



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

Schizosaccharomyces pombe'DE TİAMİN BİYOSENTEZİNDE
GÖREVLİ GENLERİN ANLATIMLARININ
ARAŞTIRILMASI

Ahmet AKÇAY

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman


Doç. Dr. Bedia G. PALABIYIK

MAYIS, 2014

İSTANBUL

Bu çalışma 29/05/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



Doç. Dr. Bedia G. PALABIYIK (Danışman)

İstanbul Üniversitesi

Fen Fakültesi



Prof. Dr. Nazlı ARDA

İstanbul Üniversitesi

Fen Fakültesi



Doç. Dr. Tuba GÜNEL

İstanbul Üniversitesi

Fen Fakültesi



Doç. Dr. Ali KARAGÖZ

İstanbul Üniversitesi

Fen Fakültesi



Prof. Dr. Ayşegül T. SARIKAYA

Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Fen-Edebiyat Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin 28781 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Doç.Dr. Bedia G. PALABIYIK'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma ve çalışmamın uygulama kısmını destekleyen İstanbul Üniversitesi'ne teşekkürü borç bilirim.

Mayıs, 2014

Ahmet AKÇAY

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ.....	v
SİMGE VE KISALTIMA LİSTESİ.....	vi
ÖZET	vii
SUMMARY	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. TİAMİN METABOLİZMASI.....	3
2.1.1. Biyosentez ve Transportu.....	3
2.1.2. Tiaminin Metabolik Yolaklardaki Düzenleme Rolü.....	6
2.2. GLUKOZ BASKILAMASI.....	8
2.3. OKSİDATİF STRES YANITI VE HİDROJEN PEROKSİT (H ₂ O ₂)	9
2.3.1. <i>S. pombe</i> 'de Stres İndüklü Sty1 MAP Kinaz Yolağı.....	13
2.4. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	14
2.5. GERÇEK-ZAMANLI PZR	15
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	17
3.1. ORGANİZMALAR	17
3.2. BESİ ORTAMLARI	17
3.3. ORGANİZMALARIN ÜRETİLMESİ VE SAKLANMASI	19
3.4. OKSİDATİF STRES UYGULAMA	20
3.5. HÜCRE PARÇALAMA VE TOTAL RNA İZOLASYONU	20
3.6. TOTAL RNA'NİN ELEKTROFORETİK VE SPEKTROFOTOMETRİK ANALİZİ.....	21
3.7. cDNA SENTEZİ.....	22
3.8. GERÇEK-ZAMANLI PZR	22
3.8.1. GZ-PZR Koşulları.....	24
3.8.2 GZ-PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	25
4. BULGULAR.....	27
4.1. TİAMİN METABOLİZMASINA DAHİL OLAN GENLERİN ANLATIMLARININ SAPTANMASI	27
4.1.1. Total RNA'nın İzolasyonu.....	27

4.1.2. cDNA Sentezi.....	28
4.1.3. Gerçek-Zamanlı PZR	29
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	34
KAYNAKLAR.....	37
ÖZGEÇMİŞ	47

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 2.1:** Mayalarda tiamin biyosentez yolağı ile araştırılan gen ürünlerinin bu biyosentezde iş gördükleri alanlar. Periplazma ve hücre içindeki aşamaları (Hohmann, ve Meacock, 1998; Nosaka, 2006). P1, *bsu1*; P2, *thi4*; P3, *thi2*; P4, *pho1*; P5, *TENA/THI* ailesi proteinleri; P6, fosfometilpirimidin kinaz; P7, *thi3*, *nmt1*. 4
- Şekil 2.2:** Tiamin (B₁ vitamini). Pirimidinin metil köprüsü ile tiazole bağlanmasıyla tiamin molekülü oluşur(Begley, T. P., 1999) 5
- Şekil 2.3:** Tiamin pirofosfatın (tiamin PP) koenzim olarak yer aldığı reaksiyonlar. A. Transketolaz. B. Piruvat dehidrogenaz ve α -ketoglutarat dehidrogenaz.. 7
- Şekil 2.4:** Reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu. Süperoksit anyonları (O_2^-), elektron transport zinciri esnasında elektronun oksijene geçmesi ile oluşur. Hidrojen peroksit (H_2O_2) ise süperoksitin süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenmesi sonucu oluşur. 11
- Şekil 2.5:** "SYBR Green I" yöntemi (van Der Velden ve diğ., 2003)..... 16
- Şekil 3.1:** PFAFFL denklemi..... 26
- Şekil 4.1:** Total RNA izolasyonlarının agaroz jel elektroforezi. 1) *S. pombe 972h* yabani ırk; 2) *S. pombe ird11*..... 27
- Şekil 4.2:** cDNA sentezi ürünlerinin agaroz jel elektroforezi. 1) *S. pombe 972h*; 2) *S. pombe ird11 h*; 3) Fermentaz 100bp ladder..... 29
- Şekil 4.3:** Referans ve hedef genlere ait reaksiyon verimini gösteren standart eğriler..... 30
- Şekil 4.4:** P1 (74.94) ve *act1* (77.26) genleri için elde edilen erime eğrileri..... 31
- Şekil 4.5:** P1 (74.94) ve *act1* (77.26) genleri için elde edilen erime eğrileri..... 31
- Şekil 4.6:** Tiamin metabolizmasına dahil olan genlerin yabani tip (*972h*) ile karşılatırmalı olarak anlatım profilleri. P1: SPAC17A2.01, *bsu1*; P2: SPAC23H4.10c, *thi4*; P3: SPBC26H8.01, *thi2*; P4: SPBP4G3.02, *pho1*; P5: SPBP8B7.18c, *TENA/THI* ailesi proteinin geni; P6: SPCC18B5.05c, fosfometilpirimidin kinaz (predicted) geni; P7: SPCC1223.02, *thi3*, *nmt1*. HP: Normal koşulda üretildikten sonra H_2O_2 uygulanmış örnek; M: Minimal ortamda üretilmiş örnek. 32
- Şekil 4.7:** Tiamin metabolizmasına dahil olan genlerin *ird11* ile karşılatırmalı olarak anlatım profilleri. P1: SPAC17A2.01, *bsu1*; P2: SPAC23H4.10c, *thi4*; P3: SPBC26H8.01, *thi2*; P4: SPBP4G3.02, *pho1*; P5: SPBP8B7.18c, *TENA/THI* ailesi proteinin geni; P6: SPCC18B5.05c, fosfometilpirimidin kinaz (predicted) geni; P7: SPCC1223.02, *thi3*, *nmt1*. HP: Normal koşulda üretildikten sonra H_2O_2 uygulanmış örnek; M: Minimal ortamda üretilmiş örnek. 33

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan <i>S. pombe</i> ırklarının özellikleri.....	17
Tablo 3.2: <i>S. pombe</i> ile çalışmada kullanılan besi ortamları.....	18
Tablo 3.3: MML besi ortamının hazırlanmasında kullanılan stok çözeltiler	19
Tablo 3.4: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar ve çözeltiler.....	22
Tablo 3.5: Gerçek-zamanlı PZR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin dizileri (P1: SPAC17A2.01, <i>bsu1</i> ; P2: SPAC23H4.10c, <i>thi4</i> ; P3: SPBC26H8.01, <i>thi2</i> ; P4: SPBP4G3.02, <i>pho1</i> ; P5: SPBP8B7.18c, <i>TENA/THI</i> ailesi proteinin geni; P6: SPCC18B5.05c, fosfometilprimidin kinaz (predicted) geni; P7: SPCC1223.02, <i>thi3</i> , <i>nmt1</i> .).....	24
Tablo 3.6: PZR koşulları.....	25
Tablo 4.1: Kontrol ve deney gruplarına ait total RNA miktarları.....	28

