

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

**NON-HİSTON PROTEİNLERİ VE TRANSKRİPSİYON MEDIATÖRLERİNİN**  
**HXT GENLERİ TRANSKRİPSİYONUNUN DÜZENLENMESİNE**  
**ETKİLERİNİN ANALİZİ**

**Sinem GÜZELVARDAR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BURSA 2005**

T.C  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

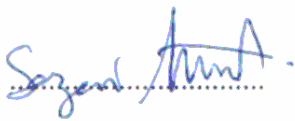
NON-HİSTON PROTEİNLERİ VE TRANSKRİPSİYON MEDIATÖRLERİNİN  
HXT GENLERİ TRANSKRİPSİYONUNUN DÜZENLENMESİNE  
ETKİLERİNİN ANALİZİ

Sinem GÜZELVARDAR

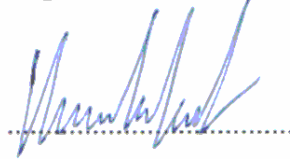
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 15.08.2005..... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/~~oy çokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

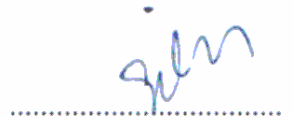
Doç. Dr.  
Sezai TÜRKEL  
(Danışman)



Doç. Dr.  
Özgür A. KARABULUT



Yrd. Doç. Dr.  
Sibel TAŞ



## ÖZET

### Non-Histon Proteinleri ve Transkripsiyon Mediatörlerinin *HXT* Genleri Transkripsiyonunun Düzenlenmesine Etkilerinin Analizi

*Saccharomyces cerevisiae*'da *HXT2* ve *HXT4* genleri glukozun alımı için gerekli olan iki farklı transporter kodlar. Bu araştırmada mutant maya suşları kullanılarak, kromatin yapısını değiştiren faktörlerin *HXT2* ve *HXT4* genleri transkripsiyonuna etkileri araştırıldı.

*HXT2* ve *HXT4* genlerinin transkripsiyonal aktivasyonlarının tamamen non-histon proteinleri olan Nhp6A/B'ye bağlı olduğu bulundu.  $\Delta nhp6A/B$  mutant maya suşunda *HXT2* ve *HXT4* genleri transkripsiyonunda yaklaşık olarak 5-10 kat azalma belirlendi. Bu sonuçlara ek olarak,  $\Delta nhp10$  mutantında *HXT2* transkripsiyonunda 2 katlık bir azalmanın olması, Nhp10p'nin *HXT2* geni transkripsiyonunun aktivasyonu için gerekli olabileceğini gösterdi. SAGA kompleksinin *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyonlarına etkileri  $\Delta spt7$  mutant maya suşu kullanılarak araştırıldı.  $\Delta spt7$  mutant maya suşunda *HXT4* geni transkripsiyonunun yaklaşık olarak 20 kat azaldığı bulundu. *HXT4*'den farklı olarak, *HXT2* geni transkripsiyonunun  $\Delta spt7$  mutantında sadece 2 kat azaldığı bulundu.

Maya mediatör kompleksinin *HXT2* ve *HXT4* genleri transkripsiyonuna etkileri de analiz edildi. *HXT4*'ün hem bazal hemde aktive edilmiş transkripsiyonunun  $\Delta med2$  mutant suşunda 10-15 kat azaldığı bulundu. Fakat *HXT2* transkripsiyonu  $\Delta med2$  mutantında sadece 2 kat azaldı. Diğer bir mediatör olan Srb10'un *HXT2* ve *HXT4* genleri transkripsiyonuna önemli bir etkisi olmadığı bulundu.

Bu sonuçlar, daha önceden belirlenen transkripsiyon faktörlerine ek olarak *HXT2* ve *HXT4* genlerinin transkripsiyonlarının SAGA kompleksi, Nhp6A/B ve Med2p ile düzenlendiğini gösterdi.

**Anahtar Kelimeler:** Transkripsiyon, Nükleozom, Glukoz transportu, *HXT* genleri, *S. cerevisiae*, Kromatin faktörleri.

**ABSTRACT**

Analysis of the Effects of non-histone proteins and transcriptional mediators on the regulation of HXT genes transcription

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *HXT2* and *HXT4* genes encode two different glucose transporters which are required for the glucose uptake. In this research, the effects of chromatin modifying factors on the *HXT2* and *HXT4* genes transcriptions were investigated by using mutant yeast strains.

It was found that transcriptional activation of *HXT2* and *HXT4* are completely depends on the non-histone proteins Nhp6A/B. Approximately 5-10 fold decrease was determined in the transcription of *HXT2* and *HXT4* genes in  $\Delta nhp6A/B$  mutant yeast cells. In addition to this results, 2 fold decrease in the transcription of *HXT2* in  $\Delta nhp10$  mutation indicated that Nhp10 may be required for the activation of *HXT2* genes. The effects of SAGA complex on the *HXT2* and *HXT4* transcriptions were investigated using  $\Delta spt7$  mutant yeast strain. It was found that the transcription of *HXT4* decreased approximately 20-fold in  $\Delta spt7$  mutant yeast strain. Unlike *HXT4* transcription, *HXT2* transcription decreases 2-fold in  $\Delta spt7$  mutants.

The effects of yeast mediator complex on the transcription of *HXT2* and *HXT4* were also analysed. It is found that both basal and activated transcription of *HXT4* decrease 15 fold in the  $\Delta med2$  mutant yeast strain. But, transcription of *HXT2* decreased only 2-fold in  $\Delta med2$  mutant strain. It was also found that, Srb10p, which is another mediator protein, doesn't have any significant effect on *HXT2* and *HXT4* genes transcription.

These results indicated that the transcription of *HXT2* and *HXT4* genes are regulated by SAGA complex, Nhp6A/B and Med2p, in addition to previously identified regulatory transcription factors.

**Key words:** Transcription, Nucleosome, Glucose transport, *HXT* genes, *S. cerevisiae*, Chromatin factors.



3- MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3. 1. Araştırmalarda Kullanılan <i>S. cerevisiae</i> Suşları ve Üreme Ortamı.....	25
3. 2. Kullanılan Plazmitlerin Çoğaltılması.....	26
3. 3. Araştırmada Kullanılan Plazmidlerin Yapısı ve Transformasyonu.....	26
3. 4. $\beta$ -galaktozidaz Aktivitelerinin Ölçülmesi.....	28
3. 5. <i>HXT2</i> ve <i>HXT4</i> 'de Derepresyon Hızının Zamana Bağlı Ölçümü.....	29
4- SONUÇLAR .....	30
4. 1. Non-histon Protein 6A/B'nin <i>HXT2</i> ve <i>HXT4</i> Genlerinin Transkripsiyonlarına Etkileri .....	30
4. 2. <i>HXT2</i> ve <i>HXT4</i> Transkripsiyonlarının Zaman Aralıklı Ölçülmesi.....	31
4. 3. Rpd3p'nin <i>HXT2</i> ve <i>HXT4</i> Transkripsiyonlarına Etkileri.....	32
4. 4. Hda1p'nin <i>HXT2</i> ve <i>HXT4</i> Transkripsiyonlarına Etkileri.....	33
4. 5. Srb10 Mediator Bileşeninin <i>HXT2</i> ve <i>HXT4</i> Transkripsiyonuna Etkileri...35	
4. 6. ATP-Bağımlı Kromatin Düzenleyen Isw2p' <i>HXT2</i> ve <i>HXT4</i> Transkripsiyonlarına Etkileri.....	36
4. 7. Mediator Kompleksi Bileşeni Med2p'nin <i>HXT2</i> ve <i>HXT4</i> Transkripsiyonlarına Etkileri.....	37
4. 8. Kromatin Faktörü Nhp10p'nin <i>HXT2</i> ve <i>HXT4</i> Transkripsiyonlarına Etkileri.....	38
4. 9. SAGA Kompleksi Bileşeni Spt7p'nin <i>HXT2</i> ve <i>HXT4</i> Genleri Transkripsiyonlarına Etkileri.....	39
5- TARTIŞMA.....	41
6- KAYNAKLAR.....	44
EKLER.....	52
TEŞEKKÜR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	56

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

ADA	: Adaptör
ATP	: <u>A</u> denozin tri fosfat
CDK	: <u>C</u> yclin <u>D</u> ependent <u>K</u> inase
CHA	: <u>C</u> atabolism of <u>H</u> ydroxy <u>A</u> mino acids
CTD	: <u>C</u> <u>T</u> erminal <u>D</u> omain
CUP	: <u>C</u> opper
CYC	: <u>C</u> ytochrome C
DDR	: <u>D</u> NA <u>D</u> amage <u>R</u> esponsive
DDSE	: <u>D</u> NA Sequence <u>D</u> ependent <u>S</u> uppressing <u>E</u> lement
DRS	: <u>D</u> ownstream <u>R</u> epressing <u>S</u> ite
GAL	: <u>G</u> alactose utilisation
GCN	: <u>G</u> eneral <u>C</u> ontrol <u>N</u> on-derepressible
GCR	: <u>G</u> lycolysis <u>R</u> egulatory Protein
GLK	: <u>G</u> lukokinaz
GPCR	: <u>G</u> Protein <u>C</u> oupled <u>R</u> eceptor
GTFs	: <u>G</u> eneral <u>T</u> ranscription <u>F</u> actors
HAT	: <u>H</u> istone <u>A</u> cetyl <u>T</u> ransferase
HDAC	: <u>H</u> istone <u>D</u> eacetylase
HDA1	: <u>H</u> istone <u>D</u> easetylase-1
HMG	: <u>H</u> igh <u>M</u> obility <u>G</u> roup
HXK	: <u>H</u> exokinase
HXT	: <u>H</u> exose <u>T</u> ransporter
ISW	: <u>I</u> mitation of <u>S</u> witch
K <sub>m</sub>	: Michaels Sabiti
MAT	: <u>M</u> ating type
MED	: <u>M</u> ediator
MIG1	: <u>M</u> ulticopy <u>I</u> nhibitor of <u>G</u> AL Genes-1
MSN	: <u>M</u> ulticopy <u>S</u> uppressor of <u>S</u> nf
NHP	: <u>N</u> on <u>H</u> istone <u>P</u> rotein
NaOAc	: Sodium acetate
OD	: <u>O</u> ptical <u>D</u> ensity
ONPG	: <u>O</u> rto <u>N</u> itro <u>P</u> henyl <u>G</u> alactoside
PKA	: <u>P</u> rotein <u>k</u> inase <u>A</u>
PKC	: <u>P</u> rotein <u>k</u> inase <u>C</u>

## VIII

RGR	: <u>R</u> esistant to <u>G</u> lucose <u>R</u> epression
RGT2	: <u>R</u> estores <u>G</u> lucose <u>T</u> ransport
RPD3	: <u>R</u> educed <u>P</u> otassium <u>D</u> ependency
RSC	: <u>R</u> emodel the <u>S</u> tructure of <u>C</u> hromatin
SAGA	: <u>S</u> pt- <u>A</u> da- <u>G</u> cn5- <u>A</u> cetylase
SIN3	: <u>S</u> witch <u>I</u> ndependent-3
SIR2	: <u>S</u> ilent <u>I</u> nformation <u>R</u> egulator-2
SNF	: <u>S</u> ucrose <u>N</u> on- <u>F</u> ermenting
SPT	: <u>S</u> upressor of <u>T</u> y
SRB	: <u>S</u> upressor of <u>R</u> NA polymerase <u>B</u>
SSN6	: <u>S</u> upressor of <u>S</u> nf-6
STE12	: <u>S</u> teril-12
STRE	: <u>S</u> tress <u>R</u> esponse <u>E</u> lement
SUC2	: <u>S</u> ucrose fermentation-2
SWI	: <u>S</u> witch
TAFs	: <u>T</u> FII- <u>B</u> <u>A</u> ssociated <u>F</u> actors
TBP	: <u>T</u> A <u>T</u> A <u>B</u> inding <u>P</u> rotein
TUP1	: <u>T</u> imidin <u>U</u> ptake-1
UAS	: <u>U</u> pstream <u>A</u> ctivating <u>S</u> equence
UME6	: <u>U</u> nscheduled <u>M</u> eiotic gene <u>E</u> xpression
Vmax	: Maximum Enzim Hızı
YP	: <u>Y</u> east extract and <u>P</u> eptone
M	: Mol
ml	: Mililitre
µl	: <u>M</u> ikrolitre
W/V	: <u>W</u> eight / <u>V</u> olume
β	: Beta
°C	: Santigrad
Δ	: Delta (Delesyon)
rpm	: <u>R</u> evolution <u>P</u> er <u>M</u> inute



**ŞEKİLLER DİZİNİ**

<b><u>Sekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2. 1 Eukaryotlarda transkripsiyon başlangıcında birbirleriyle etkileşen faktörler.....	4
2. 2. Nükleozomların yeniden organizasyonu.....	6
2. 3. Mayada mediatör kompleksinin modüler yapısı .....	14
2. 4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'da glukoz algılanması ve glukoz sinyal iletimi .....	18
2. 5. <i>HXT2</i> ve <i>HXT4</i> genlerinin farklı glukoz konsantrasyonlarına göre düzenlenmesi.	20
2. 6. <i>S. cerevisiae</i> 'da glukoz sinyalinin algılanma mekanizmaları.....	24

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3. 1. Araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşlarının genotipleri.....	25
4. 1. Nhp6A/B faktörlerinin <i>HXT2</i> ve <i>HXT4</i> transkripsiyonuna etkileri.....	31
4. 2. <i>HXT2</i> ve <i>HXT4</i> transkripsiyonlarının zaman aralıklı ölçülmesi .....	32
4. 3. HDAC'lardan Rpd3p'nin <i>HXT2</i> ve <i>HXT4</i> transkripsiyonlarına etkileri .....	33
4. 4. HDAC'lardan Hda1p'nin <i>HXT2</i> ve <i>HXT4</i> transkripsiyonlarına etkileri.....	34
4. 5. Mediator bileşeni Srb10'un <i>HXT2</i> ve <i>HXT4</i> transkripsiyonlarına etkileri.....	36
4. 6. ATP-bağımlı kromatin düzenleyen Isw2 faktörünün <i>HXT2</i> ve <i>HXT4</i> transkripsiyonlarına etkileri .....	37
4. 7. Med2 mediatör bileşeninin <i>HXT2</i> ve <i>HXT4</i> transkripsiyonlarına etkileri.....	38
4. 8. Nhp10p'nin <i>HXT2</i> ve <i>HXT4</i> transkripsiyonlarına etkileri.....	39
4. 9. SAGA bileşeni Spt7p'nin <i>HXT2</i> ve <i>HXT4</i> transkripsiyonlarına etkileri.....	40

## 1. GİRİŞ

Eukaryotlarda DNA'nın nükleozomlarla sıkı paketlenmiş kromatin yapısı şeklinde bulunması, transkripsiyon faktörlerinin genlerdeki promotor bölgelerine bağlanmasını engelleyen önemli bir faktördür (Wu ve Grunstein 2000). Genlerden transkripsiyonun başlatılabilmesi için ilk önce kromatin yapısının açılması gerekmektedir. Kromatin yapısını modifiye eden veya nükleozomların yerlerini değiştiren kompleksler *S. cerevisiae*'da keşfedilmiştir. Bunlardan en önemlileri nükleozomların kromatinden ayrılmasını sağlayan ve histon asetil transferaz aktivitesine sahip olan SAGA kompleksi ve histonların deasetillenmesini sağlayıp kromatin oluşumunu sağlayan HDAC kompleksleridir (Yang ve Seto 2003, Timmers ve Tora 2005). Bunlara ek olarak non-histon proteinler ve transkripsiyon represörleri de genlerden transkripsiyon yapılmasını engelleyebilir.

*S. cerevisiae* kromatin yapısının genlerden yapılan transkripsiyona etkilerinin araştırılması için iyi bir model sistem olmuştur. *S. cerevisiae*'nın eukaryotik bir organizma olması, mutant izolasyonunun kolay ve üremenin hızlı olması bu organizmanın eukaryotlarda transkripsiyonun biyokimyasal ve genetik analizi için ideal bir in vitro sistem olarak tercih edilmesine neden olmuştur. Transkripsiyonun kontrolünde kromatin faktörlerinin etkilerinin analizinde de *S. cerevisiae*'da bazı genler model sistem olarak kullanılmıştır. *SUC2* geninden yapılan transkripsiyonun nükleozomlarla baskılandığı uzun süre önce belirlenmiştir (Wu ve Winston 1997, Bu ve Schmidt 1998).

*S. cerevisiae*'da *HXT2* ve *HXT4* genlerinin transkripsiyonu ortamdaki glukoz konsantrasyonuna göre düzenlenmektedir. Bu genler glukozun hücre içine alınması için membranda yer alan glukoz transporterlarını kodlamaktadırlar (Kruckeberg ve Bisson 1990, Theodoris ve ark. 1994). Üreme ortamında yüksek konsantrasyonda serbest glukoz bulunması *HXT2* ve *HXT4* genlerinden yapılan transkripsiyonun baskılanmasına neden olur. *HXT2* ve *HXT4* genlerinin transkripsiyonunu baskılayan represör proteinler bu genlerin promotor dizilerine bağlandığı gösterilen Mig1p ve Rgt1p'dir (Özcan ve Johnston 1996). Represör protein olan Mig1p, Ssn6p ve Tup1p olarak bilinen iki farklı protein ile de etkileşerek bir kompleks proteine dönüşür. Ssn6p ve Tup1p'ni direkt olarak DNA'ya bağlanamaz ve bu nedenle ko-represörler olarak adlandırılırlar.

Tup1p'nin *SUC2* gibi bazı promotorlarda nükleozomlar ile de etkileştiği ve nükleozomların hedef genlerin promotor bölgelerine yerleşmesini sağladığı bilinmektedir (Edmondson ve ark. 1996). Buna rağmen *HXT2* ve *HXT4* genlerinde transkripsiyon baskılanmasında nükleozomların bulunup bulunmadığı henüz rapor edilmemiştir. *S. cerevisiae*'da kromatin yapısına katılan non-histon proteinlerin *HXT2* ve *HXT4* genleri transkripsiyonuna etkileri de henüz araştırılmamıştır.

*HXT2* ve *HXT4* genlerinin transkripsiyonu üreme ortamında glukoz konsantrasyonu düşük olduğunda Gcr1p kompleksi ve Rgt1p ile aktive edilir (Türkel ve Bisson 1999, Mosley ve ark. 2003). Rgt1p bir fosfoprotein olup, fosforlanma durumuna göre represör veya aktivatör olabilir (Polish ve ark. 2005, Mosley ve ark. 2003). *HXT2* ve *HXT4* genlerinin aktivasyonu için Mig1p'nin de bu genlerin promotorlarından ayrıldığı bilinmektedir (DeVit ve ark. 1997, DeVit ve Johnston 1999.)

Bu tez araştırmasının amacı *HXT2* ve *HXT4* genlerinin transkripsiyonuna kromatin yapısının ve kromatin yapısını modifiye eden komplekslerin etkisinin bulunup bulunmadığını araştırmaktır. Elde edilen sonuçlar bazı kromatin modifiye eden faktörlerin ve transkripsiyon mediatörlerinin *HXT2* ve *HXT4* genlerinde transkripsiyonun baskılanmasına veya aktive edilmesine önemli etkileri olduğunu göstermiştir.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2. 1. Bazal Transkripsiyon Mekanizması

Transkripsiyonun temel özellikleri eukaryotlar arasında iyi şekilde korunmuştur (Heintz 1991, Guarente ve Bermingham-McDonogh 1992). Eukaryotik genler DNA'ya bağlı RNA Polimerazlar tarafından (RNAP) RNA moleküllerine transkribe edilirler. Üç farklı eukaryotik RNA Polimeraz; RNA polimeraz I, II ve III farklı araştırma grupları tarafından saflaştırılmıştır (Archambault ve Friesen 1993). RNA Pol I ribozomal RNA'yı (rRNA), RNA Pol II tüm protein kodlayan genleri (sınıf II genler) ve RNA Pol III de 5S RNA ve diğer küçük RNA moleküllerini (örneğin tRNA'lar gibi) transkribe ederler (Archambault ve Friesen 1993).

