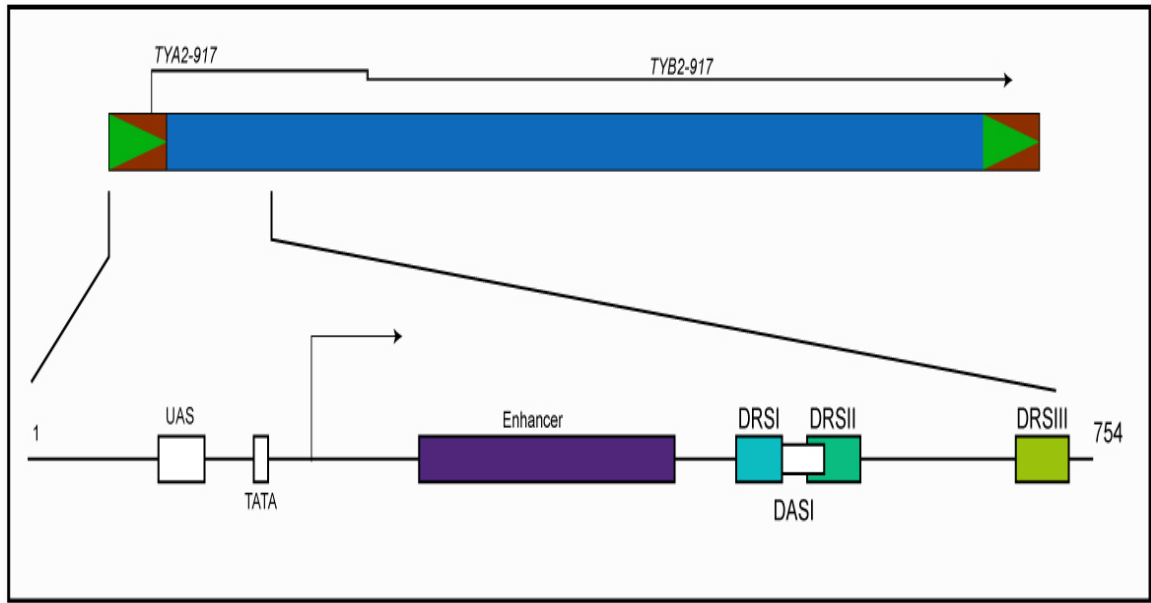
Retrovirüslerin konak hücrelerde genoma integrasyonlarının nasıl yapıldığı ve integrasyonun rastgele olup olmadığı da Ty elementleri kullanılarak araştırılmıştır. Ty elementlerinin integrasyonun çoğunlukla genomda genlerin kodlama bölgeleri dışında kalan bölgelerde olduğu bulunmuştur (Eibel ve Philippsen 1984, Ji ve ark. 1993). Ty3 retrotranspozonlarının en sık görüldüğü bölgeler tRNA genlerinin promotor bölgeleridir (Chalker ve ark. 1992, Devine ve Boeke 1996). Bu rastgele olmayan integrasyonun moleküler nedenleri araştırılmış ve heterokromatin yapısında bulunan Sir4 proteini ile integrasyonun etkileşimi nedeni ile olduğu görülmüştür (Zhu ve ark. 2003). Bu sonuçlar Ty elementlerinin genomda integrasyonlarının rastgele olmadığı ve *S. cerevisiae* genomunda belirli bölgelere daha yoğun integrasyon olduğunu göstermektedir. Ty retrotranspozonlarının genom evolusyonuna etkileri de araştırılmış ve bu elementlerin *S. cerevisiae*'da kromozom yapılarında ve sayılarında değişimlere neden olduğu görülmüştür (Garfinkel 2005).

## 2. 1. 2. Ty2 Elementlerinin Genetik Yapısı

Ty2 elementleri *S. cerevisiae* genomunda 13 kopya olarak bulunur (Kim ve ark. 1998). İlk kez *HIS4* geni promotor bölgesinde insersiyon elementi olarak bulunmuş ve nükleotid dizisi belirlenmiştir (Fink ve ark. 1981., Winston ve ark. 1984). *S. cerevisiae* genomu analizi sonucu Ty2 elementine çok fazla derecede homoloji gösteren Ty1/Ty2 hibrid elementlerinin olduğu da görülmektedir. Araştırmalarımızda model sistem olarak kullanılan Ty2-917 retrotranspozonunun moleküler yapısı daha önceki çalışmalarda belirlenmiştir. Toplam uzunluğu 5.9 Kbç olup LTR elementlerinin uzunlukları da 330-335 bç kadardır (Şekil 2. 3). Transkripsiyon 5' LTR içinden 240. nükleotitten başlayıp 3' LTR'ın 285 bç kısmında sonlanır ve sonuçta 5.2 baz uzunluğunda polyadenillenmiş mRNA oluşur (Farabaugh ve Fink 1980, Roeder ve ark. 1980).

Ty2-917'nin transkripsiyonunu kontrol eden düzenleyici bölgeler 5' LTR bölgesinde yer alır. Bu düzenleyici bölgeler upstream activating sequence (UAS), TATA kutusu, enhancer elementi ve negatif düzenleyici bölgedir (Liao ve ark. 1987.,

Farabaugh ve ark. 1989). TATA kutusu transkripsiyonun başlama bölgesinden 74 bp uzaklıkta olup 167-173 bp bölgeleri arasında bulunur. UAS ise enhancer elementi ile birlikte Ty2 transkripsiyonunun maksimal seviyede yapılması için gereklidir ve 95-131 bp arasındaki bölgede yer alır. Enhancer elementi kısmen transkribe edilen bölgenin içinde yer alır ve 240-555 bp arasında yer alır (Şekil 2. 3). UAS ve enhancer elementi transkripsiyona pozitif yönde etki ederler ve heterolog promotörlerin 5' yönlerine klonlandıklarında klasik eukaryotik aktivatör dizileri gibi transkripsiyonu aktive ederler (Farabaugh ve ark. 1989., Farabaugh ve ark. 1993).



**Şekil 2. 3.** Ty2-917'de transkripsiyon kontrol bölgeleri.

UAS ve enhancer bölgelerinin moleküler analizleri yapılarak bu bölgelere bağlanan transkripsiyon faktörleri de belirlenmiştir. Yapılan araştırmalarda bu bölgelere bağlanan transkripsiyon faktörlerinden birinin Gcr1p (Glycolysis regulatory protein 1) olduğu belirlenmiştir (Türkel ve ark. 1997). Gcr1p glikolitik enzimlerin transkripsiyonu için gerekli olan bir transkripsiyon faktörüdür (Baker 1986). Gcr1p birçok genin promotör bölgesine Gcr2p olarak bilinen bir başka transkripsiyon faktörü ile dimer oluşturarak bağlanır (Uemura ve Jigami 1992). Gcr2p'nin Ty2 transkripsiyonuna etkileri de incelenmiştir ve Gcr1p kadar olmamakla birlikte Gcr2p'nin de Ty2-917

transkripsiyonunun maksimum seviyede yapılabilmesi için gerekli olduğu görülmüştür (Türkel 2002).

Ty2-917'de transkripsiyonun kontrol bölgelerinin promotorun 5' ve 3' yönünde yerleşmesi etkin bir transkripsiyon başlama kompleksinin oluşmasını fiziki olarak güçleştirmektedir. Bu tür promotor yapılarında düzenleyici elementlerin etkileşebilmesi için DNA bölgelerinin katlanarak birbirine yakınlaştığı bilinmektedir (Paull ve Johnson, 1995). DNA'da katlanmalara neden olan faktörler, nükleozomlar ve diğer kromatin faktörleridir (Shidlovskii ve Nabirochkina 2005).

Ty2-917 transkripsiyonuna kromatin modifiye edici faktörlerin etkileri de araştırılmıştır (Yenice 2005, Türkel ve Yenice 2006). Bu konuda yapılan araştırmalar Ty2 transkripsiyonunun tam olarak yapılabilmesi için kromatin faktörleri non-histon protein 6A ve 6B (Nhp6A/B), Isw2p ve Spt7p'nin gerekli olduğu bulunmuştur (Yenice 2005, Türkel ve Yenice 2006). Nhp6A/B'nin DNA'da katlanmalara neden olduğu bilinmektedir (Paull ve Johnson 1995). Isw2p'nin de ATP'ye bağlı olarak kromatin katlanmalarına neden olabilen bir faktör olduğu bilinmektedir (Corona ve Tamkun 2004). Spt7p ise kromatin organizasyonunu değiştiren SAGA kompleksinin bir alt birimidir (Dudley ve ark. 1999).

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

*S. cerevisiae* birçok monosakkarit ve disakkarit'i karbon kaynağı olarak kullanmakla birlikte glukoz ve fruktoz bu organizma tarafından tercih edilen başlıca karbon kaynaklarıdır (Carlson 1999, Gancedo 1998). Özellikle glukozun üreme ortamında karbon kaynağı olarak bulunması birçok metabolik olayı etkilemektedir. Bu metabolik olaylardan genetik ve biyokimyasal olarak en iyi analiz edilenler ise glukoz baskılaması ve glukoz aktivasyonudur. Gliserol ve laktat gibi non-fermentatif karbon kaynağı içeren ortamlarda üretilmekte olan *S. cerevisiae* kültürlerine glukoz ilave edilmesi sonucu *S. cerevisiae* genomundaki genlerin %30'unda transkripsiyon seviyelerinin değiştiği bulunmuştur (Schneper ve ark. 2004). Üreme ortamında yüksek oranlarda (%2) glukoz bulunması birçok genin transkripsiyonunu baskılar (Carlson 1999). Ortamdaki yüksek glukoz nedeniyle transkripsiyonları baskılanan genlerin çoğu alternatif karbon kaynaklarının kullanımı için gerekli olan genler ile bazı mitokondrial genlerdir. Buna en iyi örnek sukrozun hidrolizi için invertaz enzimini kodlayan *SUC2*

geninin yüksek glukoz sinyali ile bazı repressör proteinlerce baskılanmasıdır (Carlson ve Botstein 1982). Yüksek glukoz sinyali ile *SUC2* ve diğer hedef genleri baskılayan represör protein Mig1p kompleksidir (Treitel ve Carlson 1995). Mig1p'nin hücre içindeki yeri de glukoz miktarına göre düzenlenir. Ortamda yüksek glukoz bulunduğunda Mig1p sitoplazmadan nükleusa geçerek hedef genlerin promotörlerine bağlanıp baskılanmaya neden olur. Promotara bağlanan Mig1p Ssn6p ve Tup1p olarak bilinen iki farklı faktör ile de etkileşir. Ortamda glukoz tüketildiğinde ise Mig1p nükleustan tekrar sitoplazmaya taşınır (DeVit ve ark. 1999). Bu şekilde hedef genler üzerindeki baskılanma da sonlanmış olur. Bu olaya genel olarak derepression denilmektedir.