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler Açıklama

α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gamma
μ	: Mikro

Kısaltmalar Açıklama

μ l	: Mikrolitre
2-DOG	: 2-Deoksi-D-glukoz
bç	: Baz çifti
CAT	: Katalaz
cDNA	: Komplementer DNA
C _t	: Crossing threshold
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EtBr	: Etidyum bromür
GZ PZR	: Gerçek zamanlı PZR ("real time PCR", qPCR)
GPCR	: G protein bağlı reseptörler
GSH-I	: γ -Glutamil sistein sentetaz inhibitörü
GSHPX	: Glutasyon peroksidaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HMP	: 4-Amino-5-hidroksimetil-2-metilpirimidin monofosfat
HET	: 5- (2-Hidroksietil)-4-metiltiazol fosfat
MAPK	: Mitojenlerle aktiveleşen protein kinaz
mM	: Milimolar
ml	: Mililitre
MMA	: Minimal katı besi ortamı
MML	: Minimal sıvı besi ortamı
OH	: Hidroksil
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süper oksit dismutaz
TAE	: Tris-asetat-EDTA
TCA	: Trikarboksilik asit siklusu
TDP	: Tiamin difosfat
TMP	: Tiamin monofosfat
TTP	: Tiamin trifosfat
UV	: Ultraviyole
YEA	: Maya özütlü zengin katı besiyeri
YEL	: Maya özütlü zengin sıvı besiyeri

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Schizosaccharomyces pombe'DE TİAMİN BİYOSENTEZİNDE GÖREVLİ GENLERİN ANLATIMLARININ ARAŞTIRILMASI

Ahmet AKÇAY

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Bedia G. PALABIYIK

Esansiyel bir vitamin olan tiaminin aktif formu TDP (Tiamin difosfat) birçok metabolik enzim (karbonhidrat metabolizmasında; piruvat dehidrogenaz, α -ketoglutarat dehidrogenaz ile pentoz fosfat yolağında; transketolaz) için ko-faktör görevini üstlenmektedir. Tiazol ve pirimidinin tiamin-fosfat sentaz tarafından bir araya getirilmesiyle TMP (tiamin mono-fosfat) oluşur. Daha sonra TMP aktif form olan TDP'ye çevrilir. *Schizosaccharomyces pombe* tiaminin hem biyosentezini yapabilmekte hem de dış kaynaklardan hazır alabilmektedir. Bu mayada tiamin biyosentez yolağı besi ortamındaki tiaminin varlığı ile baskılanır.

Bu tez çalışması kapsamında, glukoz baskılamasına ve oksidatif strese karşı dirençli olan *S. pombe* ird11 mutanlığı *S. pombe* yabani tipi ile karşılaştırmalı olarak, bir taraftan tiamin içeren ve içermeyen koşullarda tiamin biyosentez ve transportuna dahil genlerin anlatım profilleri karşılaştırılırken, diğer taraftan, tiaminin oksidatif stres yanıtındaki rolü araştırıldı. Gen anlatım profillerinin karşılaştırılmasında, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR) tekniğinden yararlanıldı. Oksidatif strese maruz bırakılan ird11'de (ird11HP) yabani *S. pombe* ırkına göre, tiamin biyosentez ve transportundan sorumlu bakılan tüm genlerin (*bsu1*, *thi4*, *thi2*, *pho1*, TENA/THI ailesi proteinin geni, fosfometilpirimidin kinaz (predicted) geni, *thi3/nmt1*) anlatım seviyelerinin arttığı görüldü. Bu durum, tiaminin oksidatif yanıtında önemli rol oynadığını düşündürdü.

Takip eden çalışmalarda, tiaminin oksidatif stres ve glukoz metabolizması ile etkileşiminin hangi düzeyde ve hangi aşamalarda olduğunun ortaya çıkarılması, nörodejeneratif ve diyabet gibi metabolik hastalıklarda bazı kör noktaları aydınlatacaktır.

Mayıs,2014, Tezin sayfa sayısı (55).

Anahtar kelimeler: *Schizosaccharomyces pombe*, tiamin, ird11, oksidatif stres, glukoz metabolizması

SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF GENES EXPRESSION INVOLVED IN THIAMINE BIOSYNTHESIS IN *Schizosaccharomyces pombe*

Ahmet AKÇAY

İstanbul University

Graduate School of Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assoc. Dr. Bedia G. PALABIYIK

One of the essential vitamins thiamine active forms TDP (thiamine diphosphate) is known to undertake the task of co-factor for most of the metabolic enzymes (in carbohydrate metabolism as pyruvate dehydrogenase, α -ketoglutarate dehydrogenase and in the pentose phosphate pathway as transketolase). TMP (thiamine mono-phosphate) is occurred by the thiamine-phosphate synthase which combines thiazol and pyrimidine together. Later on, the TMP is converted to active form of TDP. *Schizosaccharomyces pombe* can obtain thiamine either by biosynthesis on it self or by taking it ready from external sources. Thiamine biosynthesis pathway in this yeast is suppressed by the presence of thiamine.

Within the scope of this thesis, we compared wild type *S. pombe* and *S. pombe ird11* mutant which is resistant to glucose repression and oxidative stress. Again, while comparing genes' (which having roles in biosynthesis of thiamine or transporting of it) expression profiles under conditions of presence of thiamine and non-presence of thiamine, the role of thiamine in oxidative stress was investigated at the same time. In comparing genes' expression profiles, real time polymerase chain reaction (qPCR) technique was used. The expression of genes (*bsu1*, *thi4*, *thi2*, *pho1*, TENA/THI family protein genes, phosphomethylpyrimidine kinase (predicted) gene, *thi3/nmt1*) which are responsible for thiamine biosynthesis and transport increased in *ird11* (*ird11HP*) mutants under oxidative condition by comparison to wild type *S. pombe*. This result showed that thiamine has an important role on the oxidative stress response.

In the following studies, revealing the levels and the stages of the interaction of thiamine both with glucose metabolism and with oxidative stress, will light on some blind spots of some important methabolic diseases as diabetes and neurodegenerative ones.

MAY, 2014, The number of pages of the thesis (55).

Keywords: *Schizosaccharomyces pombe*, thiamine, *ird11*, oxidative stress, glucose metabolism

1. GİRİŞ

Tiamin, suda çözünen B₁ vitamini, temel bir vitamin olup, çoğu metabolik enzim için önemli bir kofaktördür. Biyolojik olarak aktif formu olan tiamin difosfat (TDP); glikoliz, pentoz fosfat yolağı ve trikarboksilik asit siklusu (TCA) gibi evrensel metabolik yollarda önemli bazı enzimlerin (pirüvat dehidrogenaz, α -ketoglutarat dehidrogenaz, dallanmış-zincirli α -ketoasit dehidrogenaz, transketolaz ve pirüvat dekarboksilaz) kofaktörü olarak iş görmektedir (Friedrich, 1987). Ayrıca, transketolazlar için ve oksoasitlerin dekarboksilasyonunda görevli enzimler için kofaktör görevi görmektedir. İnsan beslenmesinde tiamin temel bir bileşen olup tüm canlı hücrelerde TDP-bağımlı enzimler karbonhidrat metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. Ayrıca tiaminin lipid ve amino asit metabolizmasında da görev aldığı bilinmektedir (GianPietro ve Alessandro, 2007).

Bununla beraber, tiamin füzyon mayasında mayoz bölünmede ve zigot oluşumunda inhibitör olarak iş görmektedir. Tiamin biyosentez yolağı ve yolaktan sorumlu tüm genlerin anlatımı füzyon mayasında tiamin varlığında baskılanmaktadır (Nosaka ve diğ., 1993).

Glukoz tüm organizmalar için en verimli ve en çok tercih edilen karbon kaynağıdır. *Schizosaccharomyces pombe*'de bu basit karbon kaynağı ortamda varken diğer karbon kaynaklarını parçalayan enzimlerin biyosentezleri baskılanmaktadır. Yapılan birçok çalışmayla glukoz baskılaması ile oksidatif stres arasındaki ilişki ispatlanmışsa da tam olarak nasıl bir ilişki olduğu veya hangi moleküllerin kritik rolleri üstlendiği bilinmemektedir. Önceki çalışmalarda glukoz metabolizması ile oksidatif stres yanıtı arasındaki temel ilişkiyi ortaya koymak için *S. pombe*'nin glukoz baskısına dirençli konstitütif invertaz mutantında bu ilişki teyit edilmiştir (*ird11*) (Kig ve diğ., 2005).

Moleküler oksijen normal seviyede iken inaktif ve zararsız olmasına karşın bazen kısmi indirgemeler sonucu süperoksit anyonları ve hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi, yüksek reaktif hidroksil radikallerini meydana getiren reaktif oksijen türlerini (ROT) oluşturabilmektedir (Halliwell, 2006).