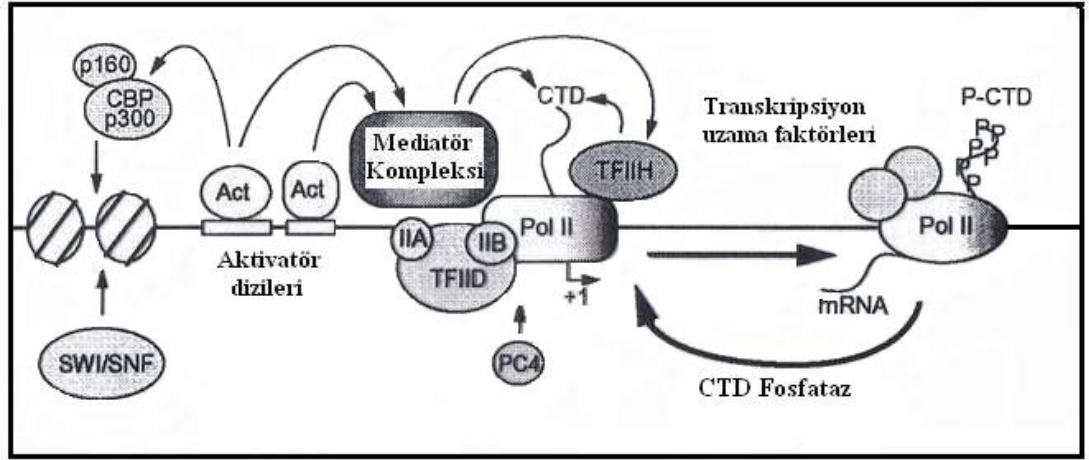
RNA Polimerazların kendiliğinden transkripsiyonu başlatabilme özellikleri yoktur. Transkripsiyonun başlatılması için çok sayıda bazal transkripsiyon faktörü gereklidir. Ayrıca, eukaryotik genlerde transkripsiyonu düzenleyen aktivatör veya represör proteinlerinin bağlandığı DNA bölgeleri (cis-acting promotor elementleri) de transkripsiyon başlaması ve kontrolü için gereklidir (Sawadoga ve Sentenac 1990).

Eukaryotik sınıf II genlerde cis-acting DNA elementleri fonksiyonel olarak iki farklı grupta sınıflandırılmıştır. İlk grup bazal promotor elementleri, TATA kutusu (TATA box) ve initiator'dan oluşur. Bunlar transkripsiyonun polaritesini belirlerler. En yaygın promotor elementi olan TATA kutusu TATAAA ortak dizisinden meydana gelir ve sınıf II genlerin 5' transkribe edilmeyen kısmında, transkripsiyon başlangıç alanının 30 bp üst kısmında yerleşmiştir. Bununla beraber, *Saccharomyces cerevisiae*'nin sınıf II genlerinde TATA kutusunun yeri değişkendir. TATA kutusu transkripsiyon başlangıç alanının 130 bp yukarısına kadar yerleşebilir (Guarente 1984, Nagawa ve Fink 1985, Struhl 1989).

Promotor elementlerinin 2. grubu cis-acting transkripsiyon düzenleyici elementlerdir. Bu DNA bölgelerine bağlanan transkripsiyon faktörleri değişen ortam şartları, çevresel ve hücrel sinyallere göre ilgili genlerin transkripsiyonlarını düzenlemektedirler. Aktivatör yada represör cis-acting elementler değişen uzunluklarda bazal promotorun 5' veya 3' yönünde olabilir (Hurt ve ark. 1991, Chen ve ark. 1994, Sinclair ve ark. 1994, Kadonaga 2004).

Transkripsiyon bir ön başlatma kompleksinin oluşumu ile başlamaktadır. Ön başlatma kompleksi sınıf II genlerin promotor bölgesinde RNA Pol II ve bazal

transkripsiyon faktörleri olan TFIID, TFIIA, TFIIB, TFIIF, TFIIH ve TFIIE'nin düzenli şekilde bir araya gelmesiyle oluşmaktadır (Flores ve ark 1991, Killeen ve Greenblatt 1992, Zawel ve Reinberg 1992). Ön başlatma kompleksinin oluşumundan sonra transkripsiyonun başlayacağı bölgede DNA'nın çözülmesi, kısmen tek zincirli hale gelmesi gerekir (Conaway ve Conaway 1993). DNA'nın açılması da TFIIH kompleksinin ATPase ve helikaz aktivitesi ile sağlanır (Sopta ve ark. 1989, Wang ve ark. 1992). Promotor bölgesinde DNA'nın açılmasından sonra transkripsiyonun devam (elongation) aşamasına geçilebilmesi için RNA Polimeraz-II'nin en büyük altbirimi olan proteinin karboksi ucunun (C-terminal domain, CTD) fosforlanması gerekmektedir (Payne ve ark. 1989). Fosforlanma işleminin de TFIIH tarafından kataliz edildiği gösterilmiştir (Gileadi ve ark. 1992) (Şekil 2. 1). CTD'nin fosforlanmasından sonra RNA polimeraz-II promotordan ayrılır ve DNA üzerinde ilerleyerek transkripsiyonu başlatır. Transkripsiyon gen üzerindeki sonlandırma sinyaline kadar devam eder.



**Şekil 2.1.** Eukaryotlarda transkripsiyon başlangıcında birbirileriyle etkileşen faktörler (Rachez ve Freedman 2001)

## 2. 2. Eukaryotik Sınıf II Genlerde Transkripsiyonal Aktivasyon Mekanizması

Eukaryotik organizmaların genleri, oldukça yoğun ve sıkı şekilde paketlenmiş kromatin yapıları halinde bulunmaktadır. Eukaryotik kromatinin yoğunlaşmış yapılar halinde paketlenmesi, H2A, H2B, Histon H3 ve Histon H4 moleküllerinin meydana

getirdiği nükleozomlar tarafından yapılır. DNA'nın yoğun kromatin olarak bulunması da genlerden transkripsiyon yapılmasını engellemektedir (Perez-Martin 1999).

Kromozomun transkripsiyonal olarak aktif bölgelerinde kromatin yapısının açılması, *Drosophila* politen kromozomlarında uzun süre önce keşfedilmiştir. Kromatinin transkribe edilen kısımlarının daha açık ve DNase'lara daha duyarlı olduğu da gösterilmiştir (Elgin 1988). Transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanabilmeleri için açık kromatin bölgelerinin olması gerekmektedir. İnaktif, sıkı paketlenmiş kromatin yapılarının açılması, çözünmesi de yine bazı transkripsiyon faktörleri, histonları modifiye eden enzim kompleksleri veya ATP kullanarak nükleozomları DNA'dan uzaklaştıran kompleks faktörlerce yapılmaktadır (Sudarsanam ve Winston 2000).

### **2. 3. Transkripsiyonun Baskılanması**

Transkripsiyonal represörler tıpkı transkripsiyonal aktivatörler gibi eukaryotik genlerin kontrollü transkripsiyonu için gerekli faktörlerdir. Eukaryotik gen transkripsiyonu sadece transkripsiyonal aktivatörler tarafından düzenlenmez, aynı zamanda transkripsiyonal represörler de gen işleyişinin düzenlenmesinde çok önemlidir. Bazı genler gelişim aşamaları sırasında baskılanırken, diğerleri fazla miktarda transkribe edilebilir (Nasmyth ve Shore 1987).

Transkripsiyonal baskılama mekanizmaları dört grupta sınıflandırılır.

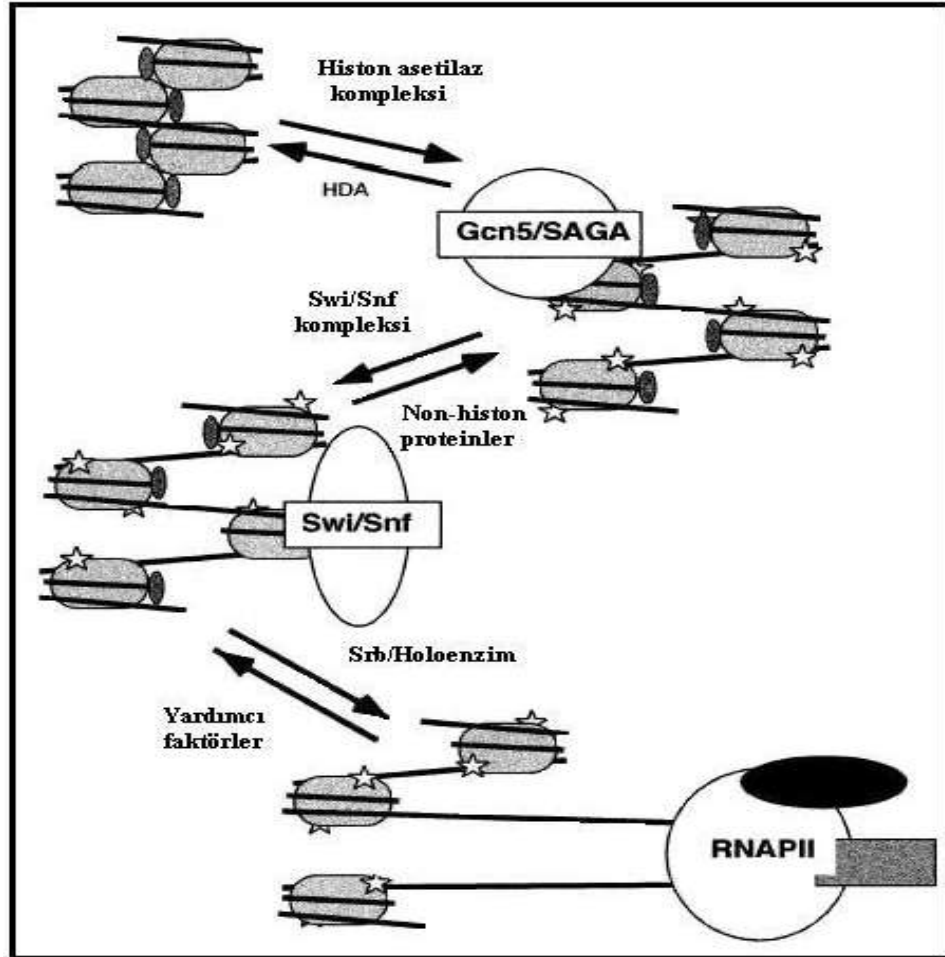
- 1- Transkripsiyonal aktivasyonu engelleme ile baskılama
- 2- Aktif transkripsiyonal baskılama
- 3- Transkripsiyonun global baskılanması
- 4- İnaktif kromatin oluşumu ile baskılama

Transkripsiyonal aktivasyonu engelleme ile baskılamada transkripsiyonal represörler, transkripsiyonal aktivasyonda gerekli olan herhangi bir adımı engelleyerek transkripsiyonu baskılayabilirler (Herschbach ve Johnson 1993, Thiel ve ark. 2004). Eukaryotlarda keşfedilmiş en erken baskılama mekanizmalarından biri, transkripsiyonal aktivatörlerin sitoplazmada tutulmasıdır (Ghosh ve Baltimore 1990). Transkripsiyonal represörler ayrıca aktivatörlerin DNA'ya bağlanma aktivitelerini bozarak da baskılama görevini yerine getirirler (Park ve Craig 1989).

#### 2. 4. *Saccharomyces cerevisiae*'da Kromatinin Transkripsiyona Etkileri

Eukaryotlarda DNA heterokromatin ve eukromatin olmak üzere iki şekilde bulunur. İnterfaz nukleusunda aşırı yoğunlaşma gösteren bölgeler heterokromatin yapısındadır. Nukleusta genellikle daha açık renkli gözükten bölgeler, aktif olarak transkribe edilen DNA'nın bulunduğu eukromatin bölgeleridir (Lewin 2004).

Genetik materyalin yapısal durumu ile transkripsiyonal aktivite arasında direkt bir bağlantı vardır (Şekil 2. 2). Çok yoğun paketlenmiş durumdaki kromatinden transkripsiyon yapılamaz (Bernstein ve Schreiber 2002). Eukaryotik transkripsiyonda esas sorun, transkripsiyonu başlatan veya aktive eden faktörlerin nükleozom ve diğer nükleer proteinlerce sıkı paketlenmiş genlerden transkripsiyonu nasıl başlattığıdır.



Şekil 2. 2. Nükleozomların yeniden organizasyonu (Perez-Martin 1999).



Nükleozomun kromatin veya genlerin kontrol bölgelerindeki durumu transkripsiyon için çok önemlidir. Nükleozomu düzenleyerek transkripsiyonu arttıran yada azaltan faktörler bulunmuştur. Bu faktörler etki mekanizmalarına göre iki grupta toplanırlar. Bunlar;

Negatif faktörler histon deasetilaz kompleksleri, histonlar, non histon kromatin ile birleşen proteinler ve kromatinin yapısal bileşenlerini kapsar.

Pozitif faktörler ise Swi / Snf, Srb / Mediatör ve SAGA olarak tanımlanmış birkaç çoklu protein kompleksleri ve kromatini yeniden modelleyen kompleksleri içeren faktörlerdir.

Yapılan son çalışmalar genel transkripsiyon mekanizması ve gene özel transkripsiyon faktörlerinin girişini kolaylaştırmak için nükleozom yapısını çözmeye odaklanmıştır (Perez-Martin 1999).

#### **2. 4. 1. Kromatin Yapısını Oluşturan Faktörler**

**2. 4. 1. 1. Histonlar:** Oktomerik bir çekirdeğin oluşturduğu nükleozom, her histonun iki kopyasını içerir (H2A, H2B, H3 ve H4). Bu çekirdek 147 bp'lik DNA ile 1,65 dönüştürülmüştür. H1 histonu DNA'nın diğer nükleozoma bağlanmasında görev yapar. Her histon bir merkezi çekirdek kısmına (histon fold) ve bir amino terminal uç kısmına sahiptir ki, bu amino uç sarmal DNA dışına uzanır. Histon katlanması, hem nükleozomal çekirdek içinde histon-histon etkileşimi hem de histon-DNA etkileşimi ile ilgilidir (Horn ve Peterson 2002).

Histonların transkripsiyonun düzenlenmesine etkileri in vitro ve in vivo deneyler ile araştırılmıştır. Transkripsiyonun global represörü olarak bilinen nükleozomların rolü, histon "*SIN*" mutasyonları olarak bilinen özel histon mutasyonlarının incelenmesiyle belirlenmiştir. Bu histon mutasyonları *SWI* genlerinde delesyonların supresörleri olarak elde edilmişlerdir. Bununla beraber *SWI* geni delesyonunun yanında bu histon mutasyonları, *GCN5* geni ve RNA polimeraz II'nin en büyük alt biriminin C terminal ucu kısmi delesyonlarının (*Srb<sup>-</sup>* fenotipi) neden olduğu transkripsiyonal eksiklikleri de baskılayabilir. Histonlardaki SIN kısmı (fonksiyonel bölge) transkripsiyonun negatif bir düzenleyicisi gibi davranır. Histon H4 geninde sin mutasyonları taşıyan *S. cerevisiae*'dan elde edilen kromatin yapısı analizleri nükleozomal DNA'nın açılmış olduğunu göstermektedir (Perez-Martin 1999).

Histonların uç kısımları da transkripsiyonda önemlidir. Hem H3 hem de H4'de sistematik delesyonlar histon uçlarının hem gen aktivasyonunda hem de gen baskılamasında fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir. Örneğin; Histon H3 ucu delesyonları *GALI* mRNA seviyelerini arttırırken, H4 ucunda benzer delesyonların aynı genin mRNA seviyelerini düşürdüğü bulunmuştur (Perez-Martin 1999).

#### **2. 4. 1. 2. Non-histon proteinler**

DNA histon kompleksleri ile etkileşim halindeki non histon proteinler, kromatin yapısını modifiye edebilir. Non histon proteinlerin başlıcaları High Mobility Group proteinleridir (HMG). Üç tip HMG protein olduğu gösterilmiştir. Bunlar HMG1/2, HMG14/17 ve HMG-I(Y)'dir. Bu üç gruptan sadece HMG1/2 gurubu proteinlerin *S. cerevisiae* bulunduğu belirlenmiştir (Perez-Martin 1999).

Non-histon 6A/B (Nhp6A/B) proteinleri de HMG proteinlerinden olup *S. cerevisiae*'da kromatin oluşumuna katılırlar. Bu proteinlerin RNA Pol II ile transkribe edilen bazı genlerin transkripsiyonunun kontrolü için gerekli olduğu bilinmektedir (Moreira ve Holmberg 2000). Nhp6A ve Nhp6B proteinleri diziye özel olmayan DNA'ya bağlanan proteinlerdir. Bu proteinlerin kromatin yapısında önemli değişikliklere neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Nhp6A ve Nhp6B'nin *S. cerevisiae*'da *SUC2* ile birlikte birçok genin transkripsiyonunun kontrolü için gerekli olduğu da gösterilmiştir (Türkel 2004).

Başka bir HMG benzeri protein olan Sin1/Spt2 ile yapılan çalışmalar, kromatin ile transkripsiyon arasındaki ilişkide HMG proteinlerinin çok önemli işlevleri olduğunu göstermiştir. Sin1 proteininin hem DNA ve hem de histonlarla etkileşerek nükleozom yapılarını sabitletiği bulunmuştur. Biyokimyasal ve genetik bulgular Sin1p'nin Swi/Snf kompleksi ile de etkileştiğini göstermiştir. Sin1 proteini Swi/Snf kompleksinin genler üzerine olan etkisinde bağlantı veya aracı protein gibi görev alır (Perez-Martin 1999).

#### **2. 4. 2. Düzenleyici Negatif Elementler**

##### **2. 4. 2. 1. Yardımcı Faktörler**

*SPT4*, *SPT5* ve *SPT6* genleri, Ty insertion mutasyonlarının supresörleri olarak elde edilmişlerdir. Bununla beraber, bu genler ayrıca *swi* ve *snf* mutasyonlarını da supres

edebilirler. Genetik analizler bu üç genin aynı süreçlerde işbirliği yaptığını göstermektedir. Bu üç gende mutasyonlar benzer biçimde transkripsiyonu değiştirir. Bununla beraber *SPT4* bir miktar farklılık gösterir. Örneğin; *SPT4* geni gerekli bir gen değildir, halbuki *SPT5* yada *SPT6*'nın delesyonu letalite ile sonuçlanır (Perez-Martin 1999).

Son genetik ve biyokimyasal araştırmalar, bu genler ile kromatin ve transkripsiyon arasındaki bağlantıyı doğrulamaktadır. *SPT6*'nın kromatin yapısını düzenlemede histonlar ile direkt etkileştiği bulunmuştur. Bu etkileşim N-terminal uçta histon H3'ün globüler kısmı tarafından sağlanır. *SPT6* tek başına in vitro ATP'den bağımsız bir şekilde nükleozomun toplanmasını sağlayabilir (Yamaguchi ve ark. 2001).