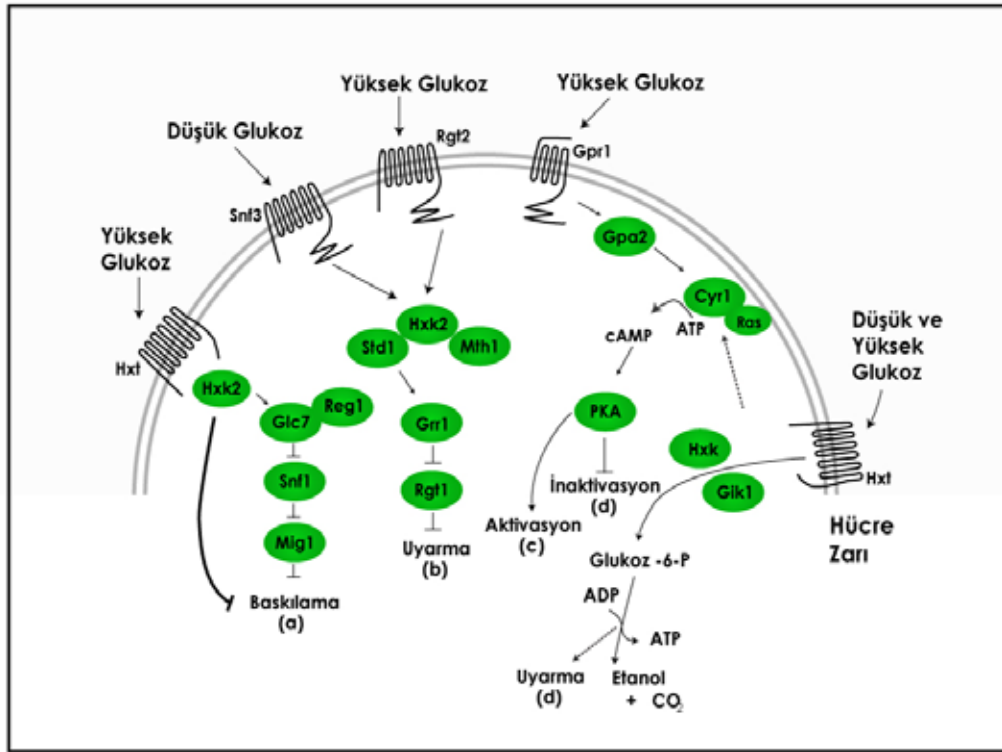
Glukoz sinyali ile ribozomal protein genlerinin transkripsiyonları da aktive edilmektedir. Bu şekilde glukoz sinyali ile protein sentezi miktarı ve buna bağlı olarak da hücre döngüsü kontrol edilmektedir (Santangelo 2006). Glukoz sinyali ile glikolitik genlerin transkripsiyonlarında da hızlı bir artış olmaktadır (Boles ve ark. 1997). Ayrıca *S. cerevisiae* hücrelerinin düşük glukozdan yüksek oranda glukoz içeren ortama aktarılması sonucu hücrelere glukoz girişi de artış gösterir. Glukoz aktivasyonu olarak bilinen bu kontrol mekanizmasının bir tür transkripsiyon faktörü olan ve hedef genlerin promotör bölgelerindeki aktivatör dizisine bağlanan Gcr1p tarafından sağlandığı gösterilmiştir (Rolland ve ark. 2002., Santangelo 2006).

Gcr1p bir tür fosfoprotein olup hedef genlerin promotörlerindeki CTTCC dizisine (CT-Box) bağlanmaktadır (Baker 1991). Gcr1p aynı zamanda Gcr2p olarak bilinen transkripsiyon faktörü ile de etkileşerek heterodimer oluşturabilir (Uemura ve Jigami 1992). Gcr1p kompleksi glikolitik genlerin ve bazı hekzos transport (*HXT2* ve *HXT4*) genleri promotör bölgelerine spesifik olarak bağlanıp bu genlerin transkripsiyonlarını aktive eder (Baker 1991, Türkel ve Bisson 1999). Gcr1 geni delesyon ile yok edilmiş olan *S. cerevisiae* hücrelerinde glikolitik enzim seviyeleri normal, yaban tip suşun ancak %1-3'ü kadardır (Baker 1986). Bu nedenle *gcr1* mutanı *S. cerevisiae* hücrelerinin glukoz içeren üreme ortamındaki ikilenme süreleri çok uzundur (Lopez ve Baker 2000).

### 2. 2. 1. *S. cerevisiae*'da Glukoz Sinyalinin Algılanması

*S. cerevisiae*'da glukoz sinyalinin algılanması ve membrandan hücre içine iletilmesinde birden çok reseptör veya glukoz sensörü kullanılmaktadır (Schneper ve ark. 2004, Roland ve ark. 2002). Glukoz algılama sistemlerinden hangisinin kullanılacağı hem glukoz konsantrasyonuna hem de hücrenin fizyolojik durumuna bağlıdır. Hücre zarında glukoz algılamasında yer alan sensör proteinler Gpr1p, Snf3p ve Rgt2p'dir (Şekil 2.4). Bu sensör proteinler farklı glukoz konsantrasyonlarının algılanmasında yer alır (Santangelo 2006). Snf3p ve Rgt2p sensörlerinin yapılarında glukoz bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. Snf3p düşük glukoz konsantrasyonunun algılanmasında kullanılırken Rgt2p yüksek glukoz konsantrasyonlarının algılanması için kullanılan sensörlerdir (Roland ve ark. 2002). Bu hücre zarına bağlı glukoz sensörlerinden başka hücre içi glukozun algılanmasında yer alan faktörler de vardır. Bunlar Hxk2p ve Ras proteinleridir. Glukozun hücre içine alınmasıyla Ras adenylat cyclase enzimini aktive ederek hızlı bir şekilde kısa bir süre için sitoplazmik cAMP miktarının artışına neden olur. Bu artış da inaktif durumundaki protein kinaz A'nın aktif duruma geçmesi ile sonuçlanır. Aktif protein kinaz A ise sitoplazmada hedef proteinleri fosforile ederek etkisini gösterir (Santangelo 2006).

Snf3p ve Rgt2p sensörleri ise glukoz sinyal iletiminde farklı sitoplazmik protein komplekslerini kullanırlar. Bu sitoplazmik proteinler Mth1p ve Rgt1p'dir. Düşük glukoz varlığında Snf3p Mth1p'e etki ederek Grr1p'i aktive eder. Aktif Grr1p de Rgt1p'i inaktive ederek glukoz taşıyıcıları olan *HXT1-HXT4*'ün transkripsiyonları yapılamaz. Yüksek glukoz da ise Rgt2p Mth1p ve Grr1p aracılığı ile Rgt1p'i aktive ederek *HXT1-HXT4* genlerinin transkripsiyonlarını sağlar (Roland ve ark. 2002). Yeni elde edilen araştırma sonuçlarına göre PKA sinyal iletim yolu da Rgt1p aracılığı ile de etkisini gösterebilmektedir (Şekil 2. 4). (Kim ve Johnston 2006). Bu şekilde, glukoz sinyal iletiminin hücre içine aktarılması ve sitoplazmadaki enzim ve transkripsiyon faktörlerine iletilmesi çok kompleks bir yapıda olup birçok protein-protein etkileşimi sonucu gerçekleşmektedir.



Şekil 2. 4. *S. cerevisiae*'de glukoz sinyalinin algılanması ve iletilmesi.

*S. cerevisiae*'de glukozun hücre içine alınması kolaylaştırılmış diffüzyon mekanizmasıyla olup, çok sayıda glukoz taşıyıcı (Hexose transporters, Hxt) tarafından yapılmaktadır. *S. cerevisiae*'de 17 farklı *HXT* geni (*HXT1-HXT17*) belirlenmiştir (Boles ve Hollenberg 1997). *HXT* genleri arasında homoloji çok yüksek olmasına rağmen bu genlerin ifadeleri çok farklıdır. Bir bölümü üreme ortamında glukoz konsantrasyonu yüksek olduğunda ifade edilir (*HXT1*, *HXT3*). Bu *HXT* genleri düşük afiniteli *HXT* genleri olarak da bilinmektedir. Bazı *HXT* genleri de (*HXT4*, *HXT6*, *HXT7*) düşük glukoz konsantrasyonlarında işlevseldir. Bu tür transporterlara da yüksek afiniteli *HXT* genleri veya Hxt proteinleri denilmektedir (Boles ve Hollenberg 1997).

### 2. 2. 2. Pho85'in Glukoz Sinyali İletimindeki Önemi

Pho85 *S. cerevisiae*'de cycline bağlı protein kinazlardan (CDK) biri olup hücrede 10 farklı cyclin'den biri ile etkileşerek birçok metabolik olayın kontrolünde yer almaktadır (Toh-e ve ark. 1988, Carrol ve O'Shea 2002). Pho85'in etkileştiği Cyclinler Pcl (Pho85 Cyclin) olarak adlandırılır. Pho85'in Pcl6 veya Pcl7 ile etkileşiminin karbon



hidrat kullanımını etkilediği bilinmektedir (Wang ve ark. 2001). Pho85-Pcl8 veya Pcl10 ile etkileşimi ise glikojen metabolizmasının kontrolü için gereklidir (Huang ve Ark 1996). Pho85-Pcl kompleksleri çok farklı substratlara etki ederler (Wilson ve ark. 1999, Carrol ve O'Shea 2002). Pho85-Pcl kompleksinin etki ettiği faktörlerden birisinin de Gcr1p olduğu gösterilmiştir (Lenburg ve O'Shea 2001). Böylece hücre döngüsüne paralel olarak glukoz kullanımın Gcr1 aracılığı ile kontrol edilebileceği de öne sürülmektedir (Lenburg ve O'Shea 2001). Gcr1p'nin Cyclinlere etki ederek hücre döngüsünü kontrol ettiğini gösteren diğer çalışmalar da vardır (Willis ve ark. 2003).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

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

Bu araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşlarından YST124 ve YST193 Frankfurt Üniversitesi'nden sağlandı. Bu iki *S. cerevisiae* suşu standart yaban tip suş olarak kullanılan S288C'den mutajenize edilerek elde edilmiştir (Brachmann ve ark. 1998). YST124 ve YST193 suşları  $\Delta pcl6$  mutasyonu hariç izogenik suşlardır. Araştırmada kullanılan diğer *S. cerevisiae* suşları olan YST102 ve YST103 de konjenik maya suşlarıdır. YST102 suşu  $GCR1^+$  genotipindedir. YST103 suşu ise  $gcr1$  mutant suşudur (Scott ve ark. 1990). Araştırmada kullanılan maya suşlarının genotipleri her bir suş için Çizelge 1'de verildi.

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

Maya Suşu	Genotipi ve ilgili mutasyon
YST 124	MATa <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>Met15</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0 ( $PCL6^+$ ).
YST 193	MATa <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>Met15</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0, YER059w::KanMX4 ( $\Delta pcl6$ mutanı).
YST 102	MATa <i>ura3-52</i> , <i>his3</i> $\Delta$ , <i>trp1-289</i> , <i>leu2-3,112</i> ( $GCR1^+$ ).
YST 103	MATa <i>ura3-52</i> , <i>his3</i> $\Delta$ , <i>trp1-289</i> , <i>leu2-3,112</i> , $\Delta gcr1::HIS3$ . ( $\Delta gcr1$ mutanı).