Özellikle aerobik solunum sürecinde $\bullet\text{O}_2^-$ (süper oksit anyonu), H_2O_2 (hidrojen peroksit) ve $\bullet\text{OH}$ (hidroksil radikali) gibi ROT'lar maya hücrelerini hedef alır. H_2O_2 'in indirgenmesiyle oluşan $\bullet\text{OH}$ radikalleri en büyük zararı metal iyonlarının varlığında (Fenton reaksiyonu yoluyla) verir. Üreme ortamındaki çözülmüş oksijen derişimi artarsa veya iyonize radyasyon uygulanırsa, bu partiküllerin proteinler, lipitler ve DNA'da yol açacağı oksidatif hasar artar. Maya hücrelerinin oksidatif stres ile karşılaştıklarında, içerdikleri antioksidan moleküller ve enzimler aracılığıyla aktif oksijeni ortamdaki uzaklaştırmaya çalıştıkları bilinmektedir (Walker, 1998).

Günümüzde tanı ve tedavisinde çok az ilerleme kaydedilmiş kritik birçok hastalığın da doğrudan veya dolaylı olarak tiamin eksikliği sonucu ortaya çıktığı bilinmektedir. Beri-beri (Schweingruber, A. M., 1991), Wernicke-Korsakoff sendromu (Cook ve diğ., 1998), tip-1 ve tip-2 diyabet bunlardan sadece birkaçıdır (Morgan, 1999; Thornalley ve diğ., 2007).

Bu çalışmada, *S. pombe* yabani tip (972 h⁻) ve glukoz baskılamasına dirençli *ird11* mutanını normal koşullarda üretildikten sonra oksidatif stres (2mM H_2O_2 , 1 saat) uygulanmış ve uygulanmamış örneklerden RNA izolasyonu yapıldı. Ardından mRNA'dan cDNA (komplementer DNA) sentezlendi. Tiamin biyosentezine dahil olduğu bilinen genler (*bsu1*, *thi4*, *thi2*, *pho1*, TENA/THI ailesi proteinlerini şifreleyen genler (predicted), fosfometilpirimidin kinazı şifreleyen gen (predicted), *thi3- nmt1-*) için tasarlanan primerler (Tablo 3.5) kullanılarak söz konusu genlerin anlatım profilleri gerçek-zamanlı PZR tekniğiyle çıkarıldı.

2. GENEL KISIMLAR

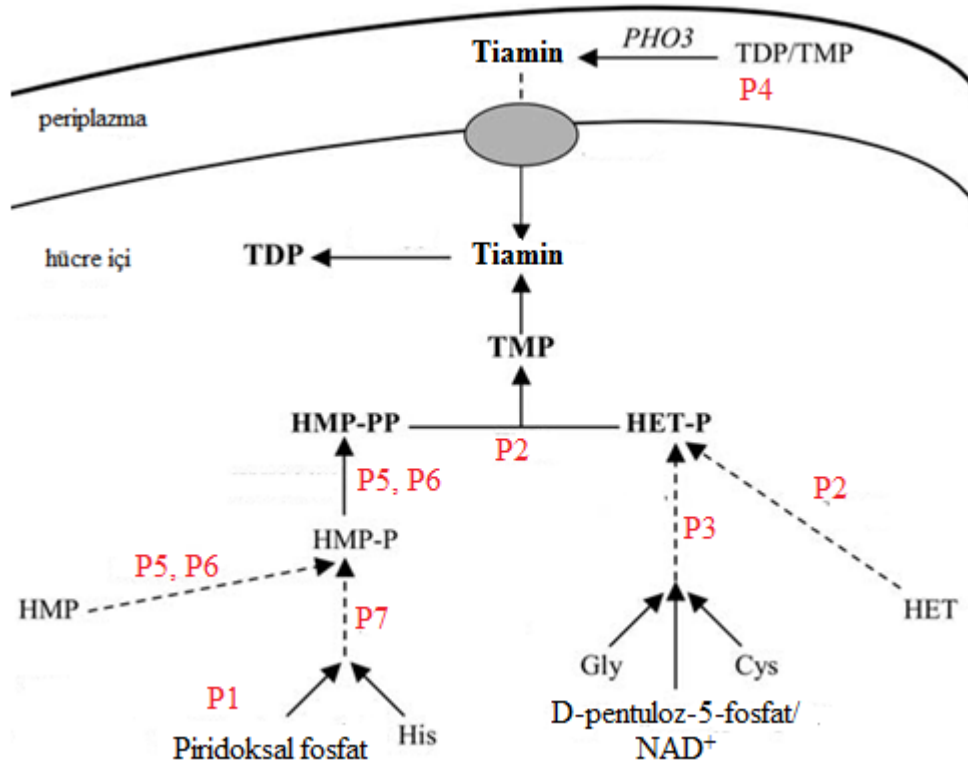
2.1. TİAMİN METABOLİZMASI

2.1.1. Biyosentez ve Transportu

Bazı mikroorganizma, alg ve protozoaların yanısıra yüksek ökaryotlar da büyüme faktörü olarak tiamine (B1 vitamini) gerek duyulmaktadır (Koser, 1968). Birçok bakteri, mantar ve bitki tiamini sentezleyebilmektedir. Buna karşın başta memeliler olmak üzere diğer hayvanlar ise tiamini dışardan hazır almak zorundadır (Friedrich, 1987). *Saccharomyces cerevisiae* ve *Schizosaccharomyces pombe* mayaları tiamini biyosentezden elde edebilmelerine karşılık, ikisi aynı zamanda dış kaynaklardan da tiamini hazır alabilmektedir (Şekil 2.1). Farklı yollarla sentezlenen iki farklı aromatik yapıyı öncü molekülü bir araya getirilerek tiamin oluşturulur. Bu aromatik öncülerden biri 4-amino-5-hidroksimetil-2-metilpirimidin monofosfat (HMP) ve diğeri 5- (2-hidroksietil)-4-metiltiazol fosfat (HET) tir. Bu iki alt birim, tiamini sentezleyebilen tüm organizmalarda aynıdır (Friedrich, 1987; Nasoka, 2006).

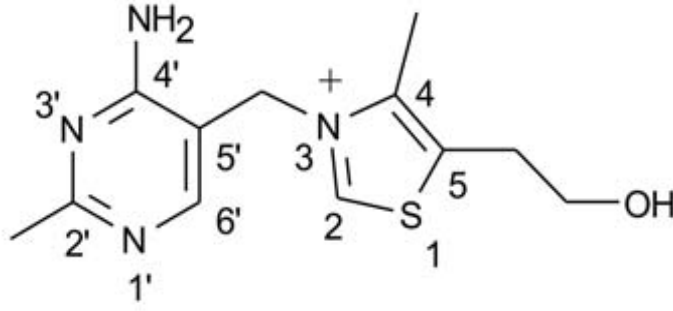
Pirimidin halkasında bir NH₂ (amino) grubu, tiyazol halkasında da çok aktif bir N atomu vardır (Şekil 2.2). Pirimidin ve tiyazol halkalarını bağlayan metilen köprüsü oldukça zayıftır. Özellikle alkali çözeltide ısıtılırsa bu köprü kopar ve vitamin özelliğini yitirir (Çelik, 2006). Bu yollar bakterilerde iyi bilinmekle birlikte çoğu ökaryotlarda tamamen farklı olduğu görülmektedir (Begley, T. P., 1999; Settembre, 2003). HMP ve HET fosforillenip tiamin monofosfata (TMP) dönüşür. Bakterilerde tiamin monofosfat doğrudan TDP'ye fosforillenmesine karşın, mayalarda tiamin monofosfat kofaktör formuna dönüştürülmeden önce serbest tiamine hidrolizlenir (Nosaka ve diğ., 1993; Enjo ve diğ., 1997). *S. cerevisiae* ve *S. pombe*'de tiamin biyosentez yoluna ilişkin genlerin anlatımları ortamdaki tiamin tarafından tamamen baskılanırken, tiamin yokluğunda anlatımları yüksek düzeyde artmaktadır (Maundrell, 1990; Zurlinden ve Schweingruber, 1992; Manetti, ve diğ., 1994; Praekelt ve diğ., 1994; Zurlinden ve Schweingruber, 1994).

Tiaminin, kendi transportunu da baskıladığı gözlenmiştir (Schweingruber, M. E. ve Edenharter, 1990; Schweingruber, A. M., 1991).



Şekil 2.1: Mayalarda tiamin biyosentez yolağı ile araştırılan gen ürünlerinin bu biyosentezde iş gördükleri alanlar. Periplazma ve hücre içindeki aşamaları (Hohmann, ve Meacock, 1998; Nosaka, 2006). P1, *bsu1*; P2, *thi4*; P3, *thi2*; P4, *pho1*; P5, TENA/THI ailesi proteinlerini şifreleyen gen; P6, fosfometilpirimidin kinazı şifreleyen gen; P7, *thi3*, *nmt1*.