#### 2. 4. 2. 2. Histon deasetilazlar

Histonların amino terminal uçlarında asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon ve ADP ribozilasyonu gibi özel protein modifikasyonları bulunabilir. Histon asetillenmesi nükleozomların DNA'dan çözünmesini, ayrılmasını, histonların deasetillenmesi ise nükleozomların tekrar DNA'ya bağlanmalarını sağlar (Perez-Martin 1999). Hiperasetillenmiş histonlar genelde transkripsiyonal olarak aktif genlerde, hipoasetillenmiş histonlarsa heterokromatin gibi transkripsiyonal olarak inaktif bölgelerde bulunurlar. Histonların asetillenmesi Histon Asetil Transferaz (HAT), deasetilenme ise Histon Deasetilazların (HDACs) enzimatik aktiviteleri ile sağlanmaktadır (Verdin ve ark. 2003).

Deasetilazlar, nükleozomdaki histon N-terminallerini deasetillerler (Grozinger ve Schreiber 2002). Genin promotor bölgesinde asetillenmemiş histon içeren bir nükleozomda TATA kutusuna ve transkripsiyon başlatma bölgesine genel transkripsiyon faktörleri bağlanamaz. Asetillenmemiş histonların N-terminal lizinleri pozitif yüklüdür ve DNA fosfatlarıyla güçlü şekilde etkileşirler. Bu sayede DNA ile nükleozomun yüzeysel etkileşimi artar. Bu güçlü etkileşim transkripsiyon faktörlerinin promotor bölgesine ulaşmasını engelleyebilir. Bu olayın tersi olarak, yoğun asetillenmiş histonlarla transkripsiyon faktörlerinin bağlanması çok daha kolay olur (Grozinger ve Schreiber 2002).

*Saccharomyces cerevisiae* promotorlarındaki transkripsiyonun baskılanması ile histon deasetilasyonu arasındaki bağlantı, histon deasetilazların saflaştırılmasıyla ortaya

konmuştur Mayalarda üç farklı histon deasetilaz kompleksi (HDAC) tanımlanmıştır. Bunlar;

Sınıf I HDAC: *S. cerevisiae*'da *RPD3*,

Sınıf II HDAC: *S. cerevisiae*'da *HDA1*,

Sınıf III HDAC: *S. cerevisiae*'da *SIR2* (telomerde sıkı kromatin yapısı oluşmasında görevli) ile benzerler (Grozinger ve Schreiber 2002, Verdin ve ark. 2003).

### **2. 4. 3. Düzenleyici Pozitif Faktörler**

#### **2. 4. 3. 1. Swi/Snf kompleksi**

Kromatinin yapısını değiştiren bazı faktörlerin transkripsiyonal düzenlemeye katıldığı bilinmektedir. Bunlardan Swi/Snf gurubu kromatin değiştiren kompleksler bazı promotorların aktivasyonları için gereklidir. Swi/Snf komplekslerinin bazı alt birimleri DNA ve RNA helikazlarıyla homoloji gösterirler ve bu faktörler ATP'nin hidrolizi sonucu ortaya çıkan enerjiyi nükleik asit-protein etkileşimini bozmak için kullanırlar. Transkripsiyonal olarak aktif kromatin bölgeleri inaktif bölgelere göre DNase'lara karşı daha duyarlıdır. Histon oktomerlerine sarılı DNA, enzimin parçalayıcı etkisinden kısmen korunur. Saf Swi/Snf kompleksi varlığında ise bu nükleozomal DNA, DNase I'e karşı daha duyarlı hale gelir. Bu da bize Swi/Snf kompleksinin, DNA'nın nükleozom yüzeyinden geçici olarak ayrılmasını kolaylaştırdığını gösterir (Wu ve Winston 1997).

*SNF* genleri, *Saccharomyces cerevisiae* tarafından sukroz yada rafinoz şekerlerinin katabolizması için gerekli bir enzim olan invertazı kodlayan “*SUC2*” geninin transkripsiyonu için de gereklidir (Perez-Martin 1999). *SUC2* geninin promotor bölgesinin nükleozom haritası analiz edildiğinde, *SUC2* geni baskılanmış durumdayken DNA nükleozomlarla sarılı durumdadır ve DNA'yı kesen enzimlerden etkilenmez (Wu ve Winston 1997, Bu ve Schmidt 1998). *SUC2* geni aktif hale geçtiğinde ise promotor bölgesinde meydana gelen açılma ile DNA'yı kesen enzimlere olan duyarlılık artar. *SNF* genleri delesyona uğratıldığında ise bu bölgelerde herhangi bir gevşeme, açılma görülmez. Bu bulgularda Swi/Snf kompleksinin nükleozomları DNA'dan açma işlevi olduğunu göstermektedir (Wu ve Winston 1997).

*SWI* genleri de *S.cerevisiae*'da mating type switching için gereklidir. *SWI* geninin *HO* endonükleaz geni transkripsiyonu için gerekliliği kanıtlanmıştır. Ancak daha sonraki

çalışmalar Swi/Snf kompleksinin *S. cerevisiae*'da birçok genin transkripsiyonal olarak düzenlenmesinde gerekli olduğunu göstermiştir (Vignali ve ark. 2000).

ATP-bağımlı kromatin değiştiren Swi/Snf komplekslerinin, nükleozomların yerlerini değiştirerek transkripsiyonu aktive etmeleri yanında son zamanlarda bazı genlerin transkripsiyonal baskılanmasında da gerekli olduğu saptanmıştır (Sudarsanam ve Winston 2000).

Swi/Snf kompleksinin biyokimyasal aktiviteleri; Nükleozom remodeling, nükleozom kayması ve oktomer transferidir.

*S. cerevisiae* Swi/Snf kompleksleriyle bağlı bulunan başka bir grup protein de RSC'dir (Remodeling the Structure of Chromatin). Bu proteinler DNA'ya oktomer eklemede görevlidirler (Sudarsanam ve Winston 2000). Bu RSC kompleksi 15 alt birimden oluşur ve Swi/Snf kompleksinden 10 kat daha fazla bulunur. Swi/Snf kompleksine çok benzer özellikleri vardır. RSC kompleksi bir DNA- bağımlı ATPase aktivitesine sahiptir ve nükleozom yapısını değiştirme kapasitesi vardır (Perez-Martin 1999).

Iswi proteinleri ATP-bağımlı kromatin düzenleyen komplekslerin ikinci gurubudur. *S.cerevisiae*'da iki ATPase, Isw1p ve Isw2p Iswi proteinlerinin üyeleri olarak tanımlanmışlardır. Diğer ATPase'lar gibi Isw1p ve Isw2p hücrelerde proteinler ile etkileşir ve onların aktivitelerini etkilerler (Mellor ve Morillon 2004).

#### **2. 4. 3. 2. SRB / Mediatörler**

İn vitro transkripsiyon deneyleri saflaştırılmış RNA Pol II enzimi ve GTF'lerin minimum bir seti kullanılarak yapılmıştır. Bununla beraber bu gibi in vitro deneylerde RNA Pol II'nin aktivatörlere yanıt vermediği bulunmuştur. Aktivatörlere yanıt veren transkripsiyon için ilave faktörlerin gerekli olduğu anlaşılmıştır.

İnsan ve *Drosophila* sistemlerinde TATA'ya bağlanan proteinlerle (TBP) etkileşen faktörlerin (TAFs) keşfi aktive edilmiş transkripsiyon için istenen bileşenleri araştırmaya yol açmıştır. Bu çalışmaların sonucu olarak *S. cerevisiae*'da Mediatörler tanımlanmıştır. Mediatörler in vitro transkripsiyon için gerekli ve Pol II ile etkileşen bir kompleks olarak tanımlanmıştır (Malik ve Roeder 2000).

Saflaştırılmış mediatör kompleksi RNA Pol II'de CTD'e bağlanır ve RNA Pol II ile beraber "RNA Pol II Holoenzim" olarak adlandırılan yapıyı oluşturur. Holoenzim

mediatörlerin yanında, GTF'ler ve kromatin modifiye eden ve yeniden düzenleyen kompleksleri de içerir (Rachez ve Freedman 2001).

Eukaryotlarda transkripsiyonal düzenleme, hedef genlerin promotor ve aktivatör bölgelerinde bir araya gelen multiprotein kompleksleriyle yapılır. Protein kodlayan genlerin çoğunda RNA Pol II ve onunla birleşen genel transkripsiyon faktörleri bazal transkripsiyon için yeterlidir. Bazal transkripsiyon mekanizmasının bileşenleri global olarak kullanılır. Bazal transkripsiyon faktörlerinden farklı olarak transkripsiyon faktörlerinin ikinci gurubu yani "transkripsiyonal aktivatörlerin" büyük bir grubu, tipik olarak enhancerda birleşir ve hücre tipine göre değişkenlik gösterirler. Bu faktörler enhancer'a bağlanınca hedef genlerin transkripsiyonu aktive olur (Malik ve Roeder 2000).

Transkripsiyonun başlangıcındaki bazal mekanizmanın karmaşıklığına rağmen, (40'tan fazla polipeptid görevlidir) RNA polimeraz II'nin özel hedef genlerde aktivatörlere yanıtı koaktivatör (mediatör) denen ilave faktörlere bağlıdır (Malik ve Roeder 2000). Mediatör kompleksleri, enhancer ve diğer kontrol elementlerinden bazal transkripsiyon faktörleri ve RNA Pol II'den oluşan transkripsiyon faktörleri kompleksine düzenleyici bilgileri aktarmada bir köprü vazifesi görür (Björklund ve Gustafsson 2005). Mediatörler DNA'ya bağlanan transkripsiyon faktörleri ile RNA polimeraz-II arasında bağlantıyı sağlayan proteinler olarak da tanımlanmaktadır (Kornberg 2005).

Genetik analizler *in vivo* transkripsiyonal düzenlemede iki grup proteinin etkileşimini göstermektedir. İlk olarak SRB (supressor of RNA polymerase B) proteinleri, Pol II'nin en büyük alt biriminin (CTD) C terminal bölgesinde kısmi delesyonlarının supresörleri için yapılan genetik taramalarda ortaya çıkarılmıştır. SRB ve Mediatör (MED) içeren holoenzimin önemi mayada gen işleyişinin genom çapında analizi ile gösterilmiştir. Örneğin alt birimlerin birinde (SRB4) bir mutasyonun tüm genomda transkripsiyonunun bitmesine yol açtığı belirlenmiştir. SRB, MED ve diğer proteinlerin Pol II ile birleşmesi geri dönüşümlüdür. Mediatör genetik olarak transkripsiyonun pozitif yada negatif modülatörü olarak da tanımlanabilir (Malik ve Roeder 2000).

Transkripsiyonal Aktivasyonda Mediatör: Gene özel aktivatör proteinler promotorlara, genel transkripsiyon faktörlerinin gereksinimi doğrultusunda girip, transkripsiyonu uyarabilirler. Bu süreçte mediatörün, bazal Pol II transkripsiyon

mekanizması ve düzenleyici proteinler arasında bir köprü görevi gördüğü düşünülmüştür. Ayrıca aktivatör ve özel mediatör alt birimleri arasında direkt etkileşimler olduğu da kanıtlanmıştır. *S. cerevisiae* Gal4p aktivatörü, direkt olarak mediatör alt birimleri Gal11p (Med15p) ve Med17p (Srb4p) ile etkileşir (Björklund ve Gustafsson 2005).

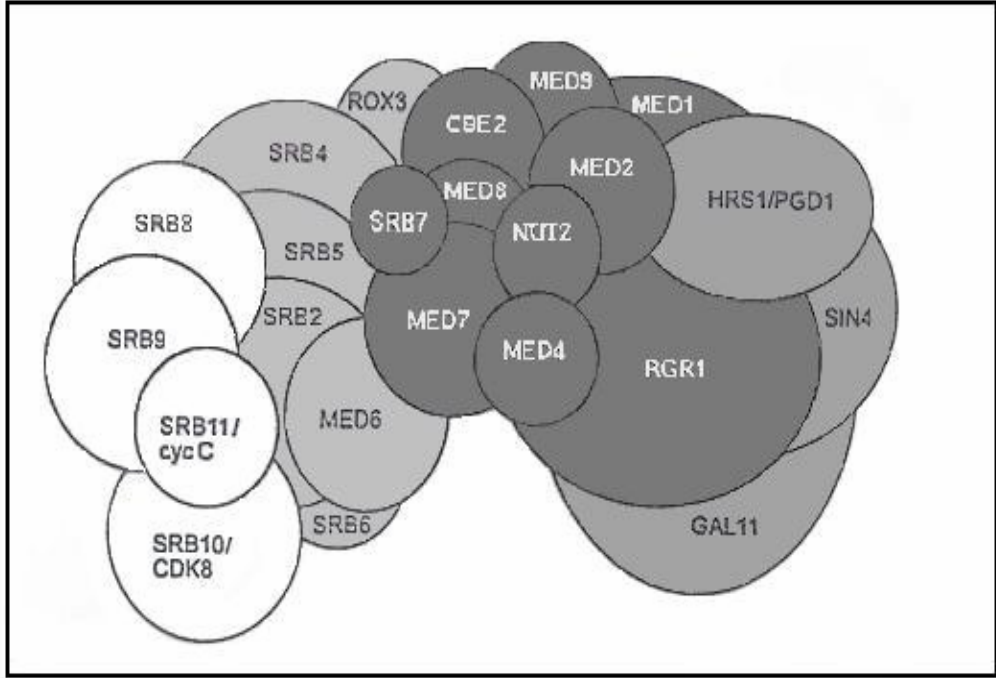
Transkripsiyonal Baskılamada Mediatör: Mediatör ayrıca gen transkripsiyonunun baskılanmasında da kullanılır. Tup1p-Ssn6p ko-represör kompleksi direkt olarak DNA'ya bağlanamaz ama diziye özel DNA'ya bağlanan proteinlerle birleşerek hedef promotörlere bağlanır. Tup1, represör fonksiyonu için Srb8-11 modülü ile direkt etkileşen Cdk8 (Srb10) alt birimini gerektirir. Srb10 mediatör alt biriminin transkripsiyonu negatif yönde etkilediği gösterilmiştir ve Srb10'un kinaz fonksiyonu Tup1 ile kontrol edilen genlerin tam baskılanması için gereklidir (Björklund ve Gustafsson 2005).

Maya *S. cerevisiae*'da mediatör olarak adlandırılan 20 alt birimlik bir kompleks tanımlanmıştır. Mediatör kompleksi gene özel aktivatörlerin RNA Pol II'ye bağlı aktivasyonu için gereklidir. Bağımsız olarak RNA Pol II'nin en büyük alt biriminin CTD delesyonu ile yapılan mutasyonun supresörünü bulmayı amaçlayan bir genetik taramada 4 ilave alt birim tanımlanmıştır (Srb8-11). Bu alt birimlerle beraber mediatör kompleksi 24 alt birimden oluşur.

Mediatörler hemen hemen tüm protein kodlayan genlerin transkripsiyonu için gereklidir. *S. cerevisiae* mediatörünün 4 farklı bölümde organize olduğu öne sürülmektedir. Mediatör modülü olarak adlandırılan bu bölümlerin özellikleri aşağıda özetlenmiştir (Şekil 2.3).

**a.) Cdk8 (Srb8-11) modülü:** Cdk8p (Srb10p), CycC (Srb11p), Med12p (Srb8p) ve Med13p (Srb9p) proteinlerinden oluşur.

Cdk8 modülünün bir protein kinaz aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur ve bu protein kinaz aktivitesi oldukça dayanıksızdır. Maya hücreleri diauxic büyümeye girdiklerinde mediatör kompleksinden ayrılabilirler. Bu modül transkripsiyon baskılanmasından sorumludur. Bu baskılama Pol II'nin en büyük alt biriminin tekrarlı C terminal bölgesinin fosforilasyonu ile olur. Aynı zamanda transkripsiyon aktivatörleri Ste12, Gcn4 ve Msn2'nin fosforilasyonu ile de baskılama olur. Bu duruma zıt olarak Cdk8 (Srb10) tarafından Gal4'ün fosforilasyonu, galaktoza yanıt olarak transkripsiyonun aktivasyonu için de gereklidir.



**Şekil 2.3.** Mayada mediatör kompleksinin modüler yapısı  
(Malik ve Roeder 2000)

**b.) Kuyruk (tail) yada Gal11(Med15) modülü:** Med2, Med3, Med14 (Rgr1), Med15 (Gal11) ve Med16 (Sin4) tarafından oluşturulur. Bu modül transkripsiyonal aktivatörler için temel hedefir.

**c.) Orta (middle) yada Med9-10 modülü:** Med1, Med4, Med7, Med9, Med10, Med21 (Srb7) ve Med5 (Nut1)'den oluşur.

**d.) Baş (head) modülü:** Med6, Med8, Med11, Med17 (Srb4), Med18 (Srb5), Med19 (Rox3), Med20 (Srb2) ve Med22 (Srb6)'dan oluşur. Bu baş ve orta modüller RNA Pol II ile direkt olarak etkileşirler (Şekil 2.3).

Mediatör komplekslerindeki protein-protein etkileşimlerini belirlemek amacıyla iki hibrit yöntemi (Two hybrid) kullanılmış ve farklı modüller arasındaki ve aynı modüller içindeki etkileşimler gösterilmiştir. Örneğin; orta modüldeki Med10 ile kuyruk modülündeki Med14 arasında bir etkileşim olduğu belirlenmiştir. Aynı modül içindeki etkileşimlere örnek olarak ise Med11 ve Med22 arasındaki etkileşim veya Med11 ve Med17 arasındaki etkileşim gösterilebilir. Bu mediatörler aynı modül yani baş modülü içindedir. Bu tür etkileşimlere daha birçok örnek verilebilir (Guglielmi ve ark. 2004).



### 2. 4. 3. 3. SAGA Kompleksi

Histon asetilasyonu, kromatin ve transkripsiyon arasındaki bağlantıda önemlidir. *In vivo* asetilasyon sadece histonların amino terminal uçlarında özel lizinlerde meydana gelir. Nükleozomların yapısal bütünlüğünü sürdürmede bu uçlar gerekli olmamasına rağmen, daha yüksek kromatin yapısında ve non-histon kromozomal proteinler ile etkileşimde görevlidirler. Histon uçlarının asetilasyonu, transkripsiyonu baskılayan daha yüksek sıralı nükleozom katlanmasını engeller (Perez-Martin 1999).

*S. cerevisiae* SAGA (Spt-Ada-Gcn5 Acetyl transferase) kompleksi *in vivo* transkripsiyonda önemli çok alt birimli bir ko-aktivatör kompleksidir. *S.cerevisiae*'da SAGA mutantlarının mRNA analizleri yapıldığında, bu mutantlarda genlerin ancak %15'nin transkripsiyonlarının yapıldığını göstermiştir. Hem *in vivo* hem *in vitro* araştırmalar transkripsiyonal aktivatörlerden sonra SAGA kompleksinin transkripsiyonu aktive ettiğini, bununla birlikte özel promotorlarda da transkripsiyonu baskıladığını göstermiştir. SAGA ko-aktivatörlerle birlikte transkripsiyonun normal seviyeleri için gereklidir (Wu ve Winston 2002).