### 3. 2. *S. cerevisiae* Suşlarının Transformasyon İçin Üretilmesi

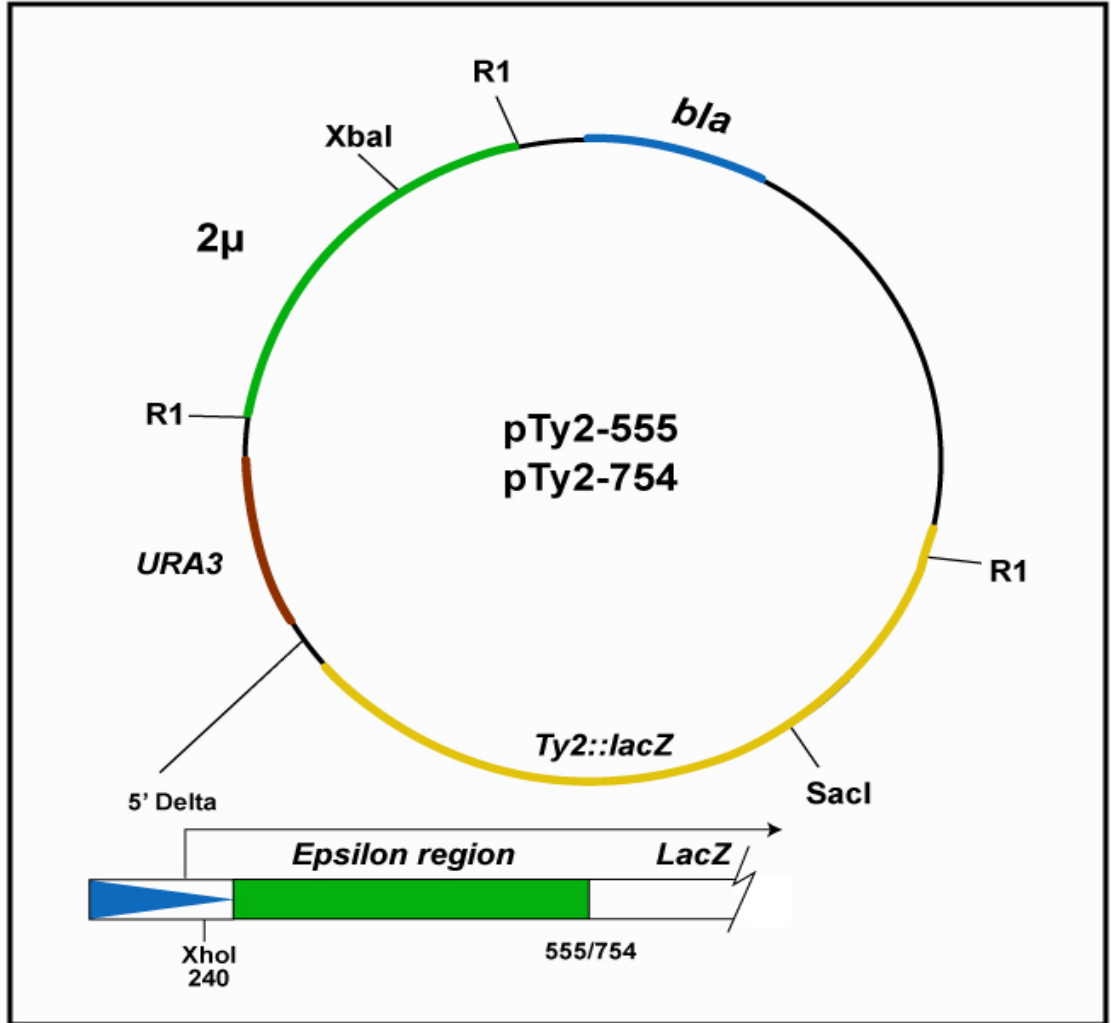
Araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşları ilgili stok merkezlerinden zengin ortam olarak kullanılan katı YPD (%1 yeast extract, %2 peptone, %2 agar, 2% glikoz) üreme ortamı içeren petrilerde sağlandı (Rose ve ark. 1990) (Ek 1). Bu *S. cerevisiae* stoklarından YPD petrilere ekim yapılarak 30 °C'de üretilip stoklar oluşturuldu. Deneylemiz boyunca taze *S. cerevisiae* kültürlerinin hazırlanmasında YPD petrilere üretilen bu stoklar kullanıldı. Maya stokları petrilerde + 4 °C'de saklandı. Ayrıca uzun süreli depolama amacıyla taze besi yerlerinde üretilen *S. cerevisiae* suşlarından steril kürdan ile alınan maya örnekleri 1 ml'lik %20 steril gliserol içinde resuspense edilerek -70 °C'de saklandı. Araştırmada kullanılan çözeltilerin içerikleri ve hazırlanması ek-1'de verildi.

### 3. 3. Araştırmada Kullanılan Plazmidler

Bu araştırmada Ty2-917 retrotranspozonunun ilk 555 bç veya ilk 754 bç uzunluğundaki promotor bölgesini içeren *S. cerevisiae* vektörleri kullanıldı. Ty2-lacZ, ve Suc2-lacZ gen füzyonlarını içeren bu plazmidler daha önceki araştırmalarda hazırlanmıştır (Farabaugh ve ark. 1989, Sarokin ve Carlson 1985). Plazmidler *E. coli*'de replikasyon için ColE replikasyon orijini ve seçilebilir marker olarak da ampicillin direnç geni olan  $\beta$ -laktamaz içermektedirler. Ayrıca, *S. cerevisia*'da replikasyon ve mitotik stabilite için 2 $\mu$  plazmidinin bir bölümünü ve seçilebilir marker gen olarak *URA3* genini içermektedirler.

Ty2-555-lacZ ve Ty2-754-lacZ plazmitlerinin genel yapıları şekil 3. 1'de verilmektedir. Ty2-917 retrotranspozonunun transkripsiyonunun kontrolü için gerekli olan promotor elementlerinin ilk 754 bç uzunluğundaki bölgede yer aldığı daha önce gösterilmiştir (Farabaugh ve ark. 1989). Ty2-555-lacZ füzyonunda Ty2-917'nin UAS bölgesi ve enhancer bölgesi yer alırken Ty2-754'de bu bölgelere ek olarak represor bölgeler de yer almaktadır (Farabaugh ve ark. 1989., Liao ve ark. 1987). Suc2-lacZ gen füzyonunu içeren plazmit ise araştırmalarımızda kontrol plazmiti olarak kullanıldı. *S. cerevisiae*'da invertaz enzimini (E.C.3.2.1.26) kodlayan *SUC2* geninin transkripsiyonu glukoz baskılaması ve baskının kaldırılması ile kontrol edilmektedir. Bu plazmit'te *SUC2* geninin promotor bölgesi yer almakta olup, transkripsiyonu glukoz

konsantrasyonuna göre aktive edilmekte veya baskılanabilmektedir (Sarokin ve Carlson 1985).



Şekil 3. 1. Ty2-lacZ gen füzyonunu içeren plazmidin yapısı

Bu plazmitlerin *S. cerevisiae* hücrelerinde kopya sayılarının sabit olduğu ve hücreden hücreye çok değişmediği daha önceki araştırmalarda gösterilmiştir. Ayrıca, *S. cerevisiae* transformantlarında ölçülen β-Galaktozidaz aktivitelerinin Ty2-lacZ gen

füzyonlarının mRNA seviyeleri ile de orantılı olduğu bilinmektedir (Farabaugh ve ark. 1989, 1993, Türkel ve Farabaugh 1993).

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

Araştırmada kullanılan Ty2-lacZ ve Suc2-lacZ gen füzyonlarını içeren plazmitler daha önce hazırlanan stoklardan *E. coli* DH5a suşuna transformasyon ile aktararak çoğaltıldı. *E. coli*'ye transformasyon için önce bakteri hücreleri -80 C'deki stoktan alınıp LB petrilerinde 37 °C'de üretildi (Ek-1). Petride aktif olarak üredikleri görülen bu *E. coli* suşu 10 ml LB (%1 Bacto- tripton, %0.5 yeast extract, %1 NaCl ) sıvı ortamda bir gece üretildi. Daha sonra bu sıvı kültürdeki *E. coli* suşundan 100 µl alınıp 10 ml LB ortamında 37 C'de logaritmik faza kadar 37 °C'de üretildi (Ek-1). Kompetent *E. coli* hücreleri MgCl<sub>2</sub>/CaCl<sub>2</sub> yöntemi kullanılarak daha önce açıklandığı şekilde elde edildi ve taze olarak transformasyonda kullanıldı (Ausubel ve ark. 1987). *E. coli*'ye transformasyon da rutin olarak izlenen yöntem kullanıldı. Transformant bakteriler LB-ampicillin petrilerinde üretildi (Ek 1).

*E.coli*'ye transform edilen Ty2-lacZ veya Suc2-lacZ plazmitleri Sigma-Prep miniprep plazmit izolasyon kiti kullanılarak izole edildi. *E. coli*'den plazmit saflaştırma işleminde üretici firma tarafından verilen yöntem izlendi. Saflaştırılan Ty2-lacZ ve Suc2-lacZ plazmit DNA'ları 100 µl'lik 1x TE (pH:7.4) çözültisi içinde -70°C de saklandı (Ek-1).

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

Ty2-lacZ ve Suc2-lacZ gen füzyonlarını içeren URA3-2µm plazmitleri *S. cerevisiae* hücrelerine lityum asetat polietilen glikol yöntemi kullanılarak transform edildi (Ito ve ark. 1983). Bunun için önce 4 °C'de bekletilen stok *S. cerevisiae* suşlarından 10 ml'lik YPD ortamlarına steril kürdan kullanılarak ekim yapıldı ve çalkalamalı inkübatörde 130 devir/dakika hızda ve 30 °C'de bir gece (18 saat) üretildi. Bu sıvı kültürdeki *S. cerevisiae* suşlarından 500 ml alınarak tekrar 10 ml'lik YPD ortamına ekim yapıldı ve aynı şartlarda logaritmik aşamaya kadar üretildi (Rose ve ark. 1990). Logaritmik fazdaki *S. cerevisiae* hücreleri santrifüjde 3000 g'de 5 dakika çöktürüldü. Çöken *S. cerevisiae* hücreleri 10 ml steril saf su ile yıkandı ve tekrar santrifüj ile 3000 g'de 5 dakika çöktürüldü. Sıvı faz atılıp çöken *S. cerevisiae* hücreleri

taze hazırlanmış 3.5 ml steril 0.1M lityum asetat çözeltisinde çözüldü ve 1 saat süresince çalkalamalı etüvde 130 dönüş/dakika hızda inkübe edildi. Bu inkübasyon süresi sonunda *S. cerevisiae* süspansiyonundan 400 µl steril mikrofuj tüplerine alındı ve üzerlerine 3-5 µg plazmid DNA'sı ile 1-2 µg denatüre edilmiş herring sperm DNA'sı ilave edildi. Bu plazmit *S. cerevisiae* karışımları 30 °C'de etüvde 30 dakika bekletildi. Daha sonra bu hücre plazmit karışımlarının üzerine 800 µl %50'lik steril polietilen glikol (PEG-4000) ilave edildi ve bu kez 30 °C'deki etüvde 1 saat bekletildi. İnkübasyon süresi sonunda *S. cerevisiae* hücreleri ısı şoku için 42 °C'deki su banyosunda 5 dakika bekletildi ve daha sonra hücreler mikrosantrifüjde 12000 g'de 1 dakika çöktürüldü. Çöken *S. cerevisiae* hücreleri 1 ml steril su ile yıkandı. Tekrar aynı hız ve sürede çöktürülen maya hücreleri bu kez 150 µl steril saf suda çözüldü. Bu hücre süspansiyonundan 75 µl alınıp urasil içermeyen sentetik tam minimal üreme ortamı (-Ura, SC + %2 glukoz) petrilere ekim yapıldı ve 30 °C'deki etüve konuldu. Gcr1 mutantları (YST103) glukozda üreyemedikleri için bu *S. cerevisiae* süşunun üreme ortamında glukoz yerine %2 gliserol, %2 sodyum laktat (Gly/Lakt) kullanıldı (Scott ve ark. 1990).

Transformantlar yaklaşık 5 gün sonra petrilere seçilebilir koloniler oluşturdu. Gcr1 mutanı *S. cerevisiae* süşu ise gliserol laktat ortamına ekildiğinden bu maya süşunun transformantları 10. günde seçilebilir büyüklüğe ulaşabildi. Transformant maya kolonilerinden 8-10 adeti seçilip yeni minimal petrilere üretilerek β-galaktozidaz deneyi için daha önce tanımlandığı şekilde hazırlandı (Guarente 1983).

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

Ty2-lacZ veya Suc2-lacZ plazmitlerini içeren *URA*<sup>+</sup> *S. cerevisiae* transformantları önce 2'li olarak 5ml -ura SC %2 glukoz veya gcr1 mutanı için %2 gliserol-laktat içeren üreme ortamında 30 C'de çalkalamalı etüvde 130 devir dakika hızda durağan faza kadar üretildi (yaklaşık 20-24 saat). Daha sonra bu durağan faz *S. cerevisiae* kültürlerinden 100µl alınıp 5 ml'lik taze -Ura, SC + %2 glukoz üreme ortamına ekim yapıldı ve *S. cerevisiae* kültürleri aynı şartlarda logaritmik faza kadar ( $A_{600}$ : 1.0) üretildi. Bu üreme periyodu sonunda *S. cerevisiae* hücreleri santrifuj ile 3000 g'de çöktürüldü. Çöktürülen *S. cerevisiae* kültürleri 1 ml'lik steril saf su ile bir kez yıkandıp

tekrar çöktürüldü. Bu kez hücre çökteltisinin üzerine 200 µl Breaking Buffer eklendi ve hücreler bu şekilde -70 °C’de donmaya bırakıldı (Ek 1).

Farklı karbon kaynaklarının Ty2 transkripsiyonuna etkilerini araştırabilmek için ise *S. cerevisiae* transformantları karbon kaynağı olarak %2 (w/v) sukroz, %2 (v/v) gliserol – sodyum laktat veya %2 (v/v) etanol içeren –Ura, SC üreme ortamlarına ayrı ayrı ekildi. Bu kültürler de yukarıda açıklandığı şekilde önce bir gece durağan faza kadar üretilip daha sonra taze ortamlara ekilerek logaritmik faza kadar üretildi. Logaritmik faz hücreleri çöktürülerek donduruldu ve daha sonra β-Galaktozidaz aktiviteleri ölçüldü.