Tiamin hücre içine aktif transport ile alınır ve hücre içi konsantrasyonu hücre dışı konsantrasyonunun yaklaşık 10.000 katı seviyelerindedir (Iwashima ve diğ., 1973). Hücre dışı HMP ve HET, TDP oluşturmak için kullanılır. HMP ve tiamin genel transport sistemi ile taşınırken, HET difüzyon ile hücre içine alınır (Nosaka, 2006). *S. cerevisiae*'de tiamin ve tiamin fosfatlarını taşıyan iki genin (THI10 ve PHO3) ürünleri membrana yerleşik bulunur (Nosaka ve diğ., 1989; Enjo ve diğ., 1997). *S. pombe*'de Pho1 de membranda bulunur (Fankhauser ve diğ., 1995). Ek olarak, *S. cerevisiae*'de TDP'yi sitosolden mitokondriye taşıyan mitokondri iç membran proteini, Tpc1p, tanımlanmıştır (Marobbio ve diğ., 2002).



Şekil 2.2: Tiamin (B₁ vitamini). Pirimidinin metilen köprüsü ile tiazole bağlanmasıyla tiamin molekülü oluşur (Begley, T. P., 1999).

Serbest haldeki tiaminle beraber hücrede serbest hidroksil gruplu tiamin fosfat esterleri de bulunabilir; monofosfat (TMP), difosfat (TDP) ve trifosfat (TTP). *S. pombe*'de tiamin, kendi metabolizmasında görevli *thi2*, *thi3*, *thi4*, *pho4* ve *car1* gibi birçok genin mRNA sentezini baskılamaktadır (Schweingruber, A. M., 1991).

Bu çalışmada ele alınan tiamin biyosentez yoluna ve taşınmasına ilişkin genlerin özellikleri aşağıda sıralanmıştır:

SPBC26H8.01 (*thi2*) geni *nmt2'*ye allelik olup (Manetti ve diğ., 1994) tiamin molekülünün tiazol sentezinde görev alır (Zurlinden ve Schweingruber, 1992). "Thiazole biosynthesis enzyme" proteinini şifreler. *S. cerevisiae*'deki ortolog geni *THI4'*dür;

SPCC1223.02 (*thi3*, *nmt1*) geni, 4-amino-5-hidroksmetil-2-metilprimidin fosfat sentaz (Nmt1) proteinini şifreler (Maundrell, 1990). McQuire ve Young (2006) *S. pombe*'de *thi3* genin *thi1* ve *thi5* genleri ile düzenlendiğini rapor etmişlerdir. *S. pombe thi3* geninin *S. cerevisiae*'deki ortologları *THI11*, *THI12*, *THI13* ve *THI15* genleridir. Bu genlerin ürünleri tiamin biyosentezinde HMP öncülünün sentezine katılır (Schweingruber, A. M., 1991);

SPAC23H4.10c (*thi4*) geni, tiamin-fosfat diprofosforilaz ve hidroksietiltiazol kinaz enzimatik aktivitelerine sahip bi fonksiyonel bir ürünü şifreler. Bu ürün, tiamin monofosfat oluşturmak üzere iki alt bileşeni birleştirme reaksiyonunda görevlidir (Zurlinden, ve Schweingruber, 1994; Chatterjee, A., ve diğ., 2007);

SPBP4G3.02 (*pho1*) geni ortamda doğal bir substrat olarak bulunup tiamin fosfatı defosforilleyebilen ve tiamin tarafından baskılanan bir asit fosfataz, Pho1 (N-glikozillenmiş hücre duvarı proteini) kodlar (Coddington ve diğ., 1986; Elliott ve diğ., 1986; Fankhauser ve diğ., 1995);

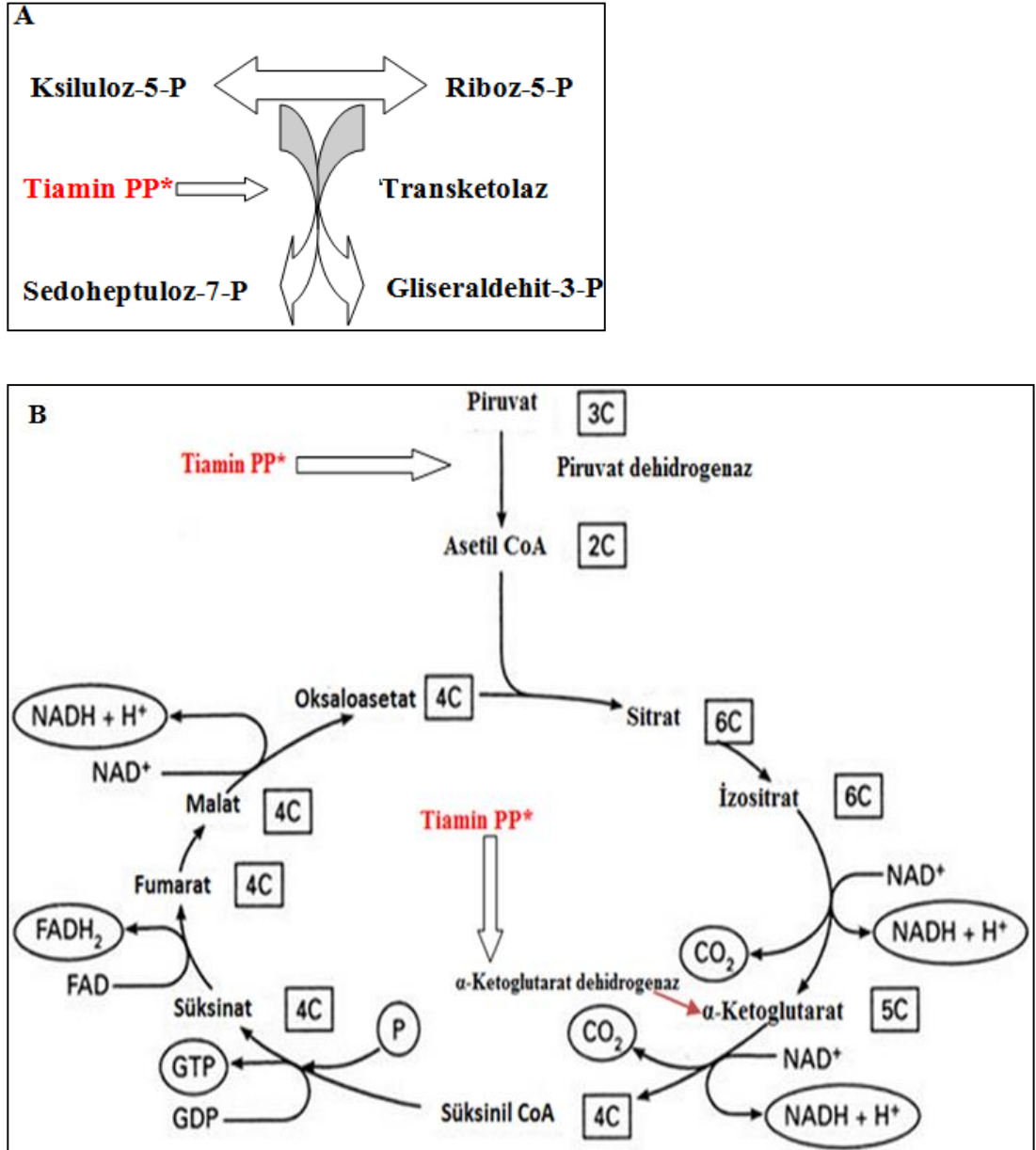
SPAC17A2.01 (*car1*, *bsu1*, *sol*) geni ise pridoksin, pridoksal ve pridoksamin moleküllerine karşı yüksek ilgili (high affinity) 12 geçişli-transmembran bir proteini şifreler (Schweingruber, M. E. ve diğ., 1986; Schweingruber, M. E., 1990; Schweingruber, A. M., 1991; Stolz ve diğ., 2005; Vogl ve diğ., 2008);

SPBP8B7.18c geninin ürünü tiamin biyosentez sürecinde rol alan fosfometilprimidin kinazdır. *S. cerevisiae*'deki *THI20*, *THI21* ve *THI22* genlerinin ortoloğudur (Kim ve diğ., 2010);

SPCC18B5.05c geni de fosfometilprimidin kinazı şifreler ve *S. cerevisiae*'deki ortologları SPBP8B7.18c genininkiler ile aynıdır (Kim ve diğ., 2010).