SAGA kompleksinin alt birimleri fonksiyonel olarak gruplandırılabilir. Transkripsiyonal kontrolde görevli üç sınıf SAGA proteini vardır. Bunlardan birincisi histon asetiltransferaz (HAT) katalitik alt birimi içeren Gcn5p'tir. Gcn5p'in HAT aktivitesi Ada2p ve Ada3 proteinleri tarafından ayarlanmaktadır. İkinci sınıf SAGA proteinleri Spt3p ve Spt8p'dir. Bu proteinler özel promotorlarda TATA'ya bağlanan protein (TBP)-TATA etkileşimini kontrol ederler. Üçüncü sınıf SAGA proteini Tra1p'dir ve bu proteinde birkaç transkripsiyonal aktivatörle etkileşir (Wu ve Winston 2002).

### 2. 5. Mayada Heksoz Taşıyıcıların Moleküler Genetiği

Maya türlerinin çoğunun tercih ettiği karbon kaynakları glukoz, fruktoz ve mannoz gibi heksozlardır. Heksoz kullanımında zorunlu ve gerekli ilk aşama, hücre içine şeker moleküllerinin taşınmasıdır. Mayada heksoz taşınımı iki farklı mekanizma aracılığı ile yapılır. Bunlar ;

- 1- Taşıyıcı aracılığıyla kolaylaştırılmış difüzyon sistemi
- 2- Aktif proton-şeker simport sistemidir.

Kolaylaştırılmış difüzyon sistemi mayalar arasında daha yaygındır. Glukoz sadece bir besin olarak kullanılmaz aynı zamanda büyüme, metabolizma ve gelişmenin düzenlenmesi için en önemli faktördür (Boles ve Hollenberg 1997).

*S. cerevisiae*'da glukoz taşınımının kinetik olarak ayrı iki sistem tarafından yapıldığı belirlenmiştir. Bunlar "High Affinity" ve "Low Affinity" sistemlerdir. High affinity sistemin  $K_m=1-2mM$ 'dir. Buna karşın Low affinity sisteminde  $K_m=50-100mM$ 'dir (Reifenberger ve ark. 1997).

Son yıllarda yaban tip hücrelerde glukoz taşınımının affinitesinin glukozla bağlı ayarlanmasının birkaç faktörün etkisiyle olduğu belirlenmiştir. Bu faktörler, farklı taşıyıcı proteinler arasında olası etkileşimleri, özel taşıyıcıların affinitelerinin ayarlanması, bazı şartlarda taşıyıcı proteinlerin inaktivasyonu ve şekerlere oldukça farklı affinitelere sahip Hxt proteinlerinin işleyişinin düzenlenmesi gibi olaylarda görevlidirler. Bu düzenleyici mekanizmalar maya hücrelerinin sadece çevredeki heksozların konsantrasyonlarına uygun taşıyıcı sistemleri transkribe etmelerini garanti altına alır (Özcan ve Johnston 1995).

Genomu tamamlanan *S. cerevisiae* bilinen organizmalar arasında en fazla çeşitte heksoz taşıyıcıya sahip olanıdır. *S. cerevisiae*'da genom analizi sonucu 17 *HXT* geni (*HXT1-HXT17*) bir *GAL2* geni ve iki adet de glukoz algılaması için gerekli olan *SNF3* ve *RGT2* genleri belirlenmiştir. *HXT1-HXT17* genleri delesyona uğramış *S. cerevisiae* suşlarında ölçülebilir miktarda glukoz alımına rastlanmamıştır (Reifenberger ve ark. 1997). Fakat *HXT* null olarak adlandırılan bu suşun maltoz ve galaktozda kolaylıkla üreyebildiği de gösterilmiştir (Maier ve ark. 2002).

*S. cerevisiae*'da *HXT1-HXT4* ve *HXT6-HXT7*'nin fizyolojik olarak en önemli glukoz taşıyıcıları olduğu belirlenmiştir. *HXT8-HXT17* genleri çok düşük seviyede transkribe edilirler. *HXT8-HXT17* taşıyıcıları sadece fazla transkribe edildiklerinde heksozların hücre içine alınımını destekleyebilirler. *HXT5* ise daha farklı şartlarda transkribe edilir (Maier ve ark. 2002).

Herhangi bir *HXT* geninde mutasyonun glukoz alımına etkisi yoktur. Buna karşın *GAL2* veya *SNF3* genleri delesyona uğramış mutantlar sırasıyla galaktozda yada düşük konsantrasyon glukozda üreyemezler. Sadece *HXT1-HXT7* genleri delesyona uğramış hücreler glukoz, fruktoz yada mannozun herhangi bir konsantrasyonunda bir süre üreyemezler. Çoklu bir *hxt1-hxt7* mutant suşunda glukoz alınımı ölçülemeyecek kadar

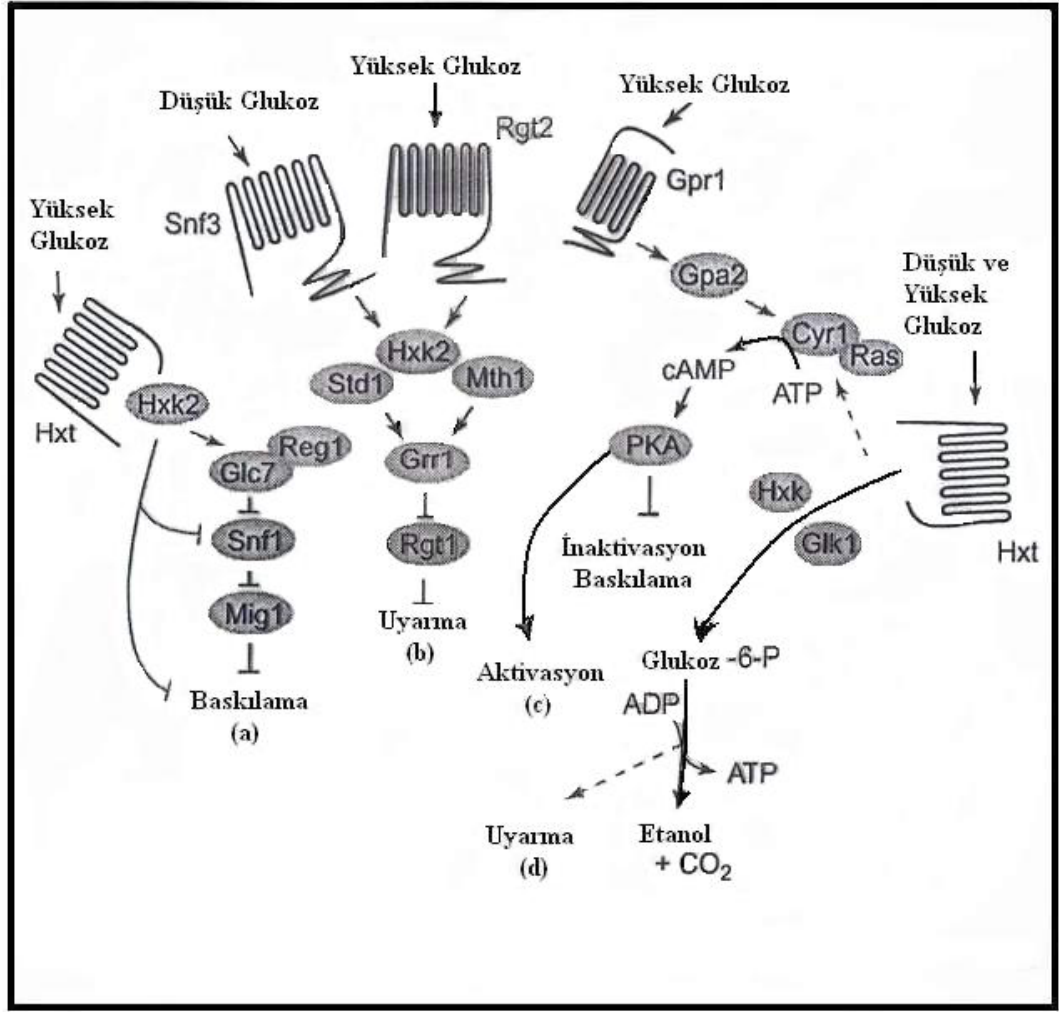
azdır. Bununla beraber *HXT1*, 2, 3, 4, 6 yada 7 genlerinin herhangi birinin işleyişi, farklı derecelerde olmasına rağmen önemli ölçüde glukoz kullanımı için yeterlidir (Reifenberger ve ark. 1997). Bu veriler, şimdiye kadar sınanmış koşullar altında 6 gen tarafından (*HXT1*, 2, 3, 4, 6 ve 7) kodlanan proteinlerin *S. cerevisiae*'da önemli işlevi olan glukoz taşıyıcıları oluşturduklarını göstermektedir (Boles ve Hollenberg 1997).

### 2. 5. 1. Maya heksoz taşıyıcı ailesinin özel üyeleri; Snf3p ve Rgt2p

Snf3p ve Rgt2p, diğer taşıyıcı proteinlerle sınırlı bir benzerlik gösterirler. Bununla beraber Snf3p ve Rgt2p heksoz taşıyıcı ailesi içindedirler. Başlangıçta *SNF3* geninin glukoz ve fruktozun düşük konsantrasyonlarının etkili katabolizması için gerekli bir high affinite glukoz taşıyıcısı kodladığı düşünülmüştür (Celenza ve ark. 1988). Bununla birlikte elde edilen son bulgular Snf3p'nin glukoz taşıyıcı değil, hücre dışındaki glukoz algılanmasında (sensing) önemli görevi olduğunu göstermiştir. Snf3p hücre zarında bulunur ve düşük glukoz konsantrasyonunun algılanmasında işlevi olduğu bulunmuştur (Özcan ve ark. 1998) (Şekil 2. 4).

Snf3 mutantları ilk kez rafinoz kullanamayan mutantların izole edilmesiyle tanımlanmıştır. Glukoz transportunun kinetik analizleri Snf3 mutantlarında high affinite glukoz alınımının eksik olduğunu fakat low affinite glukoz alınımının normal olduğunu göstermiştir (Özcan ve ark. 1998). High affinite taşımadaki eksiklik düşük konsantrasyon glukozda fermentatif olarak büyüememe ile sonuçlanır (Boles ve Hollenberg 1997).

Diğer bir gen *RGT2*, *SNF3* ile %73 benzerlik gösterir. Rgt2p de yüksek glukoz konsantrasyonunda fonksiyonel olan bir membran proteini olup, yüksek glukoz konsantrasyonunun algılanmasında gerekli olduğu gösterilmiştir. Düşük konsantrasyon glukozda Snf3p'nin uyarılması *HXT2*, 3, 4, 6 ve *HXT7* genlerinin ve ayrıca *SUC2* geninin transkripsiyonal olarak uyarılmasına aracılık eder (Özcan ve Johnston 1995).



**Şekil 2. 4.** *S. cerevisiae*'da glukoz algılanması ve glukoz sinyali iletimi (Rolland ve ark. 2001)

Plazma membranında algılanan glukoz sinyalleri Rgt1 proteinine aktarılır. Bu proteinin *HXT1*, 2 ve 4 promotorlarına direkt olarak bağlandığı gösterilmiştir (Özcan ve Johnston 1996). Rgt1p glukozun varlığına ya da yokluğuna bağlı olarak sırasıyla hem bir transkripsiyon aktivatörü hem de bir transkripsiyon represörü olarak davranabilir. Snf3p-Rgt2p sinyal yolları, protein-protein etkileşimlerine aracılık ettiği önerilen Grr1p'nin fonksiyonunu gerektirir. Rgt1p glukozun yokluğunda *HXT* promotorlarına Ssn6p-Tup1p represörünün katılımı ile transkripsiyonu baskılar (Boles ve Hollenberg 1997) (Şekil 2. 4).

### 2. 5. 2. Maya *HXT* Genlerinin Düzenlenmesi

*S. cerevisiae*'da glukoz önemli bir sinyal molekülüdür. Çoğu genlerin işleyişinde önemli bir etkiye sahiptir. Alternatif karbon kaynaklarının (galaktoz, maltoz, sukroz, gliserol ve etanol gibi) metabolizması için gerekli çoğu genin transkripsiyonu glukozda üreme sırasında baskılanır. Glukoz baskılaması için birçok gen ürünü gereklidir. Bunlardan bilinenler; *HXK2*, *REG1/HEX2*, *GAL82*, *GAL83*, *GRR1*, *TUP1*, *SSN6*, *CYC8* ve *MIG1*'dir. Glukozun baskılayabildiği genlerin derepresyonu için ise iki gen gereklidir. Bunlarda *SNF1* ve *SNF4*'dür (Özcan ve Johnston 1996). Glikolitik genler gibi bazı genlerin transkripsiyonu da glukoz sinyali ile aktive edilir. Glukoz kullanımı ile ilgili genlerin çoğunun işleyişi glukozda büyüme sırasında uyarılır. Glikolitik genlerden, *ENO2*, *PGK1*, *PYK1*, *PDC1* ve *ADHI*'ın transkripsiyonları glukoz ile yaklaşık 20-30 kat aktive edilebilir. Heksoz taşıyıcıları kodlayan *HXT* genlerinin bazılarının da transkripsiyonunun glukozla aktive edildiği de gösterilmiştir (Özcan ve Johnston 1996).

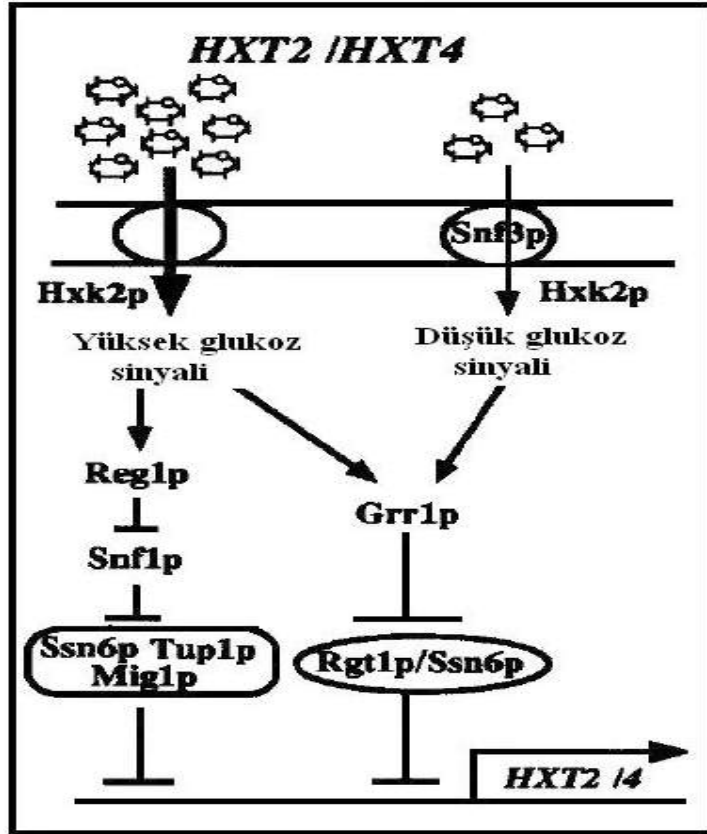
Bir çok genin transkripsiyonunun glukoz sinyaline göre baskılanmasında en önemli represör protein Mig1p'dir. Bu protein birçok glukoz duyarlı genin promotorlarındaki alanlara bağlanır ve Ssn6p ve Tup1p ile bir kompleks oluşturur. *SNF1* geni bir protein kinaz kodlar ve Snf4p ile birlikte Mig1p fonksiyonunu inhibe ettiği ortaya çıkarılmıştır (Jiang ve Carlson 1996).

*HXK2* geni Heksokinaz protein II'yi kodlar ve glukoz fosforlayan üç farklı enzimden biridir. Hxk2p'nin glukoz için bir hücre içi algılayıcı olduğu da önerilmiştir (Moreno ve Herrero 2002). *GRR1*'de mutasyonlar sadece glukoz baskılamasının kaybına neden olmaz. Aynı zamanda uzamış hücre morfolojisi, glukozda yavaşlamış üreme oranı, heksoz taşıyıcı genlerinin az miktarda transkripsiyonu, ozmotik stres ve azot açlığına artan duyarlılık gibi birkaç pleiotropik eksikliklere neden olur.

Bu ön çalışmalara ek olarak yapılan diğer araştırma sonuçları heksoz taşıyıcı genlerinin transkripsiyonunun düşük glukozla 10-300 kat uyarıldığını göstermiştir. *HXT* genleri glukoz konsantrasyonuna göre üç farklı şekilde kontrol edildiği belirlenmiştir.

1- Şeker konsantrasyonundan bağımsız glukozla uyarılma (*HXT3*)

2- Düşük seviyeli glukozla uyarılma ve yüksek seviyeli glukozla baskılanma (*HXT2* ve *HXT4*) (Şekil 2. 5).



Şekil 2. 5. HXT2 ve HXT4 genlerinin farklı glukoz konsantrasyonlarına göre düzenlenmesi (Özcan ve Johnston 1995).

3- Sadece yüksek konsantrasyon glukozla uyarılma (*HXT1*) (Özcan ve Johnston 1995).

Glukozun yokluğunda dört *HXT* geninin transkripsiyonundaki azalma bir baskılama mekanizması yüzündendir. Bu baskılama mekanizması için represör proteinler olan Rgt1p ve Mig1p-Ssn6p-Tup1p kompleksi gereklidir (Özcan ve Johnston 1995).

*GRR1*, *HXT* transkripsiyonunun pozitif bir düzenleyicisini kodlar, çünkü *grr1* mutantlarında dört *HXT* geninin glukozla uyarılması eksiktir. *RGTI*'deki mutasyonlar *grr1* mutasyonlarının neden olduğu *HXT* gen işleyişindeki eksiklikleri baskılar. Sonuç olarak, glukoz *Grr1p*'nin aktive edilmesiyle *HXT* gen işleyişini uyarır. *Grr1p*, *Rgt1p* represörünün fonksiyonunu inhibe eder. *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyonu yüksek glukoz konsantrasyonlarında baskılanır (Özcan ve Johnston 1996).

### 2. 5. 2. 1. *S. cerevisiae* HXT2 Geni ve Hxt2p'nin Özellikleri

*Saccharomyces cerevisiae*'nin high affinity glukoz taşıyıcı proteini Hxt2p'nin transkripsiyonu yüksek glukoz konsantrasyonlarında 15-20 kat baskılanmıştır. Ssn6-Δ9 yada hxk2-Δ1::URA3 mutasyonlarına sahip *S. cerevisiae*'da glukoz baskılaması görülmez. Hem %2 glukoz (repress seviye) hem de %0,05 glukozda (derepres seviye) HXT2 geninden yüksek seviyede transkripsiyon yapılır. Halbuki snf1-Δ10 mutasyonuna sahip *S. cerevisiae*'da sürekli represyon olur. Yüksek konsantrasyonda baskılamaya rağmen, glukoz yada fruktoz HXT2 transkripsiyonunun uyarılması içinde gereklidir.

Bir hxk2-Δ1 mutantında etanol yada galaktozda HXT2 transkripsiyonu belirlenemez. Ancak bir ssn6-Δ9 mutantında her iki karbon kaynağında HXT2 oldukça fazla transkribe edilir.

Genel bir transkripsiyonal represör olan Ssn6p'nin mutasyonu glukoz uyarılmasının yokluğunda HXT2 transkripsiyonuna yol açar. Bu sonuçlar Ssn6p'nin negatif bir düzenleyici olduğunu göstermektedir.

HXT2'nin fazla transkripsiyonu her zaman Hxt2p'ye bağlı high affinity transport ile sonuçlanmaz. Bu da Hxt2p aktivitesinin translasyon sonrası düzenlendiğini de göstermektedir (Wendell ve Bisson 1994).