Ty2 transkripsiyonuna glukoz sinyal iletim yolunun etkisini ölçebilmek için ise Ty2-lacZ veya Suc2-lacZ plazmitleri ile transform edilmiş *S. cerevisiae* hücreleri önce %2 (v/v) gliserol-sodyum –Ura, Sc üreme ortamında logaritmik faza kadar üretilildi. Bu aşamada üreme ortamlarından 5’er ml’lik örnekler alınarak son konsantrasyonları %0.1 glukoz (düşük glukoz), %2 glukoz (yüksek glukoz), %2 sukroz, veya 200mg/ml 2-Deoksi-D-Glukoz (2-DOG) olacak şekilde farklı miktarlarda şekerler eklendi (Neigeborn ve Carlson 1987). Transformantlar bu aşamada 4 saat daha 30 °C’de ve çalkalamalı etüvde üretilerek, santrifujle çöktürüldü ve yukarıda açıklandığı şekilde β-Galaktozidaz aktivitelerinin belirlenmesi için hazırlanarak donduruldu.

### 3. 7. β-Galaktosidaz Aktivitelerinin Ölçülmesi

Dondurulan *S. cerevisiae* hücreleri β-Galaktozidaz aktivitelerinin ölçümünden hemen önce oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Bu çözünen hücre süspansiyonlarına permeabilizasyon için 20 µl saf kloroform ve 20 µl 0.1%’lik SDS ilave edildi ve 10-15 saniye süreyle en hızlı mod’ta vortekslendi. Permeabilize edilen *S. cerevisiae* süspansiyonlarından 20 µl’lik bir karışım alınarak 980 µl’lik β-galaktozidaz tampon çözeltisi (Z-Buffer) içine ilave edildi. Daha sonra bu deney çözeltisinin optimum sıcaklığa ulaşabilmesi için 30 C’de su banyosunda 2 dakika bekletildi ve bu süre sonunda da permeabilize edilmiş hücre karışımına 200 µl ONPG eklenerek 30 °C’de açık sarı renk oluşuncaya kadar beklendi ve bunun için geçen süre de kayıt edildi. Bekleme süresi sonunda ONPG-β-Galaktozidaz reaksiyonları 500 µl 1M sodyum karbonat ilave edilerek durduruldu. Reaksiyon tüpleri 1000 g’de santrifuj edildi, hücreler çöktürüldü.

Çözeltilerin absorbanları 420'nm'de Shimadzu Mini 1240 model spektrofotometrede ölçüldü.

Permeabilize edilen *S. cerevisiae* süspansiyonlarının toplam protein konsantrasyonları da Lowry metoduna göre daha önce açıklandığı şekilde belirlendi (Lowry ve ark. 1951). Bunun için önce 10 ml'lik cam tüplere 180 µl'lik steril distile su konuldu. Permeabilize edilmiş hücre lizatlarından 20 µl alınarak tüp içine eklendi. Bu karışıma 1 ml Lowry C çözeltisi eklenerek vortex ile kısa süre karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika beklendi (Ek 3). Bekleme süresi sonunda karışıma 1N folin (Sigma F 9252) fenol çözeltisinden 100 µl eklenerek vorteks ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika beklendi ve daha sonra da oluşan mavi renkli protein komplekslerinin OD<sub>750</sub> nm'de absorbanları belirlendi.

Deneylerde her transformant *S. cerevisiae* suşu için 2 farklı transformant kullanıldı. Deneyler üçlü olarak yapıldı ve en az iki kez tekrarlandı. Bu nedenle sonuçlar bölümünde verilen çizelgelerdeki β-Galaktozidaz aktiviteleri 12 farklı deneyin ortalamasını göstermektedir. Elde edilen sonuçların çoğunda standart sapmanın %10'nun altında olduğu bulundu. β-galaktozidaz aktiviteleri Ek-2'de verilen yöntemle göre hesaplandı ve dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verildi.



## 4. SONUÇLAR

### 4. 1. Farklı Karbon kaynaklarının Ty2 Transkripsiyonuna Etkileri

Transkripsiyon faktörlerinin aktiviteleri üreme ortamı koşullarından etkilenmektedir. Ty2 retrotranspozonu herhangi bir transkripsiyon faktörü kodlamaz ve transkripsiyonu tümüyle *S. cerevisiae* genomundan kodlanan faktörlere bağlıdır. Bu nedenle öncelikle Ty2-917 retrotranspozonunda transkripsiyonun üreme ortamındaki karbon kaynaklarına göre değişip değişmediği kontrol edildi. Ty2-917'nin farklı promotor bölgelerini içeren Ty2-555-lacZ ve Ty2-754-lacZ gen füzyonu plazmitleri yaban tip *S. cerevisiae* suşuna (YST124) transform edildi. Transformantlar karbon kaynağı olarak glukoz, sukroz, gliserol-laktat veya etanol içeren farklı üreme ortamlarında ayrı ayrı üretildi ve gen füzyonlarından sentez edilen  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktiviteleri belirlendi. Yüksek glukoz (%2 w/v) içeren üreme ortamında Ty2-555-lacZ gen füzyonundan önemli miktarda  $\beta$ -galaktozidaz ifade edildiği (1438 ünite) bulundu. Ty2-754-lacZ füzyonunda Ty2 elementinin negatif kontrol bölgesi yer aldığından yaklaşık 10 kat daha az (155 ünite)  $\beta$ -galaktozidaz sentezi yapıldığı belirlendi (Çizelge 4. 1). Ty2-lacZ gen füzyonlarını içeren *S. cerevisiae* transformantları karbon kaynağı olarak sukroz içeren üreme ortamında üretildiklerinde ise Ty2'de daha düşük seviyede transkripsiyon yapıldığı gözlemlendi. Özellikle Ty2-555-lacZ gen füzyonunda transkripsiyonun yaklaşık %50 daha az yapıldığı bulundu.

Üreme ortamında fermente edilemeyen karbon kaynakları olan gliserol-laktat veya etanol bulunduğu ise Ty2 transkripsiyonunun çok düşük seviyede yapılabildiği bulundu. Glukoz içeren üreme ortamındaki Ty2 transkripsiyon seviyeleri ile kıyaslandığında, gliserol-laktat içeren üreme ortamında üretilen *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty2 elementlerinin transkripsiyonunda yaklaşık 7 kat azalma olduğu belirlendi (Çizelge 4. 1). Benzer şekilde, etanol içeren ortamında üretilen *S. cerevisiae* transformantlarındaki Ty2 transkripsiyon miktarlarında da oldukça düşük seviyede transkripsiyon yapılabildiği bulundu. Glukoz ortamına kıyaslandığında Ty2-555 transkripsiyonunda 13, Ty2-754 transkripsiyonunda ise yaklaşık 17 kat azalma olduğu bulundu (Çizelge 4. 1).

**Çizelge 4. 1.** Farklı karbon kaynaklarının Ty2-917’de transkripsiyona etkileri.

<b><math>\beta</math>-Galaktozidaz Aktiviteleri<sup>a, b</sup></b>				
<b><i>Gene Füzyonları</i></b>	<b><i>Glukoz (%2)</i></b>	<b><i>Sukroz (%2)</i></b>	<b><i>Gliserol/laktat (%2)</i></b>	<b><i>Etanol (%2)</i></b>
<b>Ty2-555</b>	1438 $\pm$ 115	737 $\pm$ 31	233 $\pm$ 15	109 $\pm$ 9
<b>Ty2-754</b>	155 $\pm$ 19	111 $\pm$ 11	22 $\pm$ 4	9 $\pm$ 2
<b>Suc2-lacZ</b>	3 $\pm$ 1	172 $\pm$ 6	839 $\pm$ 61	806 $\pm$ 23

<sup>a</sup> $\beta$ -Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

<sup>b</sup> $\beta$ -Galaktozidaz aktiviteleri *S. cerevisiae*’nin YST124 transformantlarında ölçülmüştür.

Araştırmalarımızda kontrol olarak kullanılan Suc2-lacZ gen füzyonununun yapılan transkripsiyonun glukoz baskılaması ile kontrol edildiği bilinmektedir (Carlson ve Botsthein 1982). Bu nedenle glukoz içeren ortamda Suc2-lacZ transkripsiyonu çok az seviyededir (1-3 ünite). Üreme ortamında glukoz yerine sukroz, gliserol laktat veya etanol gibi karbon kaynakları yer aldığı ise Suc2 transkripsiyonunun beklendiği şekilde aktive edildiği bulundu. Suc2-lacZ transkripsiyonunun araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşunda (YST124) 3 ünite olan baskılanmış seviyeden 800 üniteye kadar artabildiği görüldü (çizelge 4. 1).

#### **4. 2. Glukozun Ty2 Transkripsiyonuna Etkileri**

Ty2 transkripsiyonunun fermente edilen karbon kaynakları olan glukoz ve sukroz içeren ortamlarda çok yüksek, fermente edilmeyen karbon kaynağı içeren üreme ortamlarında ise çok düşük seviyede yapıldığı bulundu. Bu araştırmadan sonra ise glukozla bağlı olan transkripsiyonda glukoz konsantrasyonunun önemli olup olmadığı araştırıldı. Bunun için Ty2-lacZ transformantları önce %2 gliserol laktat içeren üreme ortamlarında logaritmik faz başlangıcına kadar (OD<sub>600</sub>: 1.0) kadar üretildi ve bu aşamada hücre kültürlerinden 5’er ml örnekler alınarak bu üreme ortamına düşük

miktarda (%0.1w/v) veya yüksek miktarlarda (%2) glukoz eklendi. Glukoz eklenen hücreler 4 saat daha üretildikten sonra çöktürülerek Ty2 gen füzyonlarından yapılan transkripsiyonlar ölçüldü. Üreme ortamına eklenen düşük glukozun Ty2-555 transkripsiyonunda çok önemli bir artışa neden olmadığı fakat Ty2-754'de yaklaşık 3 kat (22 üniteden 63 üniteye) artışa neden olduğu

**Çizelge 4. 2.** Ty2-917 transkripsiyona farklı glukoz konsantrasyonlarının etkileri.

Gen Füzyonları	$\beta$ -Galaktozidaz Aktiviteleri <sup>a, b</sup>		
	%2 Gly/lakt	%2 Gly/lakt'dan 0.1% Glukoz'a	%2 Gly/lakt'dan 2% Glukoz'a
<b>Ty2-555</b>	233 $\pm$ 15	361 $\pm$ 24	1387 $\pm$ 70
<b>Ty2-754</b>	22 $\pm$ 4	63 $\pm$ 14	252 $\pm$ 18
<b>Suc2-lacZ</b>	839 $\pm$ 61	4316 $\pm$ 422	298 $\pm$ 36

<sup>a</sup> $\beta$ -Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

<sup>b</sup> $\beta$ -Galaktozidaz aktiviteleri *S. cerevisiae*'nin YST124 transformantlarında ölçülmüştür.

belirlendi (Çizelge 4. 2). Üreme ortamına yüksek oranda glukoz eklenmesinin ise Ty2'de çok fazla transkripsiyon yapılmasına neden olduğu belirlendi. Gliserol laktat ortamında üretilen hücrelerdeki Ty2 elementlerinden yapılan transkripsiyon seviyeleri ile kıyaslandığında, üreme ortamına %2 glukoz eklenmesi Ty2-555 transkripsiyonunda 6 kat, Ty2-754 transkripsiyonunda da 12 kat artışa neden oldu (Çizelge 4. 2).

Kontrol gen füzyonu olan Suc2-lacZ transkripsiyonunda ise düşük glukozun bu genden yapılan transkripsiyonu çok fazla aktive ettiği, yüksek glukozun ise *SUC2* transkripsiyonunu baskıladığı daha önceki araştırmalarda belirlenmiştir (Özcan ve ark. 1997). Bundan dolayı üreme ortamına düşük miktarda glukoz eklenmesinin Suc2-lacZ gen füzyonunda fazla miktarda aktivasyona neden olduğu, yüksek glukozun ise Suc2-lacZ transkripsiyonunu baskıladığı bulundu.