2.1.2. Tiaminin Metabolik Yolaklardaki Düzenleme Rolü

Bu temel vitamin, metabolik enzim için önemli bir kofaktördür. Örneğin; glikoliz, pentoz fosfat yolağı ve trikarboksilik asit siklusu (TCA) gibi evrensel metabolik yolaklarda enzimlere (pirüvat dehidrogenaz, α -ketoglutarat dehidrogenaz, dallanmış-zincirli α -ketoasit dehidrogenaz, transketolaz ve pirüvat dekarboksilaz) kofaktör olarak katılır (Friedrich, 1987) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Tiamin pirofosfatın (tiamin PP) koenzim olarak yer aldığı reaksiyonlar. **A.** Transketolaz. **B.** Piruvat dehidrogenaz ve α -ketoglutarat dehidrogenaz.

Birçok organizmada tiamin varlığının genel gen anlatımı üzerinde çok büyük etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Tiamin mayalardan *S. cerevisiae*'de, çoğu tiamin metabolizmasında olmak üzere, 60'ın üzerinde genin baskılamasını yapmaktadır (Hohmann, ve Meacock, 1998; Nosaka ve diğ., 2005; Mojzita ve Hohmann, 2006). Eşey farklılaşmasında –konjugasyonu ve zigot değişimini baskılayan- tiaminin füzyon

mayada etkisi çok büyüktür (Schweingruber, M. E. ve Edenharter, 1990). TDP'nin düzenleme aktivitesi bilinmekle beraber nükleik asit ve protein düzeyinde henüz tam olarak anlaşılmış değildir (Hohmann, ve Meacock, 1998; Nosaka, 2006).

Son çalışmalarda, TDP'nin "riboswitches" olarak adlandırılan mRNA domeinlerine bağlanıp yapılarını etkilediği ve özellikle tiamin biyosentezinde görevli genlerin anlatımını düzenlediği ortaya çıkarılmıştır (Lai, 2003). Tam olarak aydınlatılamamışsa da TTP'nin sinir sistemi fizyolojisinde de rol aldığı ortaya konmuştur (Bettendorff, L., 1996). *Escherichia coli*'de de amino asit açlığında TTP'nin birikmesi, ökaryot hücrelerde olduğu gibi TTP'nin prokaryot hücrelerde de sinyal molekül olarak evrensel bir role sahip olduğunu göstermiştir (Lakaye ve diğ., 2004).

Başka bir çalışmada da, tiamin ve türevlerinin organizmanın farklı stres durumlarında yanıt oluşturmada iş gördüğü açıklanmıştır; UV ışığına maruz bırakılan hücrelerde, DNA hasar onarımında (Machado ve diğ., 1997) ; oksidatif stres/yüksek sıcaklık uygulanan hücrelerde de mitokondriyal stabilitenin artırılması süreçlerinde (Medina-Silva ve diğ., 2005) rol oynadığı gözlenmiştir.

Yaygın bir hastalık olan beri-beri hastalığı da tiamin eksikliği sonucu ortaya çıkmaktadır (Schweingruber, 1991). Wernicke-Korsakoff sendromundaki Wernicke ensefalopatisi (WE) de tiamin eksikliğinden kaynaklı önemli bir nörodejeneratif hastalıktır (Alan, ve Roger, 2009). Nörolojik fonksiyon bozuklukları ve beyinde hasarlara neden olan tiamin eksikliğin biyokimyasal sonuçlarının bu durumu ortaya çıkardığı ortaya konmuştur. Tiamin eksikliği oksidatif stres yanıt sürecini inhibe etmektedir. WE görülme sıklığı tüm populasyonda % 1.5 iken kronik alkoliklerde bu oran % 25-80'dir (Cook, ve diğ., 1998; Morgan, 1999).

2.2. GLUKOZ BASKILAMASI

Glukoz metabolizması, glukozun algılanması, sinyal iletiminin oluşturulması, glukozun hücre içine taşınması ve katabolik represyon (glukoz baskılaması) süreçleri ile glikolizis, solunum veya fermentasyonla enerji eldesi, pentoz fosfat yolu ve glukoneogenez süreçlerini kapsar.

S. pombe ve çoğu maya türlerinde sukroz, fruktoz, galaktoz, mannoz gibi değişik şekerler karbon kaynağı olarak kullanılmakla beraber, ortamda glukozun bulunması durumunda tercih edilen karbon kaynağı glukoz olur. Bu durumda diğer alternatif karbon kaynaklarının kullanımı için gerekli enzimlerin anlatımı çok düşük seviyededir veya tamamen durma düzeyindedir. Bu süreç "katabolit represyon" veya "glukoz baskılaması" olarak isimlendirilmektedir. Enerji yolağındaki substratların alım ve yıkımının glukoz ve diğer karbon kaynakları tarafından baskılanabilmesi mayalar için çok önemlidir (Walker, 1998; Flores ve diğ., 2000). Trikarboksilik asit siklusu (Polakis ve Bartley 1965), oksijenli solunum (Holzer, 1968) ve disakkaritlerin hidrolizindeki bazı enzimlerin katabolit baskıya maruz kaldıkları bilinmektedir (MacQuillan ve diğ., 1960).

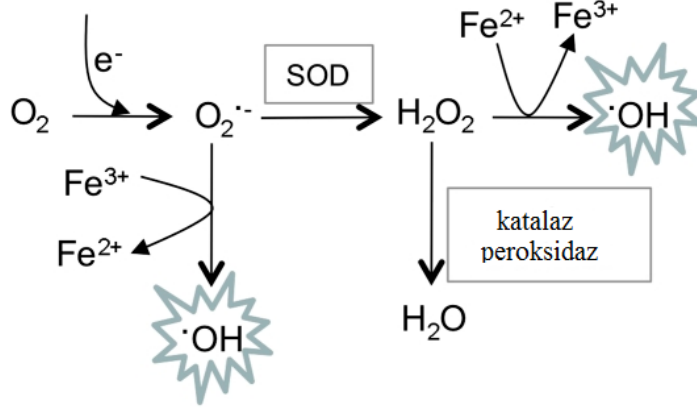
S. pombe'de glukoz algılanması ve sinyal iletimi cAMP-bağımlı protein kinaz A (PKA) tarafından düzenlenir (Hoffman, 2005). G protein aracılı sinyallenme, mayalarda cAMP yolağında iş görmektedir. Glukoz, plazma membranındaki yedi geçişli transmembran heliks reseptörleri (G protein-bağımlı reseptörler veya kısaca GPCRler) ile algılanır ve glukoz sinyali GPCRlere bağlı heterotrimerik guanin-nükleotid bağlayıcı proteinler (G proteinleri- G_{α} , G_{β} ve G_{γ}) aracılığı ile hücre içine iletilir. Heterotrimerik G-proteini alt birimleri, hücre-dışı sinyalleri hücre-içi sinyallere dönüştürürler. Burada G_{α} , membrana bağlı adenilat siklaz aktivasyonunu tetikleyerek cAMP oluşumunu katalizler. cAMP düzeyindeki geçici artış PKA'nın aktivasyonuna yol açar (Ephrussi, 1956; Lengeler ve diğ., 2000; D'Souza, ve Heitman, 2001). Bu sinyal iletim kaskadı glukoneogenez, solunum, alternatif karbon kaynaklarının kullanımı, stres yanıtı ve eşey gelişimine karışan genlerin anlatımlarını baskımlarken, glikoliz ve glukoz taşınımı yollarına ilişkin genlerin anlatımını teşvik eder (Hoffman ve Winston, 1991; Bolker, 1998; Landry ve diğ., 2000; Welton ve Hoffman, 2000; Landry ve Hoffman, 2001).