*S. cerevisiae*'da Mig1p'nin de içinde olduğu DNA'ya bağlanan birçok transkripsiyonal represör tanımlanmıştır. Mig1p glukozla düzenlenen birkaç genin promotoruna bağlanır ve yüksek seviye glukoz varlığında onların transkripsiyonunu baskılar. Mig1p, Ssn6p ve Tup1p ile etkileşerek üçlü bir protein kompleksi oluşturur (Özcan ve Johnston 1996).

Ssn6p ve Tup1p doğrudan DNA'nın promotor bölgelerine bağlanamazlar. Bu iki ko-represör protein farklı promotorlarda DNA'ya bağlı farklı proteinler ile etkileşip, kompleks oluşturabilirler.

### 2. 5. 2. 2. HXT2 ve HXT4'ün İşleyişinin Düşük Seviyeli Glukozla Uyarılması

HXT2 ve HXT4'ün transkripsiyonu düşük seviyeli glukozla yaklaşık 10-20 kat uyarılır. Bu düzenleme iki ayrı kontrol mekanizması ile yapılır. Glukozun yokluğunda her iki genin işleyişi Rgt1p represörü tarafından baskılanır. RGT1 delesyonu, glukozun yokluğunda HXT2 ve HXT4'ün sürekli transkripsiyonuna neden olur. Ancak RGT1 delesyonunun yüksek glukoz konsantrasyonunda bu genlerin transkripsiyonuna etkisi

yoktur. Glukozun yüksek seviyelerdeki varlığında her iki gen Mig1p kompleksi tarafından baskılanır. Mig1p'nin delesyonu bu genlerin transkripsiyonunun yüksek glukoz konsantrasyonlarında uyarılabilir olmasına neden olur. Hem Rgt1p hem de Mig1p ile yapılan baskılama düşük glukoz konsantrasyonunda *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyonunun 10-20 kat aktive edilmesiyle sonuçlanır. İlginç olarak hem Rgt1p hem de Mig1p aracılığıyla baskılama Ssn6 fonksiyonunu gerektirir. Bundan dolayı *HXT2* ve *HXT4*'ün transkripsiyonları bir çeşit ssn6 mutantında karbon kaynağından bağımsız olarak kontrolsüz ve sürekli (Özcan ve Johnston 1996).

*HXT1-HXT4*'ün promotor bölgelerinin foksiyonel analizleri yapıldığında DDSE (DNA Sequence Dependent Suppressing Element) olarak bilinen yaygın bir transkripsiyonal düzenleyici bölge bulunduğu görülmüştür (Türkel ve Bisson 1999, Theodoris ve Bisson 2001).

Glikolizis basit olarak glukozun iki adet piruvata parçalanması olayıdır. Glikolizis monosakkaritlerin kullanımı için büyük bir metabolik yoldur. Glikolitik enzimler çok yüksek seviyelerde transkribe edilirler ve sitoplazmik çözünebilir proteinlerin yaklaşık %30-60'nı oluştururlar. Gcr1p'nin (glycolysis regulation-1) glikolitik genlerin düzenlenmesinde en önemli transkripsiyon faktörü olduğu görülmüştür (Baker 1991). Gcr1 mutanı maya hücreleri glukoz içeren ortamda üreyemezler. Glikolitik enzimlerin transkripsiyonları fermente edilemeyen ortamda üretilmiş hücrelerde veya  $\Delta gcr1$  mutanı maya hücrelerinde oldukça az miktarda yapılır. Gcr1p, glikolitik genlerin promotor bölgeleri ile özel olarak etkileşir ve 5'-CTTCC-3' (CT kutusu) dizisine bağlanır. *GCR1*'e ek olarak *GCR2*'nin de, glikolitik genlerin transkripsiyonları için gerekli olduğu gösterilmiştir (Uemura ve Fraenkel 1990).

*GCR1* mutantlarında glukoz transportunun da tam olarak yapılamadığı gösterilmiştir (Bisson ve ark. 1993). Bu nedenle  $\Delta gcr1$  ve  $\Delta gcr2$  mutanı *S. cerevisiae* suşlarında *HXT2* ve *HXT4* genlerinin transkripsiyonları Hxt2-lacZ ve Hxt4-lacZ gen füzyonları kullanılarak araştırılmıştır (Türkel ve Bisson 1999). Bu araştırmadan elde edilen sonuçlar *HXT2* ve *HXT4* genleri transkripsiyonlarının  $\Delta gcr1$  ve  $\Delta gcr2$  mutantlarında oldukça düşük seviyede yapıldığını göstermiştir. Ayrıca in vitro olarak Gcr1p'nin *HXT2* ve *HXT4* promotorlarına spesifik olarak bağlandığı da bulunmuştur (Türkel ve Bisson 1999). Bu sonuçlardan glukozun hücre içine alınımı için taşıyıcı protein kodlayan genler olan *HXT2* ve *HXT4* genlerinin glikolitik genlere paralel olarak



transkripsiyonlarının aynı transkripsiyon faktörlerince kontrol edildiği belirlenmiştir (Türkel ve Bisson 1999).

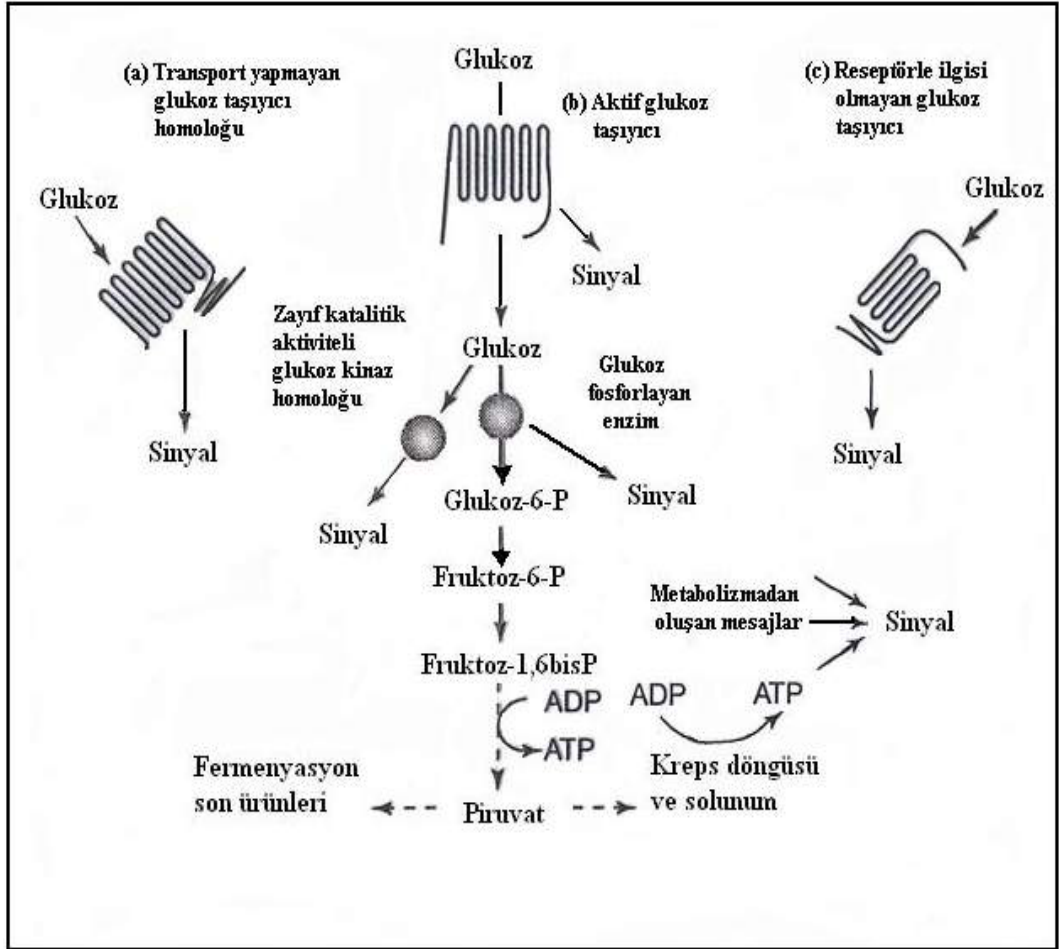
## 2. 6. Glukozun Algılanması (Glucose Sensing)

Glukoz eukaryotik hücreler için çok hızlı ve kolaylıkla kullanılabilen karbon ve enerji kaynağıdır. Glukozun üreme ortamındaki varlığı değişik metabolik yolları etkiler ve metabolik ara ürünlerde ve son ürünlerde sayısız metabolik değişikliğe yol açar. Glukozun etki ettiği metabolik yollar; Glikolizis, fermentasyon, TCA (trikarboksilik asit döngüsü), pentoz fosfat yolu ve solunumdur. Farklı eukaryotik hücreler glukozun varlığını algılamak için özel mekanizmalar geliştirmişlerdir.

Glukoz plazma membranında bulunan özel glukoz reseptörleri tarafından algılanmaktadır (Şekil 2.6). Hücre içi konsantrasyonuna göre glukoz girişini kontrol ederler (Rolland ve ark. 2001).

Maya hücreleri glukoz yada glukozla yakından ilişkili şekerleri tercih ederler. Çünkü bu şekerler hızlı şekilde etanole dönüştürülebilir. Ortamda etanolün birikimi etanole oldukça toleranslı maya hücrelerine seçici bir avantaj sağlar. Bu nedenle mayalar bu özel karbon kaynağının süratle taşınmasını, onun özel ve optimal kullanımını garantiye almak için mekanizmalar geliştirmişlerdir. Mayada glukoz varlığında solunum ve alternatif karbon kaynaklarının kullanımı ile ilgili genler baskılanırken, fermentasyon ve büyüme ile ilgili genler aktive edilir. Bu olaya “Glukoz Baskılaması” (Glucose Repression) denir (Gancedo 1998, Carlson 1999).

Eukaryotik hücrelerde glukoz varlığının algılanması için birçok sistem bulunur. Bunlar; Glukoz fosforlayan enzimler (Hekzokinaz1-2, Glukokinaz), Glukoz sensörler (Snf3p, Rgt2p), Glukoz reseptörleri (Gpr1p)'dir (Rolland ve ark. 2001) (Şekil 2.6).



**Şekil 2. 6:** *S. cerevisiae*'da glukoz sinyalinin algılanma mekanizmaları (Roland ve ark. 2001).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3. 1. Araştırmalarda Kullanılan *S. cerevisiae* Suşları ve Üreme Ortamı

Bu araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşlarının genotipleri çizelge 3.1’de verilmiştir. YST150 ve YST151 *nhp6A/B* mutasyonu hariç izogenik suşlardır. YST124, YST161-YST167 suşları da belirtilen mutasyonlar hariç izogenik suşlardır. YST150 ve YST151 Dr. N. Lehming’in (University of Singapour-Singapour), YST124, YST161-YST167 suşları ise Frankfurt Üniversitesi’nin *S. cerevisiae* koleksiyonundan sağlanmıştır.

**Çizelge 3. 1.** Araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşlarının genotipleri.

<i>Suş adı</i>	<b>Genotip (ilgili mutasyon)</b>
YST150	<i>MATa</i> ura3-52, leu2-3, his3 $\Delta$ 200, lys2-801, trp1 $\Delta$ 63, ade2::hisG (Yaban tip)
YST151	<i>MATa</i> ura3-52, leu2-3, his3 $\Delta$ 200, lys2-801, trp1 $\Delta$ 63, ade2::hisG $\Delta$ nhp6A, $\Delta$ nhp6B ( <i><math>\Delta</math>nhp6A/B</i> )
YST124	<i>MATa</i> his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0 (Yaban tip)
YST161	<i>MATa</i> his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YNL330c::kanMX4 ( <i><math>\Delta</math>rpd3</i> )
YST162	<i>MATa</i> his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YNL021w::kanMX4 ( <i><math>\Delta</math>hda1</i> )
YST163	<i>MATa</i> his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YPL042c::kanMX4 ( <i><math>\Delta</math>srb10</i> )
YST164	<i>MATa</i> his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YOR304w::kanMX4 ( <i><math>\Delta</math>iswi2</i> )
YST165	<i>MATa</i> his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YDL005c::kanMX4 ( <i><math>\Delta</math>med2</i> )
YST166	<i>MATa</i> his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YDL002c::kanMX4 ( <i><math>\Delta</math>nhp10</i> )
YST167	<i>MATa</i> his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YBR081c::kanMX4 ( <i><math>\Delta</math>spt7</i> )

*S. cerevisiae* suşları rutin çalışmalar için zengin besi yeri olan YP (1% yeast extract, 2% peptone) ortamında üretildi (Rose ve ark. 1990). Araştırmada kullanılan besi yerlerinin hazırlanması Ek-1’de verildi. Karbon kaynağı olarak da ilgili deneylerin sonuçlar bölümünde açıklandığı gibi glukoz baskılanması için (Repress şartlar) % 4 (w/v), glukoz baskılanmasının istenmediği üreme şartlarında ise (Derepress şartlar) %2 gliserol, %2 laktat ve %0.05 (w/v) glukoz eklendi. Araştırmalar boyunca *S. cerevisiae* hücreleri 30 °C’de, karıştırmalı etüvde (135 devir/dakika) üretildi.

### 3. 2. Kullanılan Plazmitlerin oğaltılması

Araştırmada kullanılan gen füzyonlarının bulunduğu plazmidler *E. coli*'de çoğaltıldı. Bunun için önce *E. coli* DH5 $\alpha$  hücreleri 10 ml LB (%1 Bacto- tripton, %0.5 yeast extract, %1 NaCl ) sıvı ortamda logaritmik faza kadar 37  $^{\circ}$ C'de üretildi. Bakteri hücreleri MgCl $_2$ , CaCl $_2$  yöntemi kullanılarak kompetant hale getirildi (Ausubel ve ark. 1987). Kompetant bakteriden 150  $\mu$ l alındı ve yaklaşık 0,1-0,5  $\mu$ g plazmid eklendi. Plazmidlerin *E. coli*'ye transformasyonu standart yöntemlerle yapıldı (Ausubel ve ark. 1987). Plazmid *E. coli* karışımı buz içinde 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda 42  $^{\circ}$ C'de 2 dakika ısı şokuna uğratıldı ve tekrar 2 dakika buzda bekletildi. Daha sonra bakteri plazmid karışımına 850  $\mu$ l LB ilave edildi ve 37  $^{\circ}$ C'de 1 saat bekletildi. Daha sonra transformant bakterilerin seçimi için 100  $\mu$ l'lik bakteri karışımı LB-Ampicillin petrilere ekildi ve petrilere 37  $^{\circ}$ C'de 1 gece bekletildi (Ausubel ve ark. 1987). LB-Ampicillin'de üreyip, koloni oluşturan transformantlardan tek koloni alınarak tekrar LB-ampicillinli petrilere ekim yapıldı. Plazmid izolasyonu için bu petrilere 10 ml LB-ampicillin ortamına ekim yapıldı ve karıştırmalı inkübatörde 37  $^{\circ}$ C 140 dönüş/dakika hızda üretildi. Bakterilerden plazmid izolasyonu Aco-Prep plazmid saflaştırma kiti kullanılarak üretici firma tarafından önerildiği şekilde yapıldı.

### 3. 3. Araştırmada Kullanılan Plazmidlerin Yapısı ve Transformasyonu

Kromatin faktörlerinin *HXT2* ve *HXT4* genleri transkripsiyonuna etkisini araştırmak için çalışmalarımızda Hxt2-lacZ ve Hxt4-lacZ gen füzyonları kullanıldı. Bu plazmidler daha önceki araştırmalar sırasında hazırlanmıştır (Kruckeberg ve Bisson 1990, Theodoris ve ark. 1994). Hxt-lacZ gen füzyonları *S. cerevisiae*'da çoğalma ve seleksiyon için 2 $\mu$ m replikasyon orijini ile *URA3* geni içeren (2 $\mu$ m-URA3) YEp vektörü üzerinde bulunmaktadır. *HXT2* gen füzyonunda *HXT2* geni promotor bölgesinin 0,9 kbp'lik bölümü bulunmaktadır. Bu kontrol bölgesinin *HXT2* geninin glukoza bağlı olarak (Repress ve derepress) düzenlenmesi için yeterli olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Kruckeberg ve Bisson 1990, Theodoris ve Ark. 1994).

Hxt4-lacZ gen füzyonunda da *HXT4* geninin UAS bölgesinin 1605 bp'lik kısmı bulunmaktadır (Kruckeberg ve Bisson 1990, Theodoris ve ark. 1994). Bu bölgenin de *HXT4* gen füzyonunun glukoza bağlı olarak transkripsiyonunun kontrolü için yeterli

olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Theodoris ve ark. 1994., Türkel ve Bisson 1999).

Kontrol plazmidi olarak kullanılan pFN-8Xn plazmidi de aynı türden bir plasmid olup His4-lacZ gen füzyonu içermektedir (Nagawa ve Fink 1985). *HIS4* geni transkripsiyonu glukoz baskılanmasıyla düzenlenmediğinden glukoz baskılanmasının genel bir olay olmadığını göstermek için kullanıldı. Ayrıca glukoz baskılamasıyla kontrol edildiğinden *SUC2* gen füzyonu da bazı deneylerde kontrol plazmidi olarak kullanıldı. Bu gen füzyonu daha önceki çalışmalarda sırasında hazırlanmış olup *SUC2* geni promotor bölgesi Cyc1-lacZ gen füzyonunun promotor bölgesi ile değiştirilmiştir (Türkel ve ark. 2003). Suc2-LacZ gen füzyonu *S. cerevisiae*'da çoğalma ve seleksiyon için 2µm replikasyon orijini ve *URA3* geni içeren (2µm-URA3) YEep vektörü üzerinde bulunmaktadır. Bu gen füzyonunda kullanılan *SUC2* geni promotor bölgesinin heterolog promotorlardan yapılan transkripsiyonunun glukozla bağılı olarak düzenlenmesi için yeterli olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Sarokin ve Carlson 1985).

Plazmidlerin *S. cerevisiae* hücrelerine transformasyonunda daha önce tanımlandığı şekilde lityum asetat polyetilen glikol yöntemi kullanıldı (Ito ve Ark. 1983). Transformasyon için önce *S. cerevisiae* suşları YPAD (%1 yeast ekstrakt, %2 pepton, 20 mg/litre Adenin sülfat, %2 glukoz) ortamında logaritmik aşamaya kadar üretildi (Rose ve ark. 1990). Daha sonra hücreler santrifüjde çöktürölüp steril saf su ile yıkandı ve 0.1M steril lityum asetat çözeltisi ile bir saat karıştırmalı etüvde bekletildi. Bu süre sonunda hücrelerin bir kısmı alınarak (500µl) üzerlerine 3-5 µg plasmid DNA'sı ve 1-2 µg denatüre edilmiş herring sperm DNA'sı ilave edilip 30 °C'de 30 dakika bekletildi. Daha sonra bu hücrelerin üzerine 1ml %50'lik steril polyetilen glikol (PEG-4000) ilave edilip 30 °C'de 1 saat bekletildi. Bekleme süresi sonunda *S. cerevisiae* hücreleri ısı şoku için 42 °C'de 5 dakika bekletildi. Bundan sonra hücreler mikrosantrifüjde 12500 rpm'de çöktürüldü ve 1 ml steril su ile yıkandı. Tekrar çöktürülen maya hücreleri 150 µl steril saf suda çözüldü ve bu hücre süspansiyonundan 75 µl urasil içermeyen sentetik tam minimal üreme ortamı (-Ura, SC + %2 glukoz) petrilere ekim yapıldı. Transformantlar yaklaşık 3-4 gün sonra seçilip yeni petrilere üretilerek β-galaktosidaz deneyi için daha önce tanımlandığı şekilde hazırlandı (Guarente 1983).