### 4. 3. Ty2-917 Transkripsiyona Sukroz ve 2-DOG'un Etkileri

*S. cerevisiae* üreme ortamına glukoz eklenmesi glukozun konsantrasyonuna da bağlı olarak bir çok sinyal iletim yolunu aktive ederek farklı genlerden yapılan transkripsiyonu baskılayabilir veya aktive eder (Schneper ve ark. 2004, Rolland ve ark. 2002). Glukoz'a bağlı Ty2 transkripsiyonunun aktivasyonunda glukozun metabolize edilmesinin gerekli olup olmadığı üreme ortamına sukroz veya 2-Deoksi-D-Glukoz (2-DOG) ilave edilerek araştırıldı. *S. cerevisiae* üreme ortamında sukroz bulunması glukoz baskılama sinyal iletim yolunu aktive etmez ve sukroz fermente edilen karbon kaynağı olarak algılanıp, farklı bir metabolik sinyal iletim yolunu aktive eder. 2-DOG ise hücre içine alınabilen, fakat fosforilasyondan sonraki aşamalarda metabolize edilemeyen bir glukoz türevidir (Neigeborn ve Calson 1987).

**Çizelge 4. 3.** Ty2-917 transkripsiyona sukroz ve 2-Deoksi-D-Glukoz'un etkileri.

Gen Füzyonları	$\beta$ -Galaktozidaz Aktiviteleri <sup>a, b</sup>		
	%2 Gliserol/laktat	%2 Gly/lakt'dan %2 Sukroz'a	%2 Gly/lakt'dan 2-DOG'a
Ty2-555	233 $\pm$ 15	998 $\pm$ 107	116 $\pm$ 3
Ty2-754	22 $\pm$ 4	198 $\pm$ 16	31 $\pm$ 2
Suc2-lacZ	839 $\pm$ 61	616 $\pm$ 36	782 $\pm$ 20

<sup>a</sup> $\beta$ -Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

<sup>b</sup> $\beta$ -Galaktozidaz aktiviteleri *S. cerevisiae*'nin YST124 transformantlarında ölçülmüştür.

Bunun için Ty2-lacZ veya Suc2-lacZ transformantları önce karbon kaynağı olarak gliserol laktat içeren üreme ortamında logaritmik faza kadar üretildi. Bu aşamada *S. cerevisiae* kültürlerinden 5'er ml'lik örnekler alınarak ortama sukroz veya 2-DOG eklenerek aynı koşullarda 4 saat daha üremeleri sağlandı. Üreme süreleri sonunda *S. cerevisiae* hücrelerinde Ty2-lacZ veya Suc2-lacZ genlerinden ifade edilen  $\beta$ -

galaktozidaz aktiviteleri belirlendi. Üreme ortamına sukroz eklenmesi Gliserol laktat ortamında üretilen Ty2 transformantlarında Ty2-lacZ transkripsiyonunda oldukça fazla bir artışa neden oldu. Üreme ortamına sukroz eklenmesiyle Ty2-555-lacZ gen füzyonunda transkripsiyonun 233 üniteden 998 üniteye arttığı görüldü (Çizelge 4.3). Üreme ortamına %2 sukroz eklenmesinin Ty2-754-lacZ gen füzyonundan yapılan transkripsiyonda yaklaşık 9 kat'lık bir artışa neden olduğu bulundu.

Ty2 transkripsiyonunda aktivasyon için sadece glukoz sinyalinin yeterli olup olmadığı da gliserol laktat içeren ortamda üretilen transformantlara 2-DOG ilave edilerek test edildi. Logaritmik aşamada bulunan *S. cerevisiae* transformantlarının üreme ortamlarına metabolize edilemeyen glukoz analogu olan 2-DOG'un eklenmesiyle Ty2-lacZ gen füzyonlarından yapılan transkripsiyonda önemli miktarda bir değişiklik gözlenmedi (Çizelge 4. 3.). Araştırmalarımızda kontrol gen füzyonu olarak kullanılan Suc2-lacZ gen füzyonundan yapılan transkripsiyonda ise herhangi bir değişiklik olmadığı bulundu.

#### **4. 4. Gcr1p'nin Ty2'de Glukoz Aktivasyonuna Etkileri**

Transkripsiyon faktörü Gcr1p kompleksi'nin Ty2-917 retrotranspozonunda başlıca düzenleyici faktör olduğu daha önceki araştırmalarda belirlenmiştir (Türkel ve ark. 1997, Türkel 2002). Gcr1p Ty2-917'nin promotorunda birçok bölgeye bağlanarak Ty2-917 transkripsiyonunun aktivasyonunu sağlar. Gcr1p'nin hem glikolitik genlerin transkripsiyon aktivatörü olması ve hem de Ty2-917'de transkripsiyonu kontrol eden faktör olması nedeni ile Ty2-917'de transkripsiyonun glukoz sinyali aktivasyonunda Gcr1p'nin yer alıp almadığı test edildi. Bunun için Ty2-lacZ gen füzyonları ve kontrol plazmitleri olan Suc2-lacZ plazmitleri yaban tip ve  $\Delta gcr1$  mutant hücrelere transform edildi.  $\Delta gcr1$  mutantları glukoz içeren ortamda üreyemedikleri için transformantlar önce gliserol laktat ortamında logaritmik faza kadar üretilerek bu fazda üreme ortamlarına son konsantrasyonları %2 olacak şekilde glukoz eklendi.

$\Delta gcr1$  mutantlarında Ty2 transkripsiyonunun daha önce de rapor edildiği şekilde çok düşük seviyede olduğu görüldü. Gliserol-laktat içeren ortamda üretildiklerinde, yaban tip suşla kıyaslandığında  $\Delta gcr1$  mutantı suşta Ty2-555-lacZ gen füzyonundan 46-kat daha az transkripsiyon yapıldığı, Ty2-754-lacZ gen füzyonunda ise 16 kat daha az transkripsiyon yapıldığı bulundu. Yaban tip transformantlarının üreme ortamlarına son

konsantrasyonu %2 (w/v) olacak şekilde glukoz eklendiğinde hem Ty2-555-lacZ ve hem de Ty2-754-lacZ gen füzyonlarında transkripsiyonun 3-4 kat aktive edildiği bulundu (Çizelge 4. 4).

**Çizelge 4. 4.** Ty2-917'nin glukoz aktivasyonuna Gcr1p'nin etkileri.

Gen Füzyonları	$\beta$ -Galaktozidaz Aktiviteleri <sup>a</sup>			
	%2 Gliserol/Laktat		%2 Gliserol/Laktat'dan 2% Glukoz'a	
	$\Delta gcr1^b$	<i>GCR1</i> <sup>+</sup>	$\Delta gcr1$	<i>GCR1</i> <sup>+</sup>
<b>Ty2-555</b>	12 $\pm$ 2	550 $\pm$ 44	32 $\pm$ 7	2000 $\pm$ 180
<b>Ty2-754</b>	7 $\pm$ 1	110 $\pm$ 8	20 $\pm$ 3	340 $\pm$ 30
<b>Suc2-lacZ</b>	3600 $\pm$ 320	4700 $\pm$ 480	3550 $\pm$ 380	900 $\pm$ 70

<sup>a</sup> $\beta$ -Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

<sup>b</sup> $\Delta gcr1$  ve *GCR1*<sup>+</sup> sırasıyla *S. cerevisiae*'nin YST103 ve YST102 suşlarını göstermektedir.

Gcr1 mutant suşunun üreme ortamına %2 glukoz ilave edilmesinin de Ty2-555-lacZ ve Ty2-754-lacZ gen füzyonlarında 2.5-3 kat bir artış olduğu görüldü (Çizelge 4. 4). Fakat Ty2-555-lacZ gen füzyonlarının yaban tip ve *gcr1* mutanti hücrelerde glukoz ortamında üretildiklerinde transkripsiyon seviyeleri karşılaştırıldığında çok önemli farklar olduğu görüldü. Ty2-555-lacZ gen füzyonundan *gcr1* mutanti suşta üreme ortamına glukoz ilave edilmesi sonucu 20 ünitelik bir  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesi ölçülürken, aynı gen füzyonundan yaban tip suş'ta glukoz aktivasyonu sonucu 2000 ünitelik (62 kat daha fazla) bir  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesi ölçüldü (çizelge 4. 4). Benzer şekilde, yaban tip ve  $\Delta gcr1$  mutant suşlarında Ty2-754-lacZ gen füzyonundan yapılan transkripsiyon seviyeleri karşılaştırıldığında da 17 kat bir fark olduğu görüldü. Bu sonuçlar Ty2-917'de glukoz sinyali ile transkripsiyonun aktive edilmesinde gerekli olan faktörlerden birisinin Gcr1p olduğunu göstermektedir.

Yaban tip *S. cerevisiae* suşunda Suc2-lacZ gen füzyonundan yapılan transkripsiyonun gliserol laktat içeren ortamda çok fazla miktarda yapıldığı, üreme ortamına glukoz eklenmesiyle de glukoz baskılaması nedeniyle 5-kat azaldığı (4700 üniteden 900 üniteye) bulundu.  $\Delta gcr1$  mutan transformantlarda ise Suc2-lacZ gen füzyonundan yapılan transkripsiyonun glukoz baskılamasından etkilenmediği ve hem gliserol laktat ve hem de glukoz ilave edilmiş üreme ortamında yaklaşık olarak aynı seviyede transkripsiyon yapıldığı bulundu (Çizelge 4. 4). *SUC2* geni transkripsiyonunun *gcr1* mutant suşlarında glukoz baskılaması altında olmadığı daha önceki araştırmalarda rapor edilmiştir (Türkel ve ark. 2003).

#### 4.5. Pho85 Cyclini Pcl6'nın Ty2 Transkripsiyonuna Etkisi

Transkripsiyon faktörü Gcr1p bir fosfo protein olup, daha önceki araştırmalarda cycline bağlı protein kinaz (CDK) olan Pho85p ile etkileştiği gösterilmiştir (Lenburg ve O'Shea 2001). *S. cerevisiae*'da Pho85p'nin farklı metabolik sinyallere göre etkileştiği 10 farklı cyclin (CLN) olduğu da belirlenmiştir (Toh-e ve ark. 1988, Carrol ve O'Shea 2002). Bu cyclinlerden özellikle Pcl6'nın karbonhidrat metabolizmasıyla ilgili genlerin transkripsiyonlarının kontrolü için gerekli olduğu daha önceki araştırmalarda açıklanmıştır (Wang ve ark. 2001). Araştırmamızın bu bölümünde Ty2-917'de glukozla bağlı transkripsiyonun aktivasyonu için Pcl6'nın gerekli olup olmadığı test edildi.

Ty2-555-lacZ, Ty2-754-lacZ ve kontrol plazmit'i olarak da Suc2-lacZ gen füzyonlarını içeren plazmitler *pcl6* mutan *S. cerevisiae* suşuna transform edildi. Transformantlar ayrı ayrı farklı karbon kaynakları içeren -Ura, SC üreme ortamında üretilerek bu gen füzyonlarından ifade edilen  $\beta$ -Galaktozidaz miktarları belirlendi. Glukoz içeren üreme ortamında Ty2-555-lacZ gen füzyonundan yapılan transkripsiyonun yaban tip suşa oranla 28 kat daha düşük olduğu bulundu (1438 üniteye karşın 51 ünitelik aktivite). Benzer şekilde Ty2-754-lacZ gen füzyonundan yapılan transkripsiyonda da yaban tip suşa oranla 19 katlık bir azalma olduğu görüldü (Çizelge 4. 5., ve Çizelge 4. 1). *Pcl6* mutan olan *S. cerevisiae* transformantları gliserol laktat içeren ortamda üretildiklerinde de Ty2-lacZ gen füzyonlarından oldukça düşük seviyede transkripsiyon yapılabildiği bulundu. Gliserol laktat ortamında üretilen *pcl6* mutan transformantlarda Ty2-555-lacZ transkripsiyonunda yaban tip suşa oranla 21 kat'lık bir

azalma, Ty2-754-lacZ gen füzyonunun transkripsiyonunda ise 56 katlık bir azalma olduğu bulundu (Çizelge 4. 5).

**Çizelge 4. 5.** Pho85 cyclini Pcl6'nın Ty2-917 transkripsiyonuna etkileri.

Gen Füzyonları	$\beta$ -Galaktozidaz Aktiviteleri <sup>a, b</sup>		
	%2 Glukoz	%2 Gliserol/Laktat	%2 Gly/lakt'dan %2 Glukoz'a
Ty2-555	51±2	11±1	19±2
Ty2-754	8±1	2±1	6±1
Suc2-lacZ	7±1	104±18	28±4

<sup>a</sup> $\beta$ -Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

<sup>b</sup> $\beta$ -Galaktozidaz aktiviteleri *S. cerevisiae*'nin YST193 transformantlarında ölçülmüştür.