2.3. OKSİDATİF STRES YANITI VE HİDROJEN PEROKSİT (H_2O_2)

Oksidatif stres, hücrede metabolizma sonucu üretilen serbest radikaller ve bu radikallerin toksik etkilerini gideren antioksidan sistem elemanları arasındaki dengenin bozulması sonucu hücre içinde serbest radikallerin artması durumudur. Aerobik canlılar

yaşamak için moleküler oksijene gereksinim duymaktadır. Ancak temel enerji üretim süreçlerinin mutlak elemanı olan oksijen molekülü bazen hücre için zararlı bazı moleküllere (reaktif oksijen türleri, ROTlar) dönüştürülmektedir. ROTlar, süperoksid ($O_2\bullet^-$), peroksit ($O_2\bullet^{-2}$), hidroksil ($OH\bullet$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) olarak sıralanabilir. ROTlar büyük çoğunlukla, oksijenli solunumun gerçekleştiği mitokondrilerdeki elektron transport zincirindeki (ETZ) kaçaklardan meydana gelmektedir. Normal şartlarda mitokondri hücresel oksijenin % 90'ını tüketir (Chance ve diğ., 1979; Gorman ve Taylor, 2011; Anupama ve diğ., 2013) ve bunun da % 15'ini ROT'lara dönüştürür (St-Pierre ve diğ., 2002). Oksijenin olumsuz etkileri, önemli biyomoleküllerin atom ve moleküler yapısını bozma özelliğinden kaynaklanır. ROT'ların oluşumundan sorumlu tek molekül oksijen değildir. Diğer bazı etkenler (radyasyon, ultrason, yüksek sıcaklık, ozmotik ve iyonik stres, yaralanma, enfeksiyon, mutasyon) ve hücre içine giren yabancı maddeler (ksenobiyotikler) de ROT oluşumuna yol açabilirler (Mathews ve diğ., 2000).

Bazı ROT'ların oksidatif strese neden olup hücreye zarar vermesinin yanında birçok biyolojik süreçte önemli bir sinyal molekülü olarak da görevleri vardır (Veal ve diğ., 2007). Örneğin, hidrojen peroksit (H_2O_2)'in fizyolojik görevlerinden biri, belirli genlerin transkripsiyonunu sağlayan NF κ B transkripsiyon faktörünün hücre çekirdeğine geçişini (nükleer translokasyon) aktive etmektir. Normal hücresel metabolizma, oldukça yüksek oranda ROT üretilir. Eşleşmemiş elektrona sahip olmadığı için gerçekte bir radikal olmayan H_2O_2 çeşitli oksidazların (örneğin NADPH oksidaz, glukoz oksidaz) ürünü olarak oluşabileceği gibi, hem-proteinlerin ve flavo-proteinlerin otooksidasyonu ile de meydana gelebilmektedir. H_2O_2 'nin reaksiyona girme eğilimi süperoksitten daha az olmakla beraber, bu madde çok kolay yayılabilme ve plazma zarını kolaylıkla geçebilme özelliğine sahiptir. Bu nedenle, kolaylıkla DNA'ya, lipitlere ve proteinlere bağlanır ve bunları oksitler (Lee ve diğ., 1999). H_2O_2 semikinonlarla reaksiyona girerek veya $O_2\bullet^-$ ile etkileşerek (Haber-Weiss reaksiyonu) veya serbest metallerle Fenton reaksiyonuna girerek çok zararlı hidroksil radikalini ($HO\bullet$) oluşturur, ağır metal iyonlarıyla da etkileşime geçtiğinde protein inhibisyonuna (özellikle hem-proteinler) yol açar (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu. Süperoksit anyonları ($\cdot\text{O}_2^-$), elektron transport zinciri esnasında elektronun oksijene geçmesi ile oluşur. Hidrojen peroksit (H_2O_2) ise süperoksitin süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenmesi sonucu oluşur.

H_2O_2 'nin O_2 ve H_2O 'ya ayrışımı, katalaz ve çeşitli peroksidazlarla gerçekleşir. Aminoasit kalıntılarının karbonil türevlerine oksitlenmesi de hidrojen peroksitin önemli toksik etkilerinden biri olarak değerlendirilmektedir. Mayada H_2O_2 'nin uyardığı protein karbonilasyonunun özgün olduğu ve aktivitesini yitiren başlıca enzimlerin gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz ve bazı mitokondriyal enzimler olduğu bulunmuştur. Oksidatif stresin moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik pek çok çalışma mayalarla gerçekleştirilmiştir. *S.cerevisiae*'de konuya ilişkin çok sayıda metabolik ve genetik çalışma yapılmıştır. *S.cerevisiae*'de hücre içi glutasyon düzeyinin H_2O_2 'ye karşı oluşturulan oksidatif stres cevabındaki rolü araştırılmış ve γ -glutamil sistein sentetaz (GSH-I) inhibisyonu sonucunda H_2O_2 'ye duyarlılığın arttığı ve H_2O_2 'ye karşı oluşturulan uyumluluk cevabının baskılandığı görülmüştür. GSH I geni kusurlu mutantlar kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada, bu mutantların H_2O_2 ve süperoksit anyonlarına aşırı duyarlılık gösterdikleri, logaritmik ve durağan faz kültürleri kullanılarak gösterilmiştir. *S. cerevisiae*'de yapılan çalışmalarla, bazı anahtar metabolik enzimlerin H_2O_2 tarafından karbonilasyona teşvik edildiği bulunmuş ve oksidatif stres cevabının oluşturulmasında düzenleyici görevleri olan Yap 1 ve Skn 7 transkripsiyon faktörlerinin rolleri araştırılmıştır. *S. pombe* hücrelerinin öldürücü olmayan dozlarda H_2O_2 ile ön işleme sokulduğunda yüksek dozlardaki stres uygulamalarının (örneğin, H_2O_2 , etanol, yüksek sıcaklık) öldürücü etkilerine karşı direnç kazandıkları

gözlenmiştir. Aynı çalışmada, hücrelerin H₂O₂ içeren ortamlara uyum sağlarken 15 kadar yeni polipeptit ürettiği ve katalaz aktivitesini 8 kata kadar artırabildiği tespit edilmiştir (Mutoh ve diğ., 1995). Hücre, oksidatif stresin üstesinden gelmek için bazı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma mekanizmalarına sahiptir. Mitokondrideki birçok metabolik olaylarda görevli enzimlerin uygun iş yapması için tiamin gerekmektedir (Desjardins ve Butterworth, 2005).

S. pombe ile yapılan çalışmalar temel antioksidan savunmanın süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimler tarafından yapıldığını ortaya koymuştur (Mutoh ve diğ., 1995; Nakagawa ve diğ., 1999; Ohmiya ve diğ., 1999).

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit radikal anyonunu daha az toksik olan hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürür.



SOD enzimi oksidatif strese karşı geliştirilen savunmanın ilk adımıdır.

Katalaz (CAT)

Hücre sel detoksifikasyonda ikincil etkili enzim olan katalaz H₂O₂'yi su ve oksijene çevirir. Katalaz iki işlevli bir enzimdir.

1. Katalitik aktivite: H₂O₂'nin su ve oksijene dönüştürülerek yıkılması.



2. Peroksidatif aktivite: Metanol, etanol, formik asit, fenoller gibi H vericilerinin 1 mol hidrojen peroksitle reaksiyona girerek oksitlenmesi.



Hangi reaksiyonun öncelikli olacağı H vericilerinin derişimine ve sistemde üretilen H₂O₂'nin miktarına bağlıdır.

Glutasyon Peroksidaz (GSHPX)

H₂O₂ detoksifikasyonunda iş gören selenyum içeren glutasyon peroksidaz (GSHPX), indirgenmiş glutasyonu H₂O₂ ile oksitleyerek oksitlenmiş glutatona (GSSG) dönüştürür. Bu reaksiyon sırasında H₂O₂ de suya indirgenmiş olur.



2.3.1. *S. pombe*'de Stres İndüklü Sty1 MAP Kinaz Yolağı

Füzyon maya *S. pombe*, bileşenleri ekmek mayası *S. cerevisiae*'daki HOG yolağına büyük oranda benzerlik gösteren (Gustin ve diğ., 1998), ozmotik şokta aktifleşen ve ozmo-adaptasyonda önemli genlerin anlatımını kontrol eden Sty1 MAP Kinaz yolağına sahiptir (Millar ve diğ., 1995; Shiozaki ve Russell, 1995, a; Degols ve diğ., 1996). Bazı benzerliklerle beraber çok önemli farklılıklar da bulunmaktadır, örneğin; HOG yolağı ozmotik şoka özgü yanıtlar verirken (Schüller ve diğ., 1994); Sty1 fosforilasyonu ve Sty1-bağımlı yanıt ozmotik artış, sıcaklık şoku, hidrojen peroksit ve diğer oksidatif stres ajanlarına maruz kalma , UV ışığı ve alkilleyici ajanlar, azot açlığı, karbon açlığı ve protein biyosentezini baskılayan anisomisin gibi birçok stres durumlarında iş görebilir (Millar, ve diğ., 1995; Shiozaki ve Russell 1995, a; Shiozaki, ve Russell, 1996; Gaits, F., ve diğ., 1997; Samejima ve diğ., 1997; Shieh, ve diğ., 1997; Shiozaki ve diğ., 1997). Bu yönüyle Sty1 yolağı ekmek mayasındaki HOG yolağından çok, memelilerdeki stresle aktifleşen yollara daha çok benzerlik göstermektedir (Degols ve diğ., 1996).