### 3. 4. $\beta$ -galaktozidaz Aktivitelerinin Ölçülmesi

Hxt2-lacZ, Hxt4-lacZ, Suc2-lacZ ve His4-lacZ gen füzyonlarıyla transforme edilmiş *S. cerevisiae* hücreleri önce 3'lü olarak %4 (w/v) glukoz içeren 10 ml'lik –Ura, SC üreme ortamında karıştırmalı etüvde durağan faza kadar üretildi (yaklaşık 20-24 saat). Daha sonra bu transformantlardan 100 $\mu$ L taze –Ura, SC + %4 glukoz üreme ortamına ekim yapılarak aynı şartlarda logaritmik faza kadar (yaklaşık 3-4 saat) ( $A_{600}$ : 1.0) üremeleri sağlandı. Bu 4 saat sonunda hücreler santrifüj ile çöktürüldü. Çöktürülen hücreler 10 ml steril saf su ile bir kez yıkanıp tekrar çöktürüldü ve elde edilen hücre çökeltisi 10 ml –Ura, SC ortamında çözüldü. Bu hücre çözeltisinden 4 ml alınıp *HXT* genlerinin derepresyonu için %2 gliserol/laktat ve %0,05 glukoz eklendi. Kontrol amaçlı olarak da aynı hücre çözeltisinden 4 ml daha alınıp %4 glukoz eklenerek *HXT2*, *HXT4* ve *SUC2* transformantı hücrelerin repress şartlarda üremeleri sağlandı (Türkel ve Bisson 1999). Büyüme periyodunun sonunda, maya transformantları çöktürüldü ve 1 mL distile su ile yıkandı. Bu hücreler mikrofüj tüplerinde çöktürüldükten sonra üzerlerindeki sıvı kısım atıldı ve hücre çökeltisinin üzerine 200 $\mu$ L Breaking Buffer eklendi. Hücreler bu şekilde -70 C<sup>0</sup>'de donmaya bırakıldı.  $\beta$ -Galaktozidaz aktiviteleri önceden tanımlandığı gibi üçlü olarak belirlendi (Guarente 1983).  $\beta$ -Galaktozidaz aktivitelerinin ölçülmesinde kullanılan çözeltilerin içerikleri ve hazırlanışları Ek-1'de verildi.

$\beta$ -Galaktozidaz ölçümleri için yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanmış hücre süspansiyonlarına permeabilizasyon için 20  $\mu$ l saf kloroform ve 20  $\mu$ l 0.1%'lik SDS ilave edilerek 10-15 saniye vortekslendi. Permeabilize edilen hücre süspansiyonlarından 20-40  $\mu$ l'lik bir karışım alınarak 1 ml'lik Z tampon çözeltisi içine kondu. Daha sonra bu deney çözeltisine 200  $\mu$ l ONPG eklenerek 30 °C'de açık sarı renk oluşuncaya kadar beklenerek geçen süre belirlendi. Bekleme süresi sonunda reaksiyon 500  $\mu$ l 1M sodyum karbonat ilave edilerek durduruldu. Reaksiyon tüpleri 3000 rpm'de santrifj edildi, hücreler çöktürüldü. Çözelti absorbansı 420 nm'de belirlendi. Deneylerde her suş için 3 transformant kullanıldı. Deneyler en az iki kez tekrarlandı.  $\beta$ -galaktozidaz aktiviteleri Miller Ünitesi olarak verildi (Guarente 1983).  $\beta$ -galaktozidaz aktivitelerinin hesaplanmasında kullanılan eşitlik Ek-2'de verildi Enzim deneyleri de üçlü olarak yapıldığından sonuçlar bölümünde verilen  $\beta$ -galaktozidaz aktiviteleri 18 farklı enzim aktivitesinin ortalamasını göstermektedir. Aynı *S. cerevisiae* suşunun transformantları

için yapılan  $\beta$ -galaktozidaz ölçümlerinde standart sapmanın beklendiği gibi %10'dan daha az olduğu bulundu.

### 3. 5. *HXT2* ve *HXT4*'de Derepresyon Hızının Zamana Bağlı Ölçümü

Nhp6A/B proteinlerinin *HXT2* ve *HXT4*'de derepresyon hızına etkilerini araştırmak için Hxt2-lacZ ve Hxt4-lacZ gen füzyonlarından yapılan transkripsiyon zaman aralıklı olarak ölçüldü. Bunun için önce Hxt2-lacZ ve Hxt4-lacZ transformantı hücreler 10'ar ml'lik -URA, SC %4 glukoz üreme ortamında ikişerli kültürler olarak durağan faza kadar üretildi. Bu stok hücreler kullanılarak başlangıç OD<sub>600</sub> değeri 0,2 olacak şekilde 50 ml'lik taze -URA, SC %4 glukoz ortamına ekim yapıldı ve hücreler logaritmik aşamaya kadar üretildi. Logaritmik fazda hücreler çöktürüldü ve 50 ml steril saf su ile yıkandı. Tekrar 4000 rpm'de çöktürüldü, sıvı kısım atılarak hücre çöktürmeleri 50 ml -URA, SC %2 Gliserol/Laktat ve %0,05 glukoz ortamında çözüldü. Bu şekilde hazırlanan hücreler karıştırılmalı etüve alınarak üremeye bırakıldı. (30 °C 140 dönüş/dakika) Bu hücrelerden 30 veya 60 dakika zaman aralıklarıyla Çizelge 4. 2.'de verildiği şekilde (toplam 6 adet) 5'er ml hücre örnekleri alınarak  $\beta$ -Galaktozidaz enzim aktivitelerinin ölçümleri için Bölüm 3.4'de açıklandığı şekilde hazırlandı. Deneyler 3'erli olarak yapıldı ve iki kez tekrarlandı. Standart sapmaların %10'un altında olduğu belirlendi.

## 4. SONUÇLAR

### 4. 1. Non-histon Protein 6A/B'nin *HXT2* ve *HXT4* Genlerinin Transkripsiyonlarına Etkileri

*HXT2* ve *HXT4* genlerinin transkripsiyonları glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak kontrol edilir. Üreme ortamında yüksek konsantrasyonlarda glukoz bulunması *HXT2* ve *HXT4* genlerinden transkripsiyon yapılmasını engellemektedir (Özcan ve Johnston 1995). *HXT2* ve *HXT4* genleri transkripsiyonlarının baskılanması da DNA'ya bağlanan transkripsiyon faktörleri, Rgt1p ve Mig1p, ve bunlarla etkileşen ko-represörler Ssn6-Tup1p faktörlerince sağlanır. Ssn6-Tup1 kompleksinin bazı promotorlarda Nhp6A/B ile etkileştiği bulunduğundan, Nhp6A/B'nin *HXT2* ve *HXT4* promotorlarına etkileri araştırıldı.

Bunun için Hxt2-lacZ ve Hxt4-lacZ gen füzyonları yaban tip maya suşuna ve izogenik  $\Delta nhp6A/B$  mutant maya suşuna transforme edildi. Transformantlar glukoz baskılamasının olduğu (repressed) ve baskılamamanın olmadığı (derepressed) üreme ortamlarında üretilerek *HXT2* ve *HXT4* gen füzyonlarından yapılan transkripsiyon ölçüldü.

*HXT2* transkripsiyonu maya hücreleri düşük glukozlu ortama aktarıldığında yaban tip (YST150) ve  $\Delta nhp6A/B$  mutant maya hücrelerinde (YST151) yaklaşık 4-5 kat derepress edildi. Bununla birlikte, *HXT2* transkripsiyonunun repress seviyeleri yaban tipte (YST150) ölçülen transkripsiyon aktivitesi 274 MÜ iken  $\Delta nhp6A/B$  mutant maya suşundan 46 MÜ'ye düştü. Yani mutant maya suşunda 6 katlık bir düşüş meydana geldi. Aynı şekilde  $\Delta nhp6A/B$  mutasyonuna sahip maya hücrelerinde *HXT2* transkripsiyonunun derepresyonunda 4-5 katlık bir düşüş gözlemlendi. Sonuç olarak  $\Delta nhp6A/B$  mutasyonuna sahip maya hücrelerinde *HXT2*'nin derepresyonu ve derepresyonu meydana gelmesine rağmen, yaban tipte karşılaştırıldığında hem repress hem de derepress seviyelerin çok daha düşük olduğu bulundu (Çizelge 4. 1).

*HXT4*'ün transkripsiyonu yaban tip maya transformantlarında ve düşük glukozlu ortamda yaklaşık 60 kat derepress oldu.  $\Delta nhp6A/B$  mutant maya hücrelerinde de *HXT4* geninin derepresyonu meydana geldi. Ancak mutantlarda derepresyon seviyeleri yaban tiptekinden 10 kat daha düşük oldu. Yaban tip ve  $\Delta nhp6A/B$  mutant maya suşu repress seviyeler açısından karşılaştırıldığında bir fark gözlenmedi (Çizelge 4. 1).



Kontrol gen füzyonu olarak kullanılan *HIS4* transkripsiyonu glukoz baskılaması ile düzenlenmez ve bu nedenle *HIS4* geninde transkripsiyon  $\Delta nhp6A/B$  mutasyonundan etkilenmez. Bu nedenle yaban tip ve  $\Delta nhp6A/B$  mutantlarında His4-lacZ gen füzyonunda glukoz baskılaması veya derepresyon görülmedi. Fakat His4-lacZ transkripsiyonunun  $\Delta nhp6A/B$  mutantında yaklaşık 2-kat arttığı belirlendi (Çizelge 4. 1). Suc2-lacZ transkripsiyonu Nhp6A/B'ye bağlı olarak kontrol edildiğinden mutant suşta önemli miktarda azalma görüldü (Türkel 2004).

**Çizelge 4. 1.** Nhp6A ve Nhp6B faktörlerinin *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyonuna etkileri.

Gen Füzyonları	$\beta$ -Galaktosidaz Aktiviteleri <sup>a</sup>			
	Yaban Tip(YST150)		$\Delta nhp6A/B$ Mutantı(YST151)	
	R <sup>b</sup>	DR	R	DR
Hxt2-lacZ	274	954	46	204
Hxt4-lacZ	19	1163	15	179
Suc2-lacZ	1	903	2	56
His4-lacZ	24	22	49	42

<sup>a</sup> $\beta$ -Galaktozidaz aktiviteleri Miller Ünitesi olarak verildi.

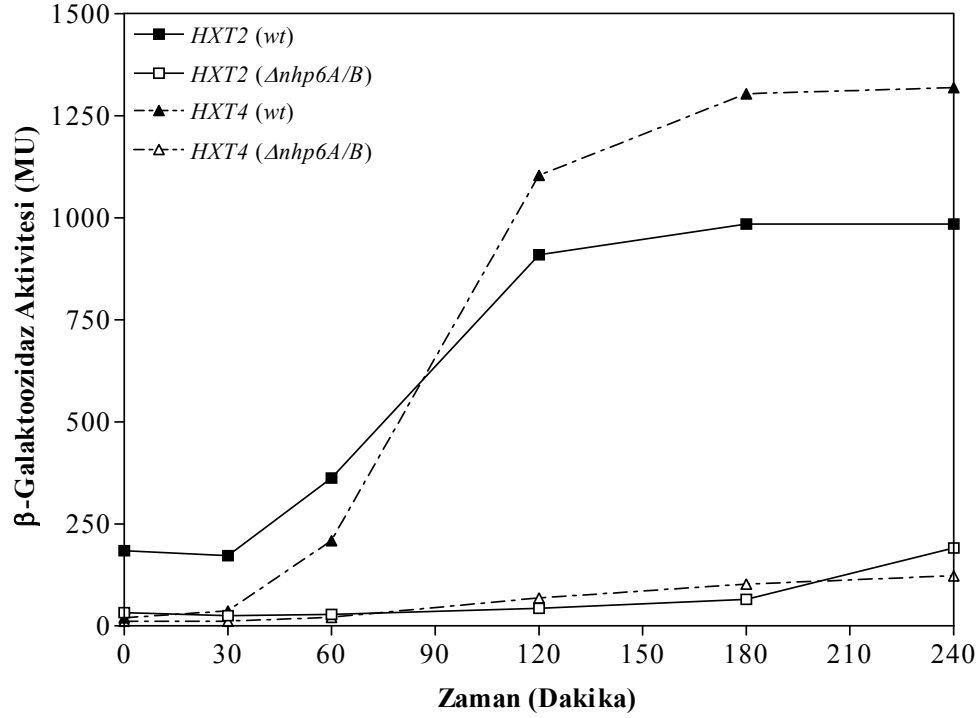
<sup>b</sup>R, Repres (4% glucose); Dr, derepres (%2 gliserol %2 laktat, 0.05% glukoz) üreme şartlarını göstermektedir.

#### 4. 2. *HXT2* ve *HXT4* Transkripsiyonlarının Zaman Aralıklı Ölçülmesi

$\Delta nhp6A/B$  çift mutantında derepresyon süreci sırasında *HXT2* ve *HXT4* genlerinin transkripsiyonunda herhangi bir artma-azalma olup olmadığını belirlemek için *HXT2* ve *HXT4* genlerinin yaban tipe (YST150) ve mutant suşta (YST151) zaman aralıklı derepresyon örnekleri alınarak analiz edildi. *HXT2* ve *HXT4*'ün transkripsiyonları yaban tip maya suşunda inkübasyon periyodunun 3. saatinin sonunda maksimum değerlerine ulaştı. Bununla birlikte yaban tipe zıt olarak,  $\Delta nhp6A/B$  mutantında *HXT2* ve *HXT4* genlerinin transkripsiyonlarının derepresyonları çok yavaş ve düşük seviyede meydana geldi. Sonuç olarak ne yaban tip ne de  $\Delta nhp6A/B$  mutantında *HXT2* ve *HXT4* genlerinin

derepresyonları sırasında herhangi bir düzensizlik gözlenmedi ve derepresyonlarının da çok yavaş olduğu bulundu (Çizelge 4. 2.).

**Çizelge 4. 2:** *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyonlarının zaman aralıklı ölçülmesi.



### 4. 3. Rpd3p'nin *HXT2* ve *HXT4* Transkripsiyonlarına Etkileri

Rpd3p ve Hda1p gibi histon deasetilazların farklı genleri ve ayrı fonksiyonel metabolik yolları (Hücre döngüsü, karbonhidrat metabolizması gibi) düzenlediği belirlenmiştir (Bernstein ve Schreiber 2002). Genel olarak histon deasetilasyonu ve maya promotorlarındaki transkripsiyonun baskılanması arasında bir bağlantı olduğu belirlenmiştir. *RPD3* geni birçok maya genini baskılamada gereklidir ve Rpd3p'nin fonksiyonu iki farklı proteine bağlıdır. Bunlardan biri Ume6p represör proteindir, diğeri de Sin3p'dir (Verdin ve Ark. 2003).

*HXT2* transkripsiyonunun repress seviyelerinin yaban tip (YST124) ve  $\Delta rpd3$  mutant maya suşunda (YST161) yaklaşık olarak aynı olduğu gözlemlendi. Derepress seviyelerinde ise yaban tiple karşılaştırıldığında  $\Delta rpd3$  mutant maya suşunda yaklaşık %20'lik bir düşüş

olduğu belirlendi. Bununla birlikte *HXT2* transkripsiyonu hem yaban tip (YST124) hem de  $\Delta rpd3$  mutant maya suşunda (YST161) yaklaşık 3-4 kat derepress oldu (Çizelge 4. 3).

*HXT4* transkripsiyonunun repress seviyeleri karşılaştırıldığında  $\Delta rpd3$  mutant suşunun repress seviyelerinin yaban tipten yaklaşık olarak 2 kat fazla olduğu, derepress seviyelerin ise bu iki suşta yaklaşık olarak aynı olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte *HXT4* transkripsiyonu yaban tipte (YST124) 11 kat derepress olurken,  $\Delta rpd3$  mutant maya suşunda (YST161) 6-7 kat derepress olduğu gözlemlendi (Çizelge 4. 3).

Suc2-lacZ kontrol gen füzyonu da beklendiği şekilde düşük glukozda derepress edilerek her iki suşta da transkripsiyonlarının yüzlerce kat arttığı bulundu (Çizelge 4. 3).

**Çizelge 4. 3.** HDAC'lerden Rpd3p'nin *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyonlarına etkileri

Gen Füzyonları	$\beta$ -Galaktozidaz Aktiviteleri <sup>a</sup>			
	Yaban Tip(YST124)		$\Delta rpd3$ Mutantı(YST161)	
	R <sup>a</sup>	DR	R	DR
<b>Hxt2-lacZ</b>	540	1902	519	1623
<b>Hxt4-lacZ</b>	245	2623	422	2707
<b>Suc2-lacZ</b>	3	840	4	1005

<sup>a</sup> $\beta$ -Galaktozidaz aktiviteleri Miller Ünitesi olarak verildi.

<sup>b</sup>R, Repres (4% glucose); Dr, derepres (%2 gliserol %2 laktat, 0.05% glukoz) üreme şartlarını göstermektedir.

#### 4. 4. Hda1p'nin *HXT2* ve *HXT4* Transkripsiyonlarına Etkileri

Tup1p-Ssn6p kompleksi *S. cerevisiae*'da genel bir transkripsiyonal ko-represördür. Tup1-Ssn6 kompleksi kendi kendisine DNA'ya bağlanamaz. Ancak diziye özel DNA'ya bağlanan proteinler ile etkileşerek hedef promotorlarda etkilerini gösterirler. Tup1p aracılığı ile baskılamada iki model öne sürülmüştür. Bunlardan birisi, Tup1p histon deasetilazların bağlanmasıyla transkripsiyonal olarak baskılanmış bir durum yaratır.

Hda1p in vitro olarak Tup1p'e bağlanır ve *HDA1* delesyonu Tup1p tarafından kontrol edilen birkaç gende histonların hiperasetilasyonu ile sonuçlanır (Green ve Johnson 2004).

*HXT2* transkripsiyonunun repress seviyeleri karşılaştırıldığında,  $\Delta hda1$  mutant maya suşunun (YST162) repress seviyelerinin yaban tipten (YST124) yaklaşık %20 fazla, derepress seviyelerinin de %25 daha düşük olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte *HXT2* transkripsiyonu yaban tipte yaklaşık 4 kat derepress olurken,  $\Delta hda1$  mutant maya suşunda yaklaşık 2 kat derepress oldu (Çizelge 4. 4).

*HXT4* transkripsiyonunun repress seviyeleri karşılaştırıldığında ise,  $\Delta hda1$  mutant maya suşunun repress seviyeleri yaban tipten yaklaşık olarak %50 daha düşük iken, derepress seviyelerin yaklaşık olarak aynı değerlerde olduğu belirlendi. Yaban tipte *HXT4* transkripsiyonunun 11 kat derepress olduğu gözlemlendi.  $\Delta hda1$  mutant maya suşunda ise *HXT4* transkripsiyonu 20 kat derepress oldu (Çizelge 4. 4).

Bu tez araştırmasında pozitif kontrol olarak kullandığımız *SUC2* gen füzyonunun transkripsiyonları da hem mutant hem yaban tip maya suşunda yüzlerce kat derepress olduğu gözlemlendi (Çizelge 4. 4).