Pcl6 mutant suşunda glukoz aktivasyonunun Ty2 transkripsiyonuna etkileri de araştırıldı. Bunun için gliserol laktat içeren üreme ortamında logaritmik faza kadar üretilen Ty2-lacZ transformantlarının üreme ortamına son konsantrasyon %2 (w/v) olacak şekilde glukoz eklendi. Glukoz aktivasyonunun Pcl6 mutant suşlarında Ty2 transkripsiyonuna önemli bir etkisinin olmadığı, Ty2-555-lacZ ve Ty2-754-lacZ gen füzyonlarında transkripsiyonun yaklaşık olarak aynı seviyelerde kaldığı bulundu (Çizelge 4. 5). Araştırmada kontrol gen füzyonu olarak kullanılan Suc2-lacZ gen füzyonunun transkripsiyonunun da Pcl6'ya bağlı olarak kontrol edildiği bulundu. Suc2-lacZ gen füzyonunda transkripsiyonun gliserol laktat ortamında üretilen pcl6 mutant suşunda yaban tip *S. cerevisiae* suşuna oranla daha düşük seviyede yapıldığı fakat glukoz baskılaması altında olduğu gösterildi (Çizelge 4.5).



## 5- TARTIŞMA

Glukoz *S. cerevisiae* hücrelerinde fermentatif olarak kullanılan önemli bir karbon kaynağıdır. Bunun yanında üreme ortamında glukoz bulunması *S. cerevisiae*'da farklı genlerin aktivasyonuna veya baskılanmasına neden olur (Rolland ve ark. 2002). Özellikle non-fermentatif (örneğin gliserol laktat veya etanol) üreme ortamında üremekte olan *S. cerevisiae* kültürlerine yüksek oranda glukoz (%2) eklendiğinde *S. cerevisiae* genomundaki genlerin yaklaşık %30'unda transkripsiyon seviyesinde artma veya azalma olduğu bulunmuştur (Schneper ve ark. 2004). Araştırmamızda model retrovirüs benzeri element olarak kullanılan Ty2-917 elementin transkripsiyonu tamamen konak olarak bulunduğu *S. cerevisiae* transkriptomuna bağlıdır. Bundan dolayı *S. cerevisiae* hücrelerinde metabolik değişikliklerin sonucu transkriptom profilinde oluşacak değişikliklerin Ty2-917 transkripsiyonunu da etkilemesi beklenebilir.

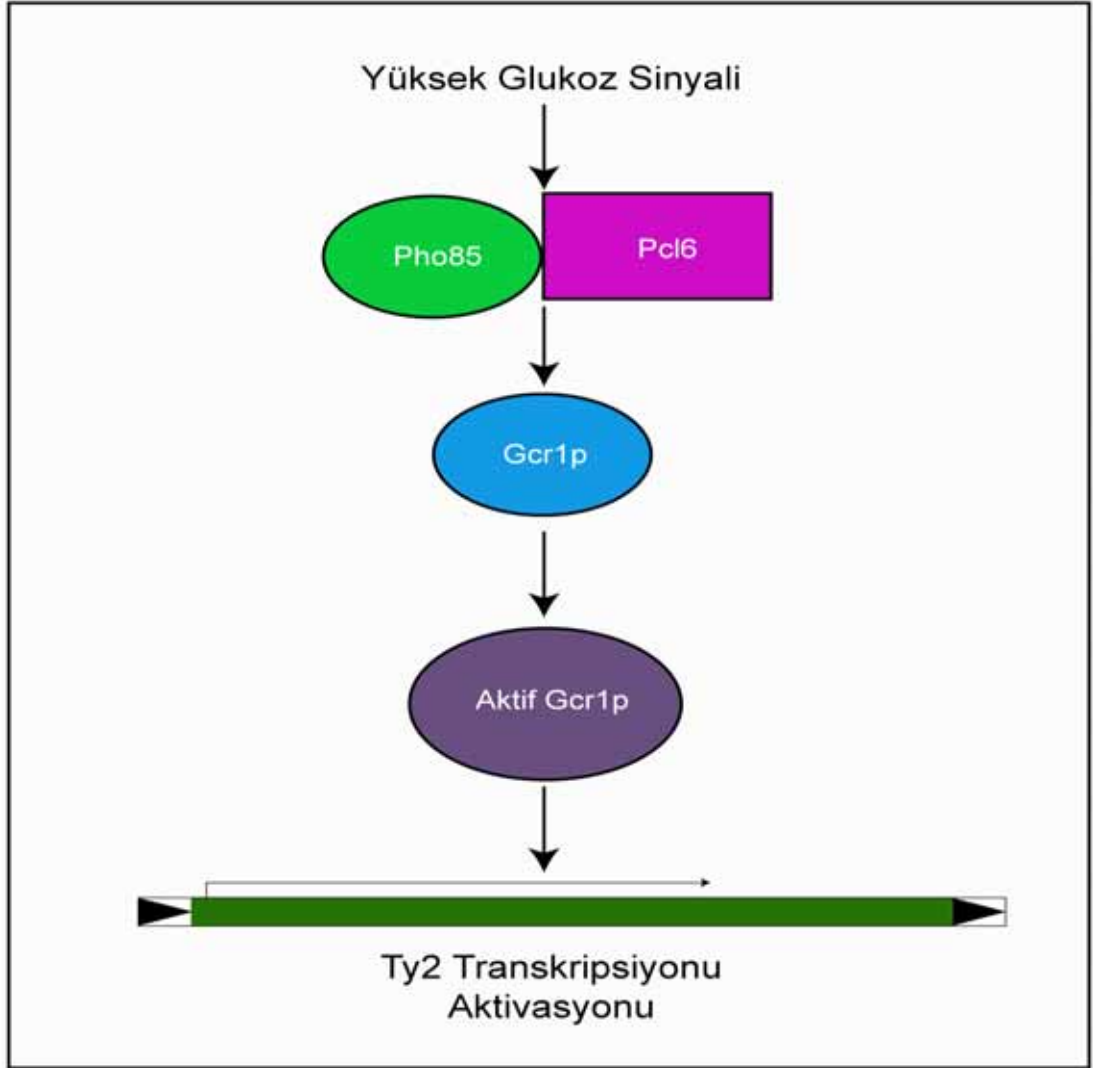
Bu tez araştırmasında retrovirüs benzeri element olarak kullanılan Ty2-917 *S. cerevisiae*'da daha önceden belirlenmiştir (Cameron ve ark. 1979). Ty2-917 genom yapısı çok yoğun düzenleyici bölgeler içerir ve eukaryotik retrovirüslere benzer özelliklere sahiptir (Boeke ve ark. 1985, Roth 2000). Ty2-917 retrovirüsler gibi hastalık yapmaz fakat *S. cerevisiae* genomunda mutasyonlara neden olabilir. Ty2-917 *S. cerevisiae* genomunda integre olduğu bölgelerdeki genlerde transkripsiyonun kontrolsüz yapılmasına veya kromozomal delesyonlara da neden olabilir (Boeke ve Sandmeyer 1991). Bu özellikleri nedeniyle Ty elementleri model sistem olarak kullanılıp retrovirüslerin yapısal özellikleri ve genlerinin işleyiş prensipleri anlaşılmıştır (Farabaugh 1995).

Bu çalışmada retrovirüs benzeri element olan Ty2-917 model sistem olarak kullanılarak glukoz aktivasyonunun retrotranspozonlarda transkripsiyona etkileri araştırıldı. Ty2-917 retrotranspozonunun promotor yapısı daha önceki çalışmalarda ayrıntılı olarak belirlenmiştir (Farabaugh ve ark. 1989, 1993, Türkel ve Farabaugh 1993). Ty2-917 transkripsiyonunun kontrol elementlerinin 5' uçtaki ilk 754 bp uzunluğundaki bölgede yer aldığı bilinmektedir. Bu nedenle araştırmalarımızda Ty2-917 elementinin ilk 754 bp uzunluğundaki promotor bölgesini içeren Ty2-lacZ gen füzyonları kullanıldı. Genomu çok küçük ve kompakt olan Ty2-917 de bazı

transkripsiyon kontrol bölgeleri transkribe edilen bölgenin içinde yer alır (Farabaugh ve ark. 1989, 1993).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda Ty2-917 elementinin transkripsiyonunun büyük oranda transkripsiyon faktörü Gcr1p kompleksine bağlı olduğu gösterilmiştir (Türkel ve ark. 1997, Türkel 2002). Gcr1p glikolitik enzimler ve ribozomal protein genlerinin transkripsiyonu için gerekli olan fosfoprotein yapısında bir transkripsiyon faktörüdür. Gcr1p farklı sinyal iletim yollarınca aktive edilen protein kinazlar tarafından fosforlanabilir. Üreme ortamında yüksek oranda glukoz bulunması *S. cerevisiae*'da hücre döngüsüne ve üreme hızına da etki eder (Santangelo 2006). Araştırmalarımızda elde edilen sonuçlar Ty2-917 transkripsiyonunun yüksek oranda glukozla aktive edildiğini ve bu aktivasyonun da Gcr1p ve cyclin olan Pcl6'ya bağlı olduğunu göstermiştir. Glukoz aktivasyonunun etkisiyle Ty2 elementinin genomdaki kopya sayısında herhangi bir artış olup olmadığı bilinmemektedir. Fakat daha önce yapılan bir çalışmada Ty1 elementi promotörü galaktoz ile aktive edilen GAL1 geni promotörü ile değiştirilip, bu promotor füzyonu Ty1 elementi transkripsiyonu üreme ortamına galaktoz ilavesiyle aktive edildiğinde *S. cerevisiae* sitoplazmasında çok fazla sayıda Ty virüs benzeri parçacıkların (Ty-VLP) oluştuğu gözlenmiştir (Garfinkel ve ark. 1985). Bu sonuç da bize Ty2 transkripsiyonundaki aşırı artışın *S. cerevisiae*'da Ty2 virüs benzeri yapıların sayısında artışa yol açabileceğini göstermektedir.

Pho85 *S. cerevisiae*'da çevresel sinyallere göre farklı metabolik yolların kontrolünü sağlayan önemli bir Cyclin bağlı protein kinaz'dır (CDK). Pho85'in bugüne kadar 10 cyclin'i (CLN) belirlenmiştir (Carroll ve O'shea 2002). Pho85 mutantlarının minimal ortamda üremedikleri veya çok yavaş üredikleri rapor edilmiştir (Pan ve ark. 2006). Araştırmalarımızda kullandığımız Ty2-lacZ gen füzyonlarını içeren *S. cerevisiae* transformantları minimal seçici ortamda üretilmek zorunda oldukları için Ty2-lacZ gen füzyonlarının Pho85 mutant suşlarındaki transkripsiyon seviyeleri belirlenmedi. Bunun yerine Pho85p ile etkileşen ve karbon kaynağı ile ilgili sinyal iletim yolunun kontrolünde Pho85p ile birlikte çalışan Pcl6'nın Ty2-lacZ gen füzyonlarında Ty2 transkripsiyonuna etkileri incelendi. Pcl6 mutantları üreme kusurlu değildir. Yaptığımız araştırmalar sonucu pcl6 mutantlarında Ty2 transkripsiyonunun oldukça az miktarda yapıldığını buldu. Bu sonuçlar da Ty2-917 transkripsiyonunun glukoz ile aktivasyonunda Gcr1p ile birlikte Pho85-Pcl6 kompleksinin de gerekli



**Şekil 5. 1.** Glukozun Ty2 transkripsiyonunu aktive etme modeli.

olduğunu göstermektedir. Pho85'in Gcr1p ile etkileştiği daha önce rapor edilmiştir (Lenburg ve O'Shea 2001).