Yapılan değişik çalışmalarda Sty1 yolağının mitoz bölünme aktivatörü olduğu açıkça ortaya konmuştur. Sty1 yolağı bloke edilmiş mutantlarda bölünme siklusunun G₂ evresinde tıkanmaların oluştuğu ve yabani türe oranla mitozun iki kat geç işlediği gözlenmiştir. Diğer taraftan, Sty1 yolağı aşırı indüklenmiş mutantlarda ise hücrenin mitoz olgunlaşmadan girdiği ve yabani türe göre mitoz süresinin de kısaldığı gözlenmiştir (Warbrick ve Fantes, 1991; Millar ve diğ., 1992; Millar, ve diğ., 1995; Shiozaki ve Russell 1995, a; Shiozaki ve Russell 1995, b). Sty1⁺ geni mutasyona uğratıldığında değişik stres fenotipleri ortaya çıkmaktadır. Örneğin; yüksek ozmolaritedeki besiyerinde büyüyemiyor; sıcaklık, oksidatif stres ve UV ışığına hassaslaşıp çoğalmak için eşleşemiyor (Degols ve diğ., 1996; Degols ve Russell, 1997; Kato ve diğ., 1996; Millar ve diğ., 1995; Shiozaki ve Russell, 1995, a; Shiozaki ve Russell, 1996).

Ayrıca, Sty1 yolağı farklı eşem türündeki füzyon mayaların eşleşmesinde gereklidir. Füzyon maya azot açlığında, feromonlar salgılayarak, eşeyli üremeye yönlendir (Yamamoto, 1996).

Sty1 Aracılı Transkripsiyonel Yanıt

Üç transkripsiyon faktörü Sty1 yolağı ile oluşan yanıtta aracı olmaktadır: Atf1 -bZIP faktörü- (Takeda ve diğ., 1995; Wilkinson ve diğ., 1996), Pap1 (Toda ve diğ., 1991; Toda ve diğ., 1992) ve Prr1 -yanıt düzenleyicisi- (Ohmiya, ve diğ., 1999; Ohmiya, ve diğ., 2000).

S. pombe'nin Sty1 yolağında; transkripsiyon faktörü olan Atf1, nükleusta Sty1 kinazların toplanması için gereklidir (Gaits, F., ve diğ., 1998). Sty1-bağımlı transkripsiyonel aktivatör olan Atf1 baskılayıcı ajan olarak iş görmektedir (Degols ve Russell, 1997).

2.4. *Schizosaccharomyces pombe*

İlk kez Lindner (1893)'in bir Doğu Afrika birasında varlığını saptadığı bu maya türünün yabani ırkı Osterwalder (1924) tarafından Güney Fransa'daki üzüm sularından izole edilmiş ve genetik çalışmalarda ilk kez Leupold (1950) tarafından kullanılmıştır. Ascomycetes mantar olan *S. pombe*, füzyon maya, kolayca manipüle olabilen tek hücreli, haploid organizma olup, kompleks ökaryotik organizmalarda bulunan korunmuş birçok gen ve metabolik yolağı içermektedir (Bahler, J., ve Wood V., 2006). 2002 yılında genom dizisi tamamlanan *S. pombe* üç kromozoma sahip ve genom boyutu yaklaşık 13.8 Mb büyüklüğündedir (Wood ve diğ., 2002). Patojen olmaması, jenerasyon süresinin kısa olması (2-4saat), laboratuvar koşullarına kolay adaptasyon göstermesi, düzenli bir şekilde sahip olması, hücre döngüsü evrelerinin (G1, S, G2 ve M) iyi bir şekilde gözlemlenebilmesi, memeli genom boyutunun % 1 ' inden az genom boyutuna sahip olması ve özellikle hastalıklarla ilgili genler bakımından insan genomu ile yüksek homoloji göstermesi açısından çok kullanışlı bir model organizmadır. Hücre bölünmesi

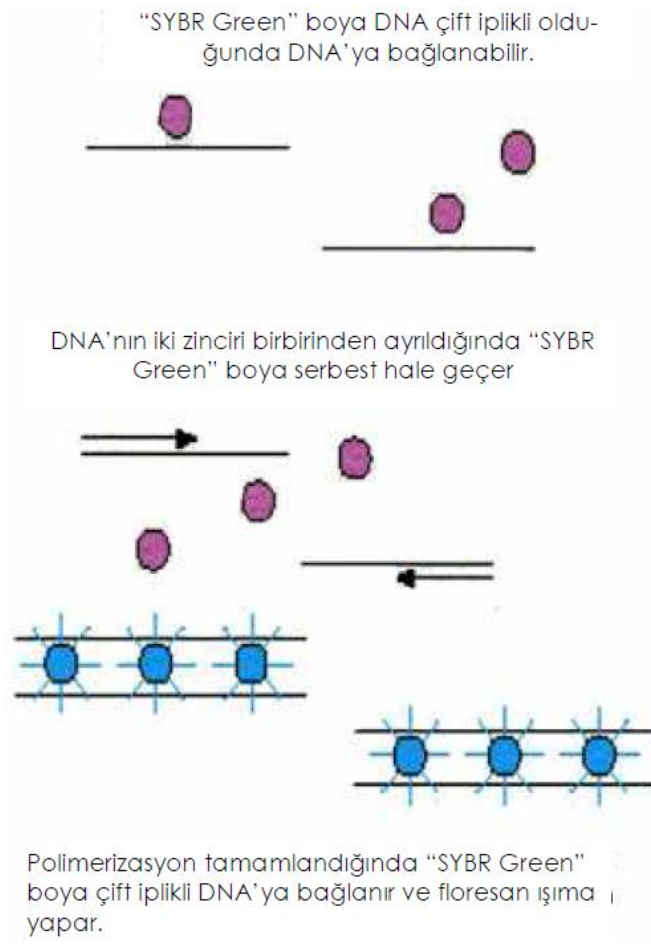
insan dahil diğer ökaryotlarda da benzer mekanizmalarla gerçekleştiğinden bu süreçle ilgili *S. pombe*'de elde edilen bulgular insan hücresine kolaylıkla uygulanabilmektedir (Egel, 2004; Bahler, J., ve Wood V., 2006; Beskow, A., ve Wright, A. P. H., 2006). Son zamanlarda, glukoz metabolizması (Lin ve Defossez, 2000) ve oksidatif stres yanıtının moleküler mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalarda da sıklıkla kullanılmaktadır (Lin ve diğ., 2002; Chen, D. ve diğ., 2003; Chen, D. ve diğ., 2008).

2.5. GERÇEK-ZAMANLI PZR

Gerçek zamanlı PZR (GZ PZR), genel olarak çalışılan biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürmek için laboratuvar çalışmalarında popüler olmuş bir polimer zincir reaksiyonu (PZR) çeşididir (Kubista ve diğ., 2006).

Gerçek zamanlı PZR'da oluşan ürün miktarı, reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve problemlerin verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılır. Çift zincirli DNA'ya bağlanan "SYBR-Green I" floresan boya bu PZR'da kullanılan en yaygın ve basit metottur. "SYBR-Green I" boya ile belirleme çok iyi işleyen bir metottur ve ancak reaksiyon ortamında herhangi bir çift zincirli DNA bulunduğunda floresan ışımaya yapabilir (Şekil 2.5).

Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında "SYBR Green I" yöntemi kullanılır. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak "real-time" PZR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar. "SYBR Green I" en fazla kullanılan boya çeşididir ve 497 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenir. Çift sarmal DNA'nın küçük oluşuna bağlanan boya 30 amplifikasyon döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin % 6'sını kaybeder (Kubista ve diğ., 2006).