**Çizelge 4. 4.** HDAC'lerden Hda1p'nin *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyonlarına etkileri

Gen Füzyonları	<b><math>\beta</math>-Galaktozidaz Aktiviteleri<sup>a</sup></b>			
	Yaban Tip(YST124)		$\Delta hda1$ Mutantı(YST162)	
	<b>R<sup>a</sup></b>	<b>DR</b>	<b>R</b>	<b>DR</b>
<b>Hxt2-lacZ</b>	540	1902	669	1508
<b>Hxt4-lacZ</b>	245	2623	141	2837
<b>Suc2-lacZ</b>	3	840	6	508

<sup>a</sup> $\beta$ -Galaktozidaz aktiviteleri Miller Ünitesi olarak verildi.

<sup>b</sup>R, Repres (4% glucose); Dr, derepres (%2 gliserol %2 laktat, 0.05% glukoz) üreme şartlarını göstermektedir.

#### 4. 5. Srb10 Mediatör Bileşeninin *HXT2* ve *HXT4* Transkripsiyonuna Etkileri

Transkripsiyon baskılanmasında *CDK8* (Srb10) geninin bir rolü olduğu belirlenmiştir. Mayada Srb10p ve Srb11p faktörleri transkripsiyonal baskılama ile ilgilidir. Bununla beraber Srb10p, Srb4p ile beraber *GAL4* için ayrıca bir aktivatör olarak da kullanılabilir (Guglielmi ve ark. 2004).

Tup1p-Ssn6p ko-represör kompleksi DNA'ya direkt olarak bağlanamaz, ancak diziye özel DNA'ya bağlanan proteinler ile birleşerek hedef promotorlarda etkilerini gösterebilir. İlginç olarak, Srb8p-Srb11p mediatör modülü Tup1p ile etkileşir. Srb10p transkripsiyonu negatif olarak etkiler ve onun kinaz fonksiyonu Tup1p'nin kontrol ettiği genlerin tam baskılanması için gereklidir (Green ve Johnson 2004).

Srb10p mutant maya suşundaki (YST163) *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyonu, yaban tip maya suşu (YST124) ile karşılaştırıldığında Srb10 mediatör bileşeninin *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyonuna önemli bir etkisinin olmadığı bulundu. Bununla birlikte *HXT2* transkripsiyonunun repress ve derepress seviyeleri karşılaştırıldığında,  $\Delta$ *srb10* mutant maya suşunun repress seviyelerinin %30-35, derepress seviyelerinin de yaklaşık %50 oranında yaban tipten daha düşük olduğu belirlendi. Yabani tipte *HXT2* transkripsiyonu 3-4 kat derepress olurken  $\Delta$ *srb10* mutant maya suşunda 2-3 kat derepressyon meydana geldi (Çizelge 4. 5).

*HXT4* transkripsiyonu  $\Delta$ *srb10* mutantında analiz edildiğinde,  $\Delta$ *srb10* mutant maya suşunun repress seviyelerinin yaban tipten yaklaşık %60 daha fazla iken, derepress seviyelerinin %40 daha düşük olduğu gözlemlendi. *HXT4* transkripsiyonu yaban tipte 11 kat derepress olurken,  $\Delta$ *srb10* mutant maya suşunda 2-3 kat derepress oldu (Çizelge 4. 5).

Suc2-lacZ füzyonu da yine her iki suşta da yüzlerce kat derepress oldu. Ancak Suc2-lacZ füzyonunun transkripsiyonunun  $\Delta$ *srb10* mutant maya suşunda yaban tipten 4 kat daha az olduğu bulundu (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4. 5.** Mediator bileşeni Srb10'un *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyonlarına etkileri

Gen Füzyonları	$\beta$ -Galaktozidaz Aktiviteleri <sup>a</sup>			
	Yaban Tip(YST124)		$\Delta$ <i>srb10</i> Mutantı(YST163)	
	R <sup>a</sup>	DR	R	DR
<b>Hxt2-lacZ</b>	540	1902	369	904
<b>Hxt4-lacZ</b>	245	2623	632	1613
<b>Suc2-lacZ</b>	3	840	1	184

<sup>a</sup> $\beta$ -Galaktozidaz aktiviteleri Miller Ünitesi olarak verildi.

<sup>b</sup>R, Repres (4% glucose); Dr, derepres (%2 gliserol %2 laktat, 0.05% glukoz) üreme şartlarını göstermektedir.

#### 4. 6. ATP-Bağımlı Kromatin Düzenleyen Isw2p'nin *HXT2* ve *HXT4* Transkripsiyonlarına Etkileri

Imitation Switch (*ISW*) kromatin düzenleyen faktörlerin, nükleozomun TATA kutusu üzerinde yerleşmesiyle ilişkisi olduğu belirlenmiştir. Hem Isw2p hem de Tup1p, *RNR3* gibi bazı genlerde (DNA hasarıyla uyarılabilen gen) nükleozomların TATA üzerinde yerleşmesinde gerekli olduğu belirlenmiştir. Her iki gende baskılayıcı kromatin yapısını sürdürmek için gereklidir (Zhang ve Reese 2004).

Bu tez araştırmasında  $\Delta$ *isw2* mutant maya suşu (YST164) ve yaban tip maya suşlarında (YST124) *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyon seviyeleri karşılaştırıldığında *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyonlarının  $\Delta$ *isw2* mutasyonundan etkilenmedikleri belirlendi. Fakat *HXT2* transkripsiyonunun repress ve derepress seviyeleri iki suşta da karşılaştırıldığında  $\Delta$ *isw2* mutant suşunun repress seviyeleri yaban tip maya suşundan %30 fazla, derepress seviyelerinin ise yaban tipten %15 daha düşük olduğu gözlemlendi. *HXT2* transkripsiyonu yaban tip maya suşunda (YST124) 3-4 kat derepress olurken,  $\Delta$ *isw2* mutant suşunda 4-5 kat derepress oldu (Çizelge 4. 6).

*HXT4* transkripsiyonu iki suşta karşılaştırıldığında,  $\Delta$ *isw2* mutant suşunun repress seviyeleri yaban tipten yaklaşık %50 daha düşükken, derepress seviyeleri yaklaşık olarak

aynı olduğu bulundu. *HXT4* transkripsiyonu yaban tipte 11 kat derepress olurken,  $\Delta isw2$  mutant suşunda 18 kat derepress oldu (Çizelge 4. 6).

*SUC2* genide her iki şuşta düşük glukozda beklendiği gibi yüzlerce kat derepress oldu (Çizelge 4. 6).

**Çizelge 4. 6.** ATP-bağımlı kromatin düzenleyen *Isw2* faktörünün *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyonlarına etkileri.

Gen Füzyonları	$\beta$ -Galaktozidaz Aktiviteleri <sup>a</sup>			
	Yaban Tip (YST124)		$\Delta isw2$ Mutantı (YST164)	
	R <sup>a</sup>	DR	R	DR
<b>Hxt2-lacZ</b>	540	1902	371	1677
<b>Hxt4-lacZ</b>	245	2623	135	2425
<b>Suc2-lacZ</b>	3	840	3	687

<sup>a</sup> $\beta$ -Galaktozidaz aktiviteleri Miller Ünitesi olarak verildi.

<sup>b</sup>R, Repres (4% glucose); Dr, derepress (%2 gliserol %2 laktat, 0.05% glukoz) üreme şartlarını göstermektedir.

#### 4. 7. Mediatör Kompleksi Bileşeni Med2p'nin *HXT2* ve *HXT4* Transkripsiyonlarına Etkileri

Yapılan araştırmalar mediatör kompleksini 4 ayrı modüle ayırmıştır. Bu modüllerden biride Gal11p (Med15p) yada Kuyruk (Tail) modülüdür. Med2p alt birimi bu modül içindedir. Bu modül transkripsiyonal aktivatörler için temel hedeftir (Guglielmi ve ark. 2004).  $\Delta med2$  mutasyonunun saflaştırılmış bir transkripsiyonal sistemde ve in vivo ortamda fonksiyonal karakterizasyonu bu mediatör bileşeninin özel aktivatörler tarafından transkripsiyonun uyarılmasında anahtar bir rol oynadığını gösterir (Myers ve Kornberg 2000). Med2p'nin Srb10p cyclin kinaz ile etkileşip, onun tarafından fosforlandığı da belirlenmiştir (Hallberg ve ark. 2004).

Bu araştırmada Med2p'nin *HXT2* ve *HXT4* genlerine etkileri araştırıldı. *HXT2* transkripsiyonunun repress seviyeleri  $\Delta med2$  mutant maya suşunda yaban tipten %45

daha az ve derepress seviyelerin de yine mutant suşta yaklaşık %70 daha az olduğu gözlemlendi. *HXT2* transkripsiyonu yaban tipinde 3-4 kat derepress olurken,  $\Delta med2$  mutant suşunda yaklaşık 2 kat derepress oldu (Çizelge 4. 7).

*HXT4* transkripsiyonunun repress seviyeleri  $\Delta med2$  mutant suşunda, yaban tipten yaklaşık 8 kat daha düşük, derepress seviyelerin de yine mutant suşta 12 kat daha düşük olduğu belirlendi (Çizelge 4. 7).

Suc2-lacZ gen füzyonunda her iki suşta düşük glukozda oldukça fazla şekilde derepress oldu. Med8p'nin daha önceki araştırmalarda *SUC2* için gerekli olduğu da gösterilmiştir (Moreno-Herrero ve ark. 1999) (Çizelge 4. 7).

**Çizelge 4. 7.** Med2 mediatör bileşeninin *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyonlarına etkileri

Gen Füzyonları	$\beta$ -Galaktozidaz Aktiviteleri <sup>a</sup>			
	Yaban Tip(YST124)		$\Delta med2$ Mutantı(YST165)	
	R <sup>a</sup>	DR	R	DR
<b>Hxt2-lacZ</b>	540	1902	294	658
<b>Hxt4-lacZ</b>	245	2623	32	217
<b>Suc2-lacZ</b>	3	840	7	240

<sup>a</sup> $\beta$ -Galaktozidaz aktiviteleri Miller Ünitesi olarak verildi.

<sup>b</sup>R, Repres (4% glucose); Dr, derepress (%2 gliserol %2 laktat, 0.05% glukoz) üreme şartlarını göstermektedir.

#### 4. 8. Kromatin Faktörü Nhp10p'nin *HXT2* ve *HXT4* Transkripsiyonlarına Etkileri

*NHP10* geni bir HMG kutusu proteini kodlar. *S. cerevisiae*'da SAGA kompleksinin, Gal4p'nin aktive ettiği transkripsiyon sırasında koaktivatör olarak görevi vardır (Larschan ve Winston 2005).

Bu tez araştırmasında Nhp10 mutant maya suşu (YST166) ve yaban tip suşu (YST124) karşılaştırıldığında, Nhp10'un *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyonlarına bir etkisinin olduğu bulundu. *HXT2* transkripsiyonunun repress seviyelerinin  $\Delta nhp10$  mutant



suşunda yaban tipten %45 daha az, derepress seviyelerinde yine mutant suşta %55-60 daha az olduğu gözlemlendi. *HXT2* transkripsiyonu yaban tipte 3-4 kat derepress olurken,  $\Delta nhp10$  mutant suşunda 2-3 kat derepress olduğu belirlendi (Çizelge 4. 8).

*HXT4* transkripsiyon seviyelerine kıyaslandığında,  $\Delta nhp10$  mutant suşunun repress seviyeleri yaban tipten yaklaşık olarak %50 daha düşük, derepress seviyelerinin de yaban tipten yaklaşık %30 daha düşük olduğu gözlemlendi. *HXT4* transkripsiyonu yaban tipte 11 kat derepress olurken,  $\Delta nhp10$  mutant suşunda yaklaşık 13 kat derepress oldu (Çizelge 4. 8).

Kontrol olarak kullanılan *Suc2-lacZ* gen füzyonunun da  $\Delta nhp10$  mutantında derepress olduğu bulundu. Fakat  $\Delta nhp10$  mutantında *SUC2* geni transkripsiyon seviyesinin yaban tipe oranla %50 daha düşük olduğu görüldü (Çizelge 4. 8).

**Çizelge 4. 8.** *Nhp10p*'nin *HXT2* ve *HXT4* genleri transkripsiyonlarına etkileri

Gen Füzyonları	$\beta$ -Galaktozidaz Aktiviteleri <sup>a</sup>			
	Yaban Tip(YST124)		$\Delta nhp10$ Mutantı(YST166)	
	R <sup>a</sup>	DR	R	DR
<b>Hxt2-lacZ</b>	540	1902	300	802
<b>Hxt4-lacZ</b>	245	2623	139	1863
<b>Suc2-lacZ</b>	3	840	1	448

<sup>a</sup> $\beta$ -Galaktozidaz aktiviteleri Miller Ünitesi olarak verildi.

<sup>b</sup>R, Repres (4% glucose); Dr, derepres (%2 gliserol %2 laktat, 0.05% glukoz) üreme şartlarını göstermektedir.

#### 4. 9. SAGA Kompleksi Bileşeni *Spt7p*'nin *HXT2* ve *HXT4* Genleri Transkripsiyonlarına Etkileri

SAGA kompleksi *S. cerevisiae*'da birçok genin normal transkripsiyonu için gereklidir. Bu kompleksin bütünlüğü üç çekirdek (core) altbirime bağlıdır. Bunlar, *Spt7p*, *Spt20p* ve *Ada1p* bileşenleridir. *Spt7p* diğer iki çekirdek altbirimin seviyelerini kontrol etmek için önemlidir. *Spt7p* içeren SAGA kompleksi *Spt20p* ve *Ada1p*'in her ikisinin

yokluğunda bile kısmen bir arada kalabilir. Spt7p seviyeleri in vivo SAGA miktarını da kontrol eder (Wu ve Winston 2002).

SAGA kompleksinin *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyonlarına etkileri araştırıldı. *SPT7* geninin özellikle *HXT4* transkripsiyonuna önemli bir etkisinin olduğu görüldü.

*HXT2* transkripsiyonunun repress seviyeleri  $\Delta spt7$  mutant maya suşunda %40 daha düşük, derepress seviyelerin de yine mutant suşta %50 daha düşük olduğu gözlemlendi. *HXT2* transkripsiyonu yaban tipte 3-4 kat derepress olurken,  $\Delta spt7$  mutant suşunda 2-3 kat derepress oldu (Çizelge 4. 9).

*HXT4* transkripsiyonunun repress ve derepress seviyeleri, suşlar arasında karşılaştırıldığında,  $\Delta spt7$  mutant suşunda repress seviyelerin 11 kat daha düşük, derepress seviyelerinde yaklaşık 22 kat daha düşük olduğu gözlemlendi. *HXT4* transkripsiyonu yaban tipte 11 kat derepress olurken,  $\Delta spt7$  mutant suşunda yaklaşık 5 kat derepress oldu (Çizelge 4. 9).

Pozitif kontrol olarak kullandığımız Suc2-lacZ gen füzyonu da her iki suşta yine önemli şekilde derepress oldu. SAGA kompleksinin *SUC2* genine etkisi daha önce gösterilmiştir. Önceki sonuçlara paralel olarak Suc2-lacZ geni füzyonu derepresyonu da *spt7* mutantında önemli oranda azalma gösterdi (Çizelge 4. 9).

**Çizelge 4. 9.** SAGA bileşeni Spt7p'nin *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyonlarına etkileri

Gen Füzyonları	<b><math>\beta</math>-Galaktozidaz Aktiviteleri<sup>a</sup></b>			
	<i>Yaban Tip(YST124)</i>		<i><math>\Delta spt7</math> Mutantı(YST167)</i>	
	<b>R<sup>a</sup></b>	<b>DR</b>	<b>R</b>	<b>DR</b>
<i>Hxt2-lacZ</i>	540	1902	324	983
<i>Hxt4-lacZ</i>	245	2623	22	118
<i>Suc2-lacZ</i>	3	840	5	154

<sup>a</sup> $\beta$ -Galaktozidaz aktiviteleri Miller Ünitesi olarak verildi.

<sup>b</sup>R, Repres (4% glucose); Dr, derepres (%2 gliserol %2 laktat, 0.05% glukoz) üreme şartlarını göstermektedir.

## 5. TARTIŞMA

Eukaryotik organizmalarda DNA'nın kromatin şeklinde bulunması, transkripsiyonun doğrudan yapılmasını engellemektedir. Kromatin oluşturup DNA'nın sıkı paketlenmesini sağlayan başlıca faktörler histon proteinlerinin oluşturduğu nükleozomlar ve non-histon proteinlerdir. Nükleozomların genlerin promotor bölgelerine transkripsiyon faktörlerince yerleştirilmesi birçok gende transkripsiyonun baskılanması ile sonuçlanır. Buna en iyi örnek *S. cerevisiae* *SUC2* geni transkripsiyonun nükleozomlar ve nükleozomlarla birlikte bulunan represör faktörlerce baskılanmasıdır (Wu ve Winston 1997, Bu ve Schmidt 1998).

Eukaryotlarda DNA'da kromatin oluşturan faktörlerin DNA'da çözünmesi veya çözülmüş durumda bulunan DNA'dan tekrar sıkı paketlenmiş yoğun kromatin bölgelerinin oluşturulması kromatin modifiye edici faktörlerce yapılır. Bu faktörler öncelikle hem genetik hem de biyokimyasal olarak *S. cerevisiae*'da oldukça iyi analiz edilmişlerdir (Perez-Martin 1999).

Bu araştırmada *S. cerevisiae*'da glukozun hücre içine taşınması için transport proteinleri kodlayan *HXT2* ve *HXT4* genlerinin transkripsiyonlarına kromatin yapısında değişikliklere neden olan faktörlerin etkileri araştırıldı. *HXT2* ve *HXT4* genlerinin transkripsiyonları Mig1p-Ssn6p-Tup1p kompleksi tarafından Rgt1p ile birlikte baskılanmaktadır (Özcan ve Johnston 1995). Tup1p'nin nükleozomlarla etkileştiği de daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir.

Histon deasetilazlar nükleozomların daha sıkı bir şekilde DNA'ya bağlanmasını sağlayan faktörlerdir (Verdin ve ark. 2003). Bu araştırmada iki farklı HDAC kompleksinin *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyonlarına etkileri araştırıldı ve HDAC komplekslerinin *HXT2* transkripsiyonunun baskılanması veya aktive edilmesine herhangi bir etkilerinin olmadığı gösterildi. Buna karşın *HXT4* geni bazal transkripsiyonunun *Δrpd3* mutantlarında yaklaşık iki kat artması bu genin transkripsiyonunun baskılanmasında nükleozomların da yer alabileceğini gösterdi. Nükleozomların yanında eukaryotlarda kromatin oluşturan diğer faktörlerde high mobility group sınıfında bulunan non-histon proteinlerdir. Bu proteinlerin farklı genlerde transkripsiyonu her iki yönde de değiştirebildiği yani bazı genlerde transkripsiyonun baskılanmasına bazı genlerde de transkripsiyonun aktivasyonuna katıldığı daha önce gösterilmiştir (Perez-Martin 1999). *S. cerevisiae*'da da HMG gurubu proteinleri Nhp6A ve Nhp6B bulunmaktadır. Bu

proteinler iki farklı genden kodlanmakla birlikte birbirine çok fazla homoloji gösterirler (Moreira ve Holmberg 2000). Nhp6A/B'ye ek olarak Nhp10'da *S. cerevisiae*'da bulunan diğer bir non-histon proteindir. Araştırmamızda non-histon proteinlerin *HXT2* ve *HXT4* genleri transkripsiyonuna etkileri de belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Nhp6A/B'nin hem *HXT2* hem de *HXT4* transkripsiyonu için mutlaka gerekli olduğunu göstermektedir. *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyonlarının  $\Delta nhp6A/B$  mutantında çok fazla azalması normal şartlarda bu proteinlerin *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyonlarının aktivasyonu için mutlaka gerekli olduklarını göstermektedir. Nhp6A/B transkripsiyon faktörü veya aktivatörü değildir. Bu durumda Nhp6A/B'nin *HXT2* ve *HXT4* promotorlarında açık kromatin bölgelerinin oluşumu için gerekli oldukları düşünülebilir. Nhp6A/B'nin bazı promotorlarda nükleozomların açılmasını sağlayan faktörlerle etkileştiği gösterilmiştir (Yu ve ark. 2000).