*S. cerevisiae* üreme ortamında az miktarda glukoz (%0.1) bulunması geçici olarak glukoz aktivasyonu sinyali oluşturmaktadır. Düşük glukoz *S. cerevisiae* tarafından hızlı bir şekilde tüketildiği için hücre bölünmesiyle ilgili sinyal iletim yolları tam olarak aktive edilmez. Araştırmalardan elde ettiğimiz sonuçlar da düşük glukozun veya fermente edilemeyen karbon kaynaklarının Ty2 transkripsiyonunu aktive etmediğini

göstermektedir. Bu sonuçlar da bize Ty2 transkripsiyonunun aynı zamanda bölünme hızına da bağlı olabileceğini göstermektedir.

Ty elementlerinde frameshift oranının *S. cerevisiae*'da üreme aşamalarına göre değiştiği bulunmuştur. Ty frameshift oranının durağan faz hücrelerinde logaritmik faz hücrelerine göre 10 kat azaldığı gösterilmiştir (Stahl ve ark. 2004). Bu sonuçlara göre Ty2 transkripsiyonundaki azalmaya paralel olarak frameshift oranında da azalma olması beklenebilir. Bu şekilde transkripsiyon ve translasyon seviyesindeki kontrol ile Ty2'de hayat döngüsünün *S. cerevisiae* hücrelerinin metabolik durumuna göre kontrol edildiği öne sürülebilir.

## 6. KAYNAKLAR

AUSUBEL, F.M., R. BRENT, R.E. KINGSTON, D.D. MOORE, J.G. SEIDMAN, J.A. SMITH, ve K. STRUHL. 1987. Current protocols in molecular biology. Green Publ. Assoc. And Wiley Interscience, New York. USA. p.1.6.1-1.6.6.

BAKER, H. V. 1986. Glycolytic gene expressionin *Saccharomyces cerevisiae*: Nucleotide sequence of GCR1, null mutants, and evidence for expression. Mol. Cell. Biol., 6: 3774-3784.

BAKER, H. V. 1991. *GCR1* of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a DNA binding protein whose binding is abolished by mutations in the CTTCC sequence motif. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 9443-9447.

BARBARA, K.E., T. M. HALEY, K. A. WILLIS ve G. M. SANTANGELO. 2007. The transcription factor Gcr1 stimulates cell growth by participating in nutrient-responsive gene expression on a global level. Mol. Genet. Genomics, 277: 171-188.

BAYRAM, Ö. 2003. Ortam şartlarının Ty2 retrotranspozonu transkripsiyonuna ve frameshift oranına etkilerinin analizi. Yüksek lisans tezi. Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Bursa. S. 11.

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

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

BOEKE, J. D. Ve S.B. SANDMEYER. 1991. Yeast Transposable elements. “in, The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, Broach J.R., Pringle J.R., Jones, E.W. Vol. 1. CSH Press. 1991. s 193-261.

BOLES, E. ve C. P. HOLLENBERG. 1997. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. FEMS Microbiol. Rev., 21: 85-111.

BOONE, C., H. BUSSEY VE B. J. ANDREWS. 2007. Exploring genetic interactions and networks with yeast. Nat. Rev. Genet., 8(6): 437-449.

BRACHMANN, C.B., A. DAVIES, G. J. COST, E. CAPUTA, J. LI, P. HIETER ve J.D. BOEKE. 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.

CAMERON, J.R, E.Y. LOH, ve R.W. 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.

CARROLL, A.S. VE E. K. O'SHEA. 2002. Pho85 and signaling environmental conditions. *Trends Biochem. Sci.*, 27: 87-93.

CARLSON, M. ve D. BOTSTEIN. 1982. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted with intracellular forms of yeast invertase. *Cell*, 28:145-154.

CARLSON, M. 1999. Glucose repression in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2: 202-207.

CHALKER, D. I. ve S. B. SANDMEYER. 1992. Ty3 integrates within the region of RNA polymerase III transcription initiation. *Genes Dev.*, 6: 117-128.

CIRIACY, M. 1995. Yeast Retrotransposons. "Kück, U., Editor". *The Mycota II, Genetics and Biotechnology*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. p. 227-245.

CLARE, J. ve P.J. FARABAUGH. 1985. Nucleotide sequence of a yeast Ty element: Evidence for an unusual mechanism of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82: 2829-2833.

CORONA, D.F.V ve J.W. TAMKUN. 2004. Multiple roles for ISWI in transcription, chromosome organization and DNA replication. *Biochim. Biophys. Acta. Gene Struct. Exp.*, 1677: 113-119.

DEVIT, M.J. ve M. JOHNSTON. 1999. The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Biol.*, 9: 1231-1241.

DEVINE, S. E. ve J. D. BOEKE. 1996. Integration of the yeast retrotransposon Ty1 is targeted to regions upstream of genes transcribed by RNA polymerase III. *Genes Dev.*, 10: 620-633.

DINMAN J. D., M. J. RUIZ-ECHEVARRIA. ve S. W. PELTZ. 1998. Translating old drugs into new treatments: ribosomal frameshifting as a target for antiviral agents. *Trends Biotech.*, 16: 190-196.

DUDLEY, A. M., C. ROUGEULLE, ve F. WINSTON. 1999. The Spt components of SAGA facilitate TBP binding to a promoter at a post-activator binding step in vivo. *Genes Dev.*, 13: 2940-2945.

EIBEL, H. ve P. PHILIPPSEN. 1984. Preferential integration of yeast transposable element Ty into a promoter region. *Nature*, 307: 386-388.

ELDER, R. T., E. Y. LOH ve R. W. DAVIS. 1983. RNA from the yeast transposable element Ty1 has both ends in the direct repeats, a structure similar to retrovirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 80: 2432-2436.

FARABAUGH, P.J., ve G.R. FINK. 1980. Insertion of the eukaryotic transposable element Ty1 creates a 5-base pair duplication. *Nature*, 286: 352-356.

FARABAUGH P.J, X.B. LIAO, M. BELCOURT, H. ZHAO, J. KAPAKOS, ve J. CLARE. 1989. Enhancer and silencer like sites within the transcribed portion of a Ty2 transposable element of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 9: 4824-4834.

FARABAUGH P.J, A. VIMALADITHAN, S. TÜRKEL, R. JOHNSON, ve H. ZHAO 1993. Three downstream sites repress transcription of a Ty2 retrotransposon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 13: 2081-2090.

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 frameshifting. *Microbiol. Rev.*, 60: 103-134.

FINK, G., P. FARABAUGH, G. ROEDER ve D. CHALEFF. 1981. Transposable elements (Ty) in yeast. *Cold Spring Harb. Quant. Biol.*, 45: pt.2., 575-580.

GANCEDO, J.M. 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 334-361.

- GARFINKEL, D. J., J.D. BOEKE ve G. R. FINK. 1985. Ty element transposon: Reverse transcriptase and virus-like particles. *Cell*, 42: 507-517.
- GARFINKEL, D.J., K. NYSWANER, J. WANG, ve Y.-J. CHO. 2003. Post-transcriptional co-suppression of Ty1 retrotranspositions. *Genetics*, 165: 83-99.
- GARFINKEL, D.J. 2005. Genome evolution mediated by Ty elements in *Saccharomyces*. *Cytogenet. Genome Res.*, 110: 63-69.
- GUARENTE, L. 1983. Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol.*, 101: 181-191.
- HUANG, D., I. FARKAS, ve P. J. ROACH. 1996. Pho85p, a cyclin-dependent protein kinase, and the snf1p protein kinase act antagonistically to control glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 16: 4357-4365.
- HUG, A. M. ve H. FELDMANN. 1996. Yeast retrotransposon Ty4: the majority of the rare transcripts lack a U3-R sequence. *Nucleic Acids Res.*, 24: 2338-2346.
- HUNTER, T., ve M. KARIN. 1992. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell*, 70: 375-387.
- ITO, H., Y. FUKUDA, K. MURATA, ve A. KIMURA. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, 153: 163-168.
- JACKS, T., M. D. POWER, F. R. MASIARZ, P. A. LUCIW, P. J. BARR ve H. E. VARMUS. 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature*. 331(6153): 280-283.
- JEROME, J.F. ve J.A. JAEHNING. 1986. mRNA transcription in nuclei isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 6: 1633-1639.
- JI, H., D. P. MOORE, M. A. BLOMBERG, L. T. BRAITERMAN, D. F. VOYTAS, G. NATSOULIS ve J. D. BOEKE. 1993. Hotspots for unselected Ty1 transposition events on yeast chromosome III are near tRNA genes and LTR sequences. *Cell*, 73: 1007-1018.
- KIM, J.M., S. VANGURI, J.D. BOEKE, A. GABRIEL, ve 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.
- KIM, J. H. ve M. JOHNSTON. 2006. Two glucose-sensing pathways converge on Rgt1 to regulate expression of glucose transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 281: 26144-26149.



LENBURG, M. E. ve E. K. O'SHEA. 2001. Genetic evidence for a morphogenetic function of the *Saccharomyces cerevisiae* Pho85 Cyclin-Dependent kinase. *Genetics*, 157: 39-51.

LIAO, X.-B., J.J. CLARE, ve 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.

LOPEZ, M. C. ve H. V. BAKER. 2000. Understanding the growth phenotype of the yeast *gcr1* mutant in terms of global genomic expression patterns. *J. Bacteriol.*, 182: 4970-4978.

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L.FARR ve R.J. RANDAL. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.

NEIGEBORN, L. ve M. CARLSON. 1987. Mutations causing constitutive invertase synthesis in yeast-Genetic interactions with Snf mutations. *Genetics*, 115: 247-253.

NISSLEY, D. V., D.J. GARFINKEL ve J. N. STRATHERN. 1996. HIV reverse transcription in yeast. *Nature*, 380: 30.

NISSLEY, D. V., P. L. BOYER, D. J. GARFINKEL, S. H. HUGHES ve J. N. STRATHERN. 1998. Hybrid Ty1/HIV-1 elements used to detect inhibitors and monitor the activity of HIV-1 reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, 95: 13905-13910.

NONET, M., C. SCAFE ve R. YOUNG. 1987. Eucaryotic RNA polymerase conditional mutant that rapidly ceases mRNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.*, 7: 1602-1611.

ÖZCAN, S., L.G. VALLIER, J.S. FLICK, M. CARLSON ve M. JOHNSTON. 1997. Expression of the *SUC2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is induced by low levels of glucose. *Yeast*. 13: 127-137.

PAN, X., P. YE, D.S. YUAN, X. WANG, J.S. BADER ve J.D. BOEKE. 2006. A DNA integrity network in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 124: 1069-1081.

PAULL, T.T. ve R.C. JOHNSON. 1995. DNA looping by *Saccharomyces cerevisiae* high mobility group proteins NHP6A/B. *J. Biol. Chem.*, 270: 8744-8754.

ROEDER, G.S., P.J. FARABAUGH, D.T. CHALEFF ve G.R. FINK. 1980. The origins of gene instability in yeast. *Science*. 209: 1375-1380.

- ROLLAND, F., J. WINDERICKX ve J.M. THEVELEIN. 2002. Glucose sensing and – signaling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research*. 2: 183-201.
- ROSE, M.D., F. WINSTON ve P. HIETER. 1990. *Methods in Yeast Genetics. A laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Lab. Press. New York. USA. p. 119-195.
- ROTH, J. F. 2000. The yeast Ty virus-like particles. *Yeast*, 16: 785-795.
- SANTANGELO, G.M. 2006. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70: 253-282.
- SANZ, P. 2007. Yeast as a model system to study glucose-mediated signalling and response. *Front. Biosci.*, 12: 2358-2371.
- SAROKIN, L. ve M. CARLSON. 1985. Upstream region of *SUC2* gene confers regulated expression to a heterologous gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 5: 2521-2526.
- SCHERER, S., R.W. DAVIS. 1980. Recombination of dispersed repeated DNA sequences in yeast. *Science*. 209: 1380-1384.
- SCHNEPER, L., K. DÜVEL ve J. R. BROACH. 2004. Sense and sensibility: nutritional response and signal integration in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.*, 7: 624-630.
- SCOTT, E.W., H.E. ALLISON, H.V. BAKER. 1990. Characterization of *TPI* gene expression in isogenic wild-type and *gcr1*-deletion mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 18:7099-7107.
- SHIDLOVSKII, Y.V. ve E.N. NABIROCHKINA. 2005. The effect of chromatin remodeling and modification on RNA-polymerase-mediated transcription initiation. *Russ. J. Genet.*, 41: 720-727.
- STAHL, G., S.N. BEN SALEM, L.F. CHEN, B. ZHAO ve P.J. FARABAUGH. 2004. Translational accuracy during exponential, postdiauxic, and stationary growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Euk. Cell*, 3: 331-338.
- STALEVA, L. S.ve P. VENKOV. 2001. Activation of Ty transposition by mutagens. *Mutat. Res.*, 474: 93-103.
- SUTTON, P.R. ve S.W. LIEBMAN. 1992. Rearrangements occurring adjacent to a single Ty1 yeast retrotransposon in the presence and absence of full-length Ty1 transcription. *Genetics*, 131: 833-850.