Bu araştırmada nükleozomların kromatinden çözünmesini sağlayan SAGA kompleksinin *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyonuna etkileri de incelendi. SAGA mutanı *S. cerevisiae* suşunda *HXT2* ve *HXT4* genlerinin transkripsiyonlarında önemli azalmalar olduğu bulundu. SAGA mutanı ( $\Delta spt7$ ) *S. cerevisiae* hücrelerinde *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyonlarının önemli miktarda azalmış olması, *HXT2* ve *HXT4* genlerinde de transkripsiyonun baskılanmasında nükleozomların yer alabileceğini göstermektedir. Fakat bunun kesinlikle doğrulanabilmesi için *HXT2* ve *HXT4* genlerinde in-vivo foot print yapılarak bu genlerin promotorlarında nükleozomların varlığının gösterilmesi gerekmektedir. Yakın zamanda yayımlanan bir araştırmada SAGA kompleksinin *HXT4* promotorlarında Mot1p ve Taf1p ile etkileştiği gösterilmiştir (van Oevelen ve ark. 2005). Yapılan bu araştırmada SAGA kompleksinin *HXT2* transkripsiyonuna etkisi olmadığı öne sürülmüştür. Fakat bu tez araştırmasında elde edilen sonuçlara göre *HXT2* geni transkripsiyonunun  $\Delta spt7$  mutant suşunda yaklaşık %50 daha az seviyede yapıldığı görülmektedir. Bu sonuçlara göre SAGA kompleksinin *HXT2* transkripsiyonunun aktivasyonu için gerekli olduğu öne sürülebilir.

*HXT2* ve *HXT4* genlerinin transkripsiyonları Gcr1p-Gcr2p kompleksleri ve Rgt1p ile aktive edilir (Türkel ve Bisson 1999, Özcan ve Johnston 1996). Araştırmamızda aktivatör proteinlerin RNA polimeraz ile etkileşimini sağlayan mediatör kompleksinin de *HXT2* ve *HXT4* transkripsiyonu için gerekli olduğu bulundu. Özellikle *HXT4* geninden hem bazal hem de aktive edilmiş transkripsiyon için Med2p'nin gerekli olduğu bulundu.

Med2p'nin *HXT2* geninde de transkripsiyon aktivasyonu için kısmen gerekli olabileceği gösterildi.

*S. cerevisiae*'da *HXT2* ve *HXT4* genlerinin transkripsiyonuna kromatin faktörlerinin etkilerinin araştırıldığı bu tez araştırmasında bazı kromatin faktörlerinin ve mediatör komplekslerinin bu genlerden yapılan transkripsiyonun kontrolü için gerekli oldukları bulundu.

## 6. KAYNAKLAR

ARCHAMBAULT, J., J. D. FRIESEN. 1993. Genetics of eukaryotic RNA polymerases I, II and III. *Micro. Rev.* 57: 703-724.

AUSUBEL, F. M., R. BRENT, R. E. KINGSTON, D. D. MOORE, J. G. SEIDMAN, J. A. SMITH, K. STRUHL. 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*. Green Publishing Assoc. and Wiley-Interscience. New York. ABD. s 1.6.1-1.6.6.

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.

BERNSTEIN, B. E., S. L. SCHREIBER. 2002. Global approaches to chromatin. *Chem. Biol.* 9: 1167-1173.

BISSON, L. F., D. M. COONS, A. L. KRUCKEBERG, D. A. LEWIS. 1993. Yeast sugar transporters. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28: 259-308.

BJORKLUND, S., C. M. GUSTAFSSON. 2005. The yeast mediator complex and its regulation. *Trends Biochem. Sci.* 30: 240-244.

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

BU, Y., M. C. SCHMIDT. 1998. Identification of cis-acting elements in the SUC2 promoter of *Saccharomyces cerevisiae* required for activation of transcription. *Nucleic Acids Res.* 26: 1002-1009

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

CELENZA, J. L., L. MARSHALL-CARLSON, M. CARLSON. 1988. The yeast SNF3 gene encodes a glucose transporter homologous to the mammalian protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 2130-2134.

CHEN, H., R. VINNAKOTA, S. J. FLINT. 1994. Intragenic activating and repressing elements control transcription from the adenovirus Iva-2 initiator. *Mol. Cell. Biol.* 14: 676-685.

CONAWAY, R. C., J. W. CONAWAY. 1993. General initiation factors for RNA polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 161-190.

DeVIT, M. J., J. A. WADDLE, M. JOHNSTON. 1997. Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol. Biol. Cell.* 8: 1603-1618.

DeVIT, M. J., 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.

EDMONDSON, D. G., M. M. SMITH, S. Y. ROTH. 1996. Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes Dev.* 10: 1247-1259.

ELGIN, S. C. R. 1988. The formation and function of DNase I hypersensitive sites in the process of gene activation. *J. Biol. Chem.* 263: 19259-19262.

FLORES, O., H. LU, M. KILLEEN, J. GREENBLATT, Z. F. BURTON, D. REINBERG. 1991. The small subunit of transcription factor IIF recruits RNA polymerase II into the preinitiation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 9999-10003.

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

GHOSH, S., D. BALTIMORE. 1990. Activation in vitro of NF-Kb by phosphorylation of its inhibitor Ikb. *Nature.* 344: 678-682.

GILEADI, O., W. J. FEAVER, R. D. KORNBERG. 1992. Cloning of a subunit of yeast RNA polymerase II transcription factor b and CTD kinase. *Science.* 257: 1389-1392.

GREEN, S. R., A. D. JOHNSON. 2004. Promoter-dependent roles for the Srb10 Cyclin-dependent kinase and the Hda1 deacetylase in Tup1-mediated repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 15: 4191-4202.

GROZINGER, C. M., S. L. SCHREIBER. 2002. Deacetylase enzymes: Biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem. Biol.* 9: 3-16.

GUARENTE, L. 1983. Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol.* 101. 181-191.

GUARENTE, L. 1984. Yeast promoters: positive and negative elements. *Cell.* 36: 799-800.

GUARENTE, L., O. BERMINGHAM-McDONOGH. 1992. Conservation and evolution of transcriptional mechanisms in eukaryotes. *Trends Genet.* 8: 27-31.

GUGLIELMI, B., N. L. van BERKUM., B. KLAPHOLZ., T. BIJMA., M. BOUBE., C. BOSCHIERO., H.-M. BOURBON., F. C. P. HOLSTEGE., M. WERNER. 2004. A high resolution protein interaction map of the yeast Mediator complex. *Nucleic Acids Res.* 32: 5379-5391.

HALLBERG, M., G. V. POLOZKOV., G-Z. HU, J. BEVE, C. M. GUSTAFSSON, H. RONNE, S. BJÖRKLUND. 2004. Site-specific srb10-dependent phosphorylation of the yeast mediator subunit med2 regulates gene expression from the 2- $\mu$ m plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 3370-3375.

HEINTZ, N. 1991. Transcription regulation. *Trends Biochem. Sci.* 16: 302.

HERSCHBACH, B. M., A. D. JOHNSON. 1993. Transcriptional repression in eukaryotes. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9: 479-509.

HORN, P. J., C. L. PETERSON. 2002. Chromatin higher order folding: Wrapping up transcription. *Science.* 297: 1824-1827.

HURT, M. M., T. L. BOWMAN, W. F. MARZLUFF. 1991. A common transcriptional activator is located in the coding region of two replication-dependent Mouse histone genes. *Mol. Cell. Biol.* 11: 2929-2936.

ITO, H., Y. FUKUDA, K. MURATA, A. KIMURA. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153: 163-168.

JIANG, R., M. CARLSON. 1996. Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev.* 10: 3105-3115.

KADONAGA, J. T. 2004. Regulation of RNA Polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell.* 116: 247-257.

KILLEEN, M. T., J. F. GREENBLATT. 1992. The general transcription factor RAP30 binds to RNA polymerase II and prevents it from binding nonspecifically to DNA. *Mol. Cell. Biol.* 12: 30-37.

KORNBERG, R. D. 2005. Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem. Sci.* 30: 235-239.



- KRUCKEBERG, A. L., L. F. BISSON. 1990. The *HXT2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is required for high-affinity glucose transport. *Mol. Cell. Biol.* 10: 5903-5913.
- LARSCHAN, E., F. WINSTON. 2005. The *Saccharomyces cerevisiae* Srb8-Srb11 complex functions with the SAGA complex during Gal4-activated transcription. *Mol. Cell. Biol.* 25: 114-123.
- LEWIN, B. 2004. *Genes VIII*. Pearson Prentice Hall, New Jersey, ABD. s.657-695.
- MAIER, A., B. VOLKER, E. BOLES, G. F. FUHRMANN. 2002. Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. *FEMS Yeast Res.* 2: 539-550.
- MALIK, S., R. G. ROEDER. 2000. Transcriptional regulation through mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends Biochem. Sci.* 25: 277-283.
- MELLOR, J., A. MORILLON. 2004. ISWI complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1677: 100-112.
- MOREIRA, J. M. A., S. HOLMBERG. 2000. Chromatin-mediated transcriptional regulation by the yeast architectural factors NHP6A and NHP6B. *EMBO J.* 19: 6804-6813.
- MORENO-HERRERO, F., P. HERRERO, J. COLCHERO, A. M. BARO, F. MORENO. 1999. Analysis by atomic force microscopy of med8 binding to cis-acting regulatory elements of *SUC2* and *HXK2* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 459: 427-432.
- MORENO, F., P. HERRERO. 2002. The hexokinase 2-dependent glucose signal transduction pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 83-90.
- MOSLEY, A. L., J. LAKSHMANAN, B. K. ARYAL, S. ÖZCAN. 2003. Glucose-mediated phosphorylation converts the transcription factor Rgt1 from a repressor to an activator. *J. Biol. Chem.* 278: 10322-10327.
- MYERS, L. C., R. D. KORNBERG. 2000. Mediator of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 729-749.
- NAGAWA, F., G. R. FINK. 1985. The relationship between the "TATA" sequence and transcription initiation sites at the *HIS4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 82: 8557-8561.

- NASMYTH, K., D. SHORE. 1987. Transcriptional regulation in the yeast life cycle. *Science*. 237: 1162-1170.
- ÖZCAN, S., M. JOHNSTON. 1995. Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (*HXT*) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.* 15: 1564-1572.
- ÖZCAN, S., M. JOHNSTON. 1996. Two different repressors collaborate to restrict expression of the yeast glucose transporter genes *HXT2* and *HXT4* to low levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.* 16: 5536-5545.
- ÖZCAN, S., J. DOVER, M. JOHNSTON. 1998. Glucose sensing and signaling by two receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17: 2566-2573.
- PAYNE, J. M., P. J. LAYBOURN, M. E. DAHMUS. 1989. The transition of RNA polymerase II from initiation to elongation is associated with phosphorylation of carboxyl-terminal domain of subunit IIa. *J. Biol. Chem.* 264: 19621-19629.
- PARK, H.-O., E. A. CRAIG, E. A. 1989. Positive and negative regulation of basal expression of a yeast *HSP70* gene. *Mol. Cell. Biol.* 9: 2025-2033.
- PEREZ-MARTIN, J. 1999. Chromatin and transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 503-523.
- POLISH, J. A., J. H. KIM, M. JOHNSTON. 2005. How the Rgt1 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* is repleted by glucose. *Genetics*. 169: 583-594.
- RACHEZ, C., L. P. FREEDMAN. 2001. Mediator complexes and transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 274-280.
- REIFENBERGER, E., E. BOLES, M. CIRIACY. 1997. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur. J. Biochem.* 245: 324-333.
- ROLLAND, F., J. WINDERICKX, J. M. THEVELEIN. 2001. Glucose sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.* 26: 310-317.
- ROSE, M. D., F. WINSTON, P. HIETER. 1990. Methods in yeast genetics. A laboratory course manual. CSH Laboratory Press. New York. ABD. s. 177-187.

SAROKIN, L., M. CARLSON. 1985. Upstream region of *SUC2* gene confers regulated expression to a heterologous gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 5: 2521-2526.

SAWADOGO, M., A. SENTENAC. 1990. RNA polymeraseB (II) and general transcription factors. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 711-754.

SINCLAIR, D. A., G. D. KORNFELD, I. W. DAWES. 1994. Yeast intragenic transcriptional control: Activation and repression sites within the coding region of the *Saccharomyces cerevisiae LPD1* gene. *Mol. Cell. Biol.* 14: 214-225.

SOPTA, M., Z. F. BURTON, J. GREENBLATT. 1989. Structure and associated DNA-helicase activity of a general transcription initiation factor that binds to RNA polymerase II. *Nature.* 341: 410-414.

STRUHL, K. 1989. Molecular mechanisms of transcriptional regulation in yeast. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 1051-1077.

SUDARSANAM, P., F. WINSTON. 2000. The SWI/SNF family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet.* 16: 345-351.

THEODORIS, G., N. M. FONG, D. M. COONS, L. F. BISSON. 1994. High-copy suppression of glucose transport defects by *HXT4* and regulatory elements in the promoters of *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 137: 957-966.

THEODORIS, G., L. F. BISSON. 2001. DDSE: downstream target of the SNF3 signal transduction pathway. *FEMS Microbiol. Lett.* 197: 73-77.

THIEL, G., M. LIETZ, M. HOHL. 2004. How mammalian transcriptional repressors work. *Eur. J. Biochem.* 271: 2855-2862.

TIMMERS, H. Th. M., L. TORA. 2005. SAGA unveiled. *Trends Biochem. Sci.* 30: 7-10.

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

TÜRKEKEL, S., T. TURGUT, M. C. LOPEZ, H. UEMURA, H. V. BAKER. 2003. Mutations in *GCR1* affect *SUC2* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genomics.* 268: 825-831

- TÜRKEL, S. 2004. Non-histone proteins Nhp6A and Nhp6B are required for the regulated expression of *SUC2* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bioscience Bioeng.* 98: 9-13.
- UEMURA, H., D. G. FRAENKEL. 1990. *gcr2*, a new mutation affecting glycolytic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10: 6389-6396.
- Van OEVELEN, C. J. C., H. A. A. M. van TEEFFELEN, H. T. M. TIMMERS. 2005. Differential requirement of SAGA subunits for Mot1p and Taf1p recruitment in gene activation. *Mol. Cell. Biol.* 25: 4863-4872.
- VERDIN, E., F. DEQUIEDT, H. G. KASLER. 2003. Class II histone deacetylases: Versatile regulators. *Trends Genet.* 19: 286-293.
- VIGNALI, M., A. H. HASSAN, K. E. NEELY, J. L. WORKMAN. 2000. ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol. Cell. Biol.* 20: 1899-1910.
- YANG, X-J., E. SETO. 2003. Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13: 143-153.
- YAMAGUCHI, Y., T. NARITA, N. INUKAI, T. WADA, H. HANDA. 2001. *SPT* Genes: Key players in the regulation of transcription, chromatin structure and other cellular processes. *J. Biochem.* 129: 185-191.
- YU, Y., P. ERIKSSON, D. J. STILLMAN. 2000. Architectural transcription factors and the SAGA complex function in parallel pathways to activate transcription. *Mol. Cell. Biol.* 20: 2350-2357.
- WANG, W., M. CAREY, J. D. GRALLA. 1992. Polymerase II promoter activation: Closed complex formation and ATP-driven start site opening. *Science.* 225: 450-453.
- WENDELL, D. L., L. F. BISSON. 1994. Expression of high affinity glucose transport protein Hxt2p of *Saccharomyces cerevisiae* is both repressed and induced by glucose and appears to be regulated posttranslationally. *J. Bacteriol.* 176: 3730-3737.
- WU, J., M. GRUNSTEIN. 2000. 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem. Sci.* 25: 619-623.
- WU, L., F. WINSTON. 1997. Evidence that Snf-Swi controls chromatin structure over both the TATA and UAS regions of the *SUC2* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 25: 4230-4234.

WU, P-Y., F. WINSTON. 2002. Analysis of Spt7 function in the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA coactivator complex. *Mol. Cell. Biol.* 22: 5367-5379.

ZAWEL, L., D. REINBERG. 1992. Advances in RNA polymerase II transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4: 488-495.

ZHANG, Z., J.C. REESE. 2004. Ssn6-Tup1 requires the ISW2 complex to position nucleosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 23: 2246-2257.

## **EKLER**

### **Ek 1: Araştırmada Kullanılan Besi Yerleri ve çözeltilerin hazırlanması**

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

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 besiyerine eklendi.

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

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, gliserol veya laktat %20'lik stok çözeltiler olarak hazırlanıp 121 °C'de 25 dakika otoklavda steril edildi. Kullanımdan hemen önce üreme ortamına materyal metod bölümünde verilen konsantrasyonlarda ilave edildiler.

#### **3: YNB without amino acids (Yeast Nitrogen Base) (sigma)**

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 1.92 gram litre olacak şekilde hazırlanıp filter ile steril edilip YNB ortamına eklendi.

Karbon kaynağı olarak steril glukoz, gliserol veya laktat'dan üreme ortamına materyal metod bölümünde verilen konsantrasyonlarda ilave edildiler.

**4-  $\beta$ -Galaktozidaz Buffer (Z-Buffer) ( $\beta$ -galaktozidaz ölçüm Tamponu)**

- 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 Z-buffer içinde hazırlandı.

**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. Deneyler 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. Deneyler süresince oda sıcaklığında saklandı

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

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

**Aktivite:  $(OD_{420} \times 1000)/(t \times V \times OD_{600})$**

Bu eşitlikte;

**Aktivite:** Miller Ünitesi, MÜ.

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

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

**V:** vhx Konsantrasyon faktörü

**vh:**  $\beta$ -galaktozidaz reaksiyonunda kullanılan hücre süspansiyonu hacmi (genellikle 0.02 ml)

**Konsantrasyon faktörü:** 5 ml hücre çöktürülüp 0.2 ml'break buffer da çözüldüğünden konsantrasyon faktörü 25 olacaktır. Deneylerde kullanılan hücre hacmine göre değişebilir.

**$OD_{600}$ :**  $\beta$ -galaktozidaz ölçümünde kullanılan 1 ml *S. cerevisiae* hücrelerinin 600 nm'deki ölçüm değeri.



**TEŞEKKÜR**

Öncelikle her konuda bana yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen değerli danıőmanım Doç. Dr. Sezai TÜRKELE'e, her konuda maddi ve manevi desteğini eksik etmeyen ve her zaman yanımda olan aileme, yardımlarından dolayı arkadaşım Araştırma Görevlisi Özer YILMAZ'a sonsuz teşekkür ederim.

**ÖZGEÇMİŞ**

01.07.1981'de Bursa ilinde doğdu. İlkokulu Atatürk İlköğretim okulunda, orta okulu Ticaret ve Sanayi Odası İlköğretim okulunda ve liseyi de Fatih Lisesinde Bursa'da tamamladı. 1998 yılında Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazanarak lisans eğitimine başladı. 2002 yılında U. Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2003 güz yarıyılında Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.