TOH-E, A., K. TANAKA, Y. UESONO ve R. B. WICKNER. 1988. Pho85, a negative regulator of the Pho system, is a homolog of the protein kinase gene, CDC28, of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet., 214: 162-164.

TREITEL, M.A. ve M. CARLSON. 1995. Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 92: 3132-3136.

TÜRKEK, S. ve P.J. FARABAUGH. 1993. Interspersion of an unusual GCN4 activation site with a complex transcriptional repression site in Ty2 elements of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol., 13: 2091-2103.

TÜRKEK, S., X.B. LIAO ve P.J. FARABAUGH. 1997. *GCR1*-dependent transcriptional activation of yeast retrotransposon Ty2-917. Yeast, 13: 917-930.

TÜRKEK, S. ve L.F. BISSON. 1999. Transcription of the *HXT4* gene is regulated by Gcr1p and Gcr2p in the yeast *S. cerevisiae*. Yeast. 15:1045-1057.

TÜRKEK, S. 2002. The *GCR2* gene is required for the transcriptional activation of retrotransposon Ty2-917 in *Saccharomyces cerevisiae*. Biol. Pharm. Bull., 25: 1212-1213.

TÜRKEK, S., T. TURGUT, H. UEMURA, M. C. LOPEZ ve H. V. BAKER. 2003. Mutations in *gcr1* Derepress *SUC2* Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Genet. Genomics. 268: 825-831.

TÜRKEK, S. ve B. YENİCE. 2006. Analysis of the Effects of Chromatin Modifying Complexes on the Transcription of Retrotransposon Ty2-917 in *Saccharomyces cerevisiae*. Turk. J. Biol., 30: 101-106.

UEMURA, H. Ve Y. JIGAMI. 1992. Role of Gcr2 in transcriptional activation of yeast glycolytic genes. Mol. Cell. Biol., 12: 3834-3842.

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

WANG, Z., W. A. WILSON, M. A. FUJİNO VE P. J. ROACH. 2001. The yeast Cyclins Pcl6 and Pcl7 are involved in the control of glycogen storage by the cyclin-dependent protein kinase Pho85p. FEBS Lett. 506: 277-280.

WICKNER, R.B. 1989. Yeast virology. *FASEB J.*, 3: 2257-2265.

WILLIS, K. A., K. E. BARBARA., B. B. MENON., J. MOFFAT., B. ANDREWS.. ve G. M. SANTANGELO. 2003. The global transcriptional activator of *Saccharomyces cerevisiae*, Gcr1p, mediates the response to glucose by stimulating protein synthesis and CLN-dependent cell cycle progression. *Genetics*, 165: 1017-1029.

WILSON, W. A., A. M. MAHRENHOLZ VE P. J. ROACH. 1999. Substrate targeting of the yeast cyclin-dependent kinase pho85p by the cyclin pcl10p. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 7020-7030.

WINSTON, F., D. T. CHALEFF, B. VALENT VE G. R. FINK. 1984. Mutations affecting Ty-mediated expression of the *HIS4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 107: 179-197.

WITT, S. N. ve T. R. FLOWER. 2006. alpha-Synuclein, oxidative stress and apoptosis from the perspective of a yeast model of Parkinson's disease. *FEMS Yeast Res.*, 6:1107-1116.

YENİCE B. 2005. Ty2 Retrotranspozonu Transkripsiyonunun Düzenlenmesine Kromatin Modifiye Edici Faktörlerin Etkilerinin Analizi. Yüksek lisans tezi. Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Bursa.

ZEE, J. M. ve D. M. GLERUM. 2006. Defects in cytochrome oxidase assembly in humans: lessons from yeast. *Biochem. Cell Biol.*, 84: 859-869.

ZHU, Y., J. DAI, P. G. FUERST ve D. F. VOYTAS. 2003. Controlling integration specificity of a yeast retrotransposon. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, 100: 5891-5895.

## EKLER

### Ek 1: Araştırmada Kullanılan Üreme Ortamları ve Çözeltilerin Hazırlanması

#### 1: LB (Luria-Bertani Broth)

*E. coli* için standart üreme ortamı olarak kullanıldı. 10 gram bacto tripton, 5 gram yeast extract, 10 gram NaCl toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü. 121 C'de 25 dakika otoklavda steril edildi.

LB-Ampisilin üreme ortamı için filtrede sterilize edilmiş ampisilin 100 mg/litre olacak şekilde bakteri transformantlarını ekim yapmadan önce taze olarak üreme ortamına eklendi.

LB petrilere hazırlamak için LB sıvı besiyerine sterilizasyondan önce 15 gram/litre agar agar eklendi ve daha sonra 121 C'de 25 dakika otoklavda steril edildi. LB-Ampisilin petrilere için de sterilizasyondan sonra besiyeri sıcaklığı 45-50 C'ye düştükten sonra filtrede sterilize edilmiş Ampisilin 100 mg/litre olacak şekilde üreme ortamına eklendi.

#### 2: YP (Yeast Extract, Peptone)

Bu üreme ortamı *S. cerevisiae* suşlarının üretilmesi için rutin olarak kullanılan zengin/tam besiyeridir. Sıvı ortam olarak veya agar agar ile katılaştırılarak kullanılabilir. Bu besi yerinin hazırlanması için; 10 gram yeast ekstrakt, 20 gram bacto pepton toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü. 121 C'de 25 dakika otoklavda steril edildi.

YP petrilere için YP sıvı besiyerine 20 gram/litre olacak şekilde agar agar eklendi ve 121 C'de 25 dakika otoklavda steril edildi.

Üreme ortamına karbon kaynağı olarak ilave edilen glukoz, %20'lik stok çözelti olarak hazırlanıp 121 C'de 25 dakika otoklavda steril edildi. Kullanımdan hemen önce üreme ortamına son konsantrasyonları %2 olacak şekilde ilave edildi. Glukoz da üreyemeyen suşlar için karbon kaynağı olarak glukoz yerine son konsantrasyonları %2 olacak şekilde steril gliserol ve steril sodyum laktat ilave edildi.

### 3: Sentetik tam –Ura üreme ortamı (-Ura, SC)

Bu üreme ortamı *S. cerevisiae* transformantlarının üretilmesinde seçici ortam olarak katı veya sıvı ortam olarak kullanılır. Ortamın hazırlanmasında; 6.7 gram YNB toplam 1 litre distile suda çözüldü, 121 C’de 25 dakika otoklavda steril edildi. YNB katı besiyerini hazırlamak için 20 gram/litre olacak şekilde ve sterilizasyondan önce agar agar ilave edildi. Amino asit kaynağı olarak urasil içermeyen amino asit karışımı (Sigma Y-1501) 1.92 gram litre olacak şekilde hazırlanıp filtre ile steril edilip YNB ortamına eklendi.

Karbon kaynağı olarak steril glukoz veya sukroz üreme ortamına son konsantrasyonu materyal ve yöntem bölümünde verildiği şekilde ilave edildi. Etanol direkt olarak kullanıldı. 2-DOG ise steril distile suda çözüldükten sonra filtre ile sterilize edilerek kullanıldı.

### 4- $\beta$ -galaktozidaz ölçüm tamponu (Z-Buffer)

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

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

10 mM KCl

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

50 mM  $\beta$ -Merkepto etanol.

Z- buffer yukarıda verilen iyon konsantrasyonlarını sağlayacak şekilde stok ilgili kimyasallar kullanılarak 1 litre olarak hazırlandı. Deneyler süresince +4 C de saklandı.

### 5- ONPG (O-Nitro phenyl $\beta$ -D- Galactoside)

Toplam konsantrasyonu 4 mg/ml olacak şekilde taze olarak 50 ml’lik Z-buffer içinde hazırlandı. Stok çözeltisi +4 C’de saklandı

### 6- $\beta$ -Galaktozidaz breaking buffer (Hücre Süspansiyon Çözeltisi)

100 mM Tris. HCl, pH: 8

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

%20 Gliserol

4 mM PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride)

Hücre Süspansiyon Çözeltisi yukarıda verilen kimyasalların stok çözeltileri kullanılarak verilen konsantrasyonları oluşturacak şekilde hazırlandı. Deneyle süresince +4 C de saklandı.

#### **7- 1M Sodyum karbonat**

106 gram Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü. Deneyle süresince oda sıcaklığında saklandı.

#### **8- 0.1 M Lityum asetat**

Lityum asetat 0.2 M stok olarak hazırlandı. 121 C’de 25 dakika otoklavda steril edildi. Kullanımdan önce 1xTE ile son konsantrasyon 0.1 M olacak şekilde seyreltildi. Oda sıcaklığında saklandı.

#### **9- %50 Polietilen Glikol (PEG-4000).**

50 gram Polietilen glikol (4000) toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile suda eritildi. 121 C’de 25 dakika otoklavda steril edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

#### **10- 1x TE, pH:7.4**

10 mM Tris.HCl, pH: 7.6

1 mM EDTA, pH: 8.0.

Tris.HCl ve EDTA stok çözeltilerden seyreltilip otoklavda steril edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

#### **11- Lowry C- çözeltisinin hazırlanması.**

Lowry A çözeltisi: %2 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1 N NaOH. 20g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 4g NaOH toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

Lowry B1 çözeltisi: %1 CuSO<sub>4</sub>. 1 gram CuSO<sub>4</sub> toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile suda çözüldü.

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

Lowry C her deneyde taze olarak stok çözeltilerden hazırlandı. Lowry C çözeltilisini hazırlamak için; 98 ml Lowry A, 1 ml Lowry B1, 1 ml Lowry B2 alınarak karıştırıldı ve hemen kullanıldı.



**EK 2:  $\beta$ -Galaktozidaz Aktivitesinin Hesaplanması**

*S. cerevisiae* transformantlarındaki lacZ gen füzyonlarından yapılan  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktiviteleri aşağıdaki eşitliğe göre hesap edildi.

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

Bu eşitlikte;

Aktivite:  $\mu$ M ONPG/dak/mg protein.

$OD_{420}$ :  $\beta$ -galaktozidaz reaksiyonunda oluşan sarı rengin 420 nm'deki absorbansı

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

t:  $\beta$ -galaktozidaz reaksiyon süresi (Dakika cinsinden verilmelidir)

P: Hücre lizatlarının protein konsantrasyonları (mg/ml olarak verilmelidir).

$\beta$ -galaktozidaz aktiviteli hesaplanmasında yukarıdaki formül excel tablosuna dönüştürülerek kullanılmıştır.

**TEŞEKKÜR**

Lisans ve Yüksek Lisans öğrenimim boyunca, bana verdiği kaliteli eğitimden dolayı, ayrıca; araştırmalarım ve tezim de dahil her türlü konuda maddi ve manevi olarak bana gösterdiği sonsuz destek ve anlayışından dolayı saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Sezai Türkel'e; Hayatım boyunca bana gösterdikleri anlayış, maddi ve manevi desteklerinden dolayı sevgili aileme çok teşekkürler ederim.

Bu tezde yer alan araştırmalar TÜBİTAK (Proje no: 104T307) ve Uludağ Üniversitesi Araştırma Fonu (Proje no: 2004/39) tarafından desteklenmiştir. Proje destekleri nedeniyle TÜBİTAK ve Uludağ Üniversitesi Araştırma Fonuna teşekkür ederim.

**ÖZGEÇMİŞ**

28.02.1981'de Bursa ilinde doğdu. İlkokulu Namazgah İhsan Dikmen İlköğretim okulunda, liseyi Yabancı Dil Ağırlıklı Çelebi Mehmet Lisesi'nde (Bursa) tamamladı. 2000 yılında Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazanarak, lisans eğitimine başladı. 2005 yılında U. Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2005 güz yarıyılında Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalı, Moleküler Biyoloji Bilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.