Şekil 2.5: "SYBR Green I" yöntemi (van Der Velden ve diğ., 2003).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ORGANİZMALAR

Çalışmada, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü *Schizosaccharomyces pombe* kültür koleksiyonundan Linder *liquifaciens*'in yabani tipi (972 h) ile glukoz baskılamasına dirençli invertaz mutantları (*ird11*) (Kiğ ve ark., 2005) kullanıldı. Kültür koleksiyonundan kendi çalışmamızda kullandığımız maya soylarına ait özellikler Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan *S. pombe* ırklarının özellikleri

Irklar	Özellikler
<i>S. pombe 972h</i>	Yabani ırk
<i>S. pombe ird11h</i>	Glukoz baskısına dirençli mutant ırk

3.2. BESİ ORTAMLARI

Çalışmada organizmaların üretilmesinde kullanılan besi ortamlarının içerikleri Tablo 3.2 ve Tablo 3.3' te verildi. Organizmanın üretilmesinde maya özütlü zengin besi ortamı olan YEL ile özel bazı deney koşullarının sağlanabilmesi için de minimal besi ortamı olan MML besiyerleri kullanıldı.

Tablo 3.2: *S. pombe* ile çalışmada kullanılan besi ortamları

Besi ortamı	İçerik
Maya özütü zengin sıvı besi ortamı (YEL)	Maya özütü 5 g/l Glukoz 30 g/l
Maya özütü zengin katı besi ortamı (YEA)	YEL besi ortamına Agar eklendi 20 g/l
Minimal sıvı besi ortamı (MML)	Stok A ₂ * 100 ml/l Stok 3a* 1 ml/l Stok 3b* 1 ml/l Glukoz 10 g/l Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O 1 g/l
Minimal katı besi ortamı (MMA)	MML besi ortamına Agar eklendi 20 g/l
YEL-G+2-DOG+Suc (Rincon ve diğ., 2001)	Maya özütü 5 g/l 2-deoxy-D-glucose (2-DOG) 400 mg/l Sukroz 25 g/l

Tüm besi ortamları otoklavda 121°C’de (1 atmosfer basınçta) 20 dakika tutularak steril edildi. (*İçerikleri Tablo 3.3’te verildi)

Tablo 3.3: MML besi ortamının hazırlanmasında kullanılan stok çözeltiler

Stok	İçerik(mg/l)
A ₁	H ₃ BO ₄ 5.40
	CuSO ₄ .5H ₂ O 0.40
	KCl 1.00
	FeCl ₃ .6H ₂ O 2.00
	MnSO ₄ .4H ₂ O 5.30
	Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O 1.95
	ZnSO ₄ .7H ₂ O 4.00
A ₂	KH ₂ PO ₄ 100
	MgSO ₄ .7H ₂ O 50
	NaCl 10
	CaCl ₂ .6H ₂ O 15
	(NH ₄) ₂ SO ₄ 500
	Stok A ₁ 0.10
3a	Kalsiyum pantotenat 10
	Nikotinik asit 100
	Mezo-inositol 100
3b	Biotin 100 (%50 etanol içerisinde)

3.3. ORGANİZMALARIN ÜRETİLMESİ VE SAKLANMASI

S.pombe ırklarının üretilmesi ve saklanması için Gutz ve diğ., (1974) ile Moreno ve diğ., (1990)'nin önerdikleri standart yöntemler kullanıldı. -80 °C'de saklanan *S.pombe* stoklarından alınan 20 µl örneklerin, 5 ml YEL besi ortamında 1-2 gece çalkalamalı

etüvde (30 °C, 180 devir/dakika) üretilmesiyle elde edilen doymuş kültürler, YEA besi ortamına öze ile azaltma ekimi ile aktarılıp 30 °C'de 3 gün üretildi. Irkların genotiplerinde herhangi bir değişimin olup olmadığını görmek için, tek düşen kolonilerden rastgele alınan örnekler seçici besi ortamlarına (Mutant için YEA-G+2DOG+suc, yabancı tip için MMA) aktarılıp aynı koşullarda üretildiler. Çalışma boyunca kültürler 4 °C'de saklandı ve 3-6 ayda bir saflık kontrolleri yapıldı.

3.4. OKSİDATİF STRES UYGULAMA

S. pombe yabancı ırk (972 h⁻¹) ve *ird11* mutant hücreleri 30 ml YEL besi ortamında 30°C'da, 180 devir/dakika hızda çalkalamalı etüvde logaritmik evrenin ortalarına kadar (972 h⁻¹ için 13. ve *ird11* için 16. Saat) üretildiler (Kiğ ve diğ., 2005). Hücrelerden kontrol ve deney grubu için 10'ar ml alındı. Kontrol grubuna hiçbir uygulama yapmazken, deney grubuna 2mM H₂O₂, 30°C'da, 180 devir/dakika hızda çalkamalı etüvde 1 saat süre ile uygulandı (Pekmez ve diğ., 2008). Kontrol ve deney grupları 4.000 devir/dakika hızda, 4 dakika santrifüj edilerek toplandı ve 2 kez steril saf su ile yıkandı.

3.5. HÜCRE PARÇALAMA VE TOTAL RNA İZOLASYONU

Oksidatif stres uygulanan ve uygulanmayan hücre çökeltileri ile minimal besi ortamında üretildikten sonra saf su ile iki kez yıkanan hücre çökeltileri 200 µl'lik fosfat tamponunda (PBS) süspansiyon haline getirildi ve üzerlerine hücrelerin mekanik olarak parçalanmasını kolaylaştırmak için 0,2 g asitte yıkandıktan sonra steril edilmiş, cam boncuk (0,5 mm çaplı) ve 2-3 adet demir bilye (Sartorius, 1 mm çaplı) eklendi. Sonra bu hücreler 3.000 devir/dakika hızda toplam 3 dakika olmak üzere 1 dakika buz bir dakika parçalama işlemine tabi tutuldu. Parçalanmış hücrelerin yaklaşık %80-90'ının sferoplast haline geçip geçmediği ışık mikroskopunda 40X büyütmede kontrol edildi. Mekanik parçalama ile elde edilen hücre lizatından total RNA izole etmek için "Roche, High Pure RNA Isolation Kit" ticari kiti kullanıldı. Üst sıvı yeni santrifüj tüpüne aktarılıp üzerine 400 µl lizis/bağlanma tamponu eklendi ve 15 saniye karıştırıcıda tutuldu. Karışım, bir toplama tüpünün içine yerleştirilmiş olan filtreli tüpe aktarıldıktan

sonra oda sıcaklığında 10.000 devir/dakika hızda 15 saniye santrifüj edildi. Filtreden toplama tüpüne geçen sıvı atıldı. Filtreli tüpe 90 µl DNaz I inkübasyon tamponu ve 10 µl DNazI içeren karışım eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra filtreli tüpe 500 µl yıkama tamponu-I eklendi ve 10.000 devir/dakika hızda 15 saniye santrifüjlendi. Toplama tüpüne geçen sıvı atıldıktan sonra filtreli tüpe 500 µl yıkama tamponu-II eklendi ve 10.000 devir/dakika hızda 15 saniye santrifüjlendi. Toplama tüpüne geçen sıvı yeniden atıldıktan sonra bu kez filtreli tüpe 200 µl yıkama tamponu-II eklendi ve 15.000 devir/dakika hızda 4 dakika santrifüjlendi. Filtreli tüp, 1.5 ml'lik boş bir mikro santrifüj tüpünün içine yerleştirildikten sonra 50 µl elüsyon tamponu eklendi ve 10.000 devir/dakika hızda 1 dakika santrifüjlendi. Alttaki tüpe geçen total RNA çözültisi küçük hacimlere bölünerek -20 °C'de saklandı.

3.6. TOTAL RNA'NIN ELEKTROFORETİK VE SPEKTROFOTOMETRİK ANALİZİ

RNA'ların elektroforetik analizi için 1xTAE tamponunda hazırlanan %1'lik agaroz jel, 2 dakika mikrodalga fırında (100 °C) tutularak tamamen eritildi. 55-60 °C'ye kadar soğutuldu ve son konsantrasyonu 0.5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür (EtBr) eklendikten sonra jel karışımı yatay jel kasetine döküldü. Jelin polimerizasyonu gerçekleşikten sonra 0.1 hacim yükleme tamponu ilave edilerek hazırlanan RNA örnekleri 3'er µl olarak jele uygulandı. Elektroforez işlemi 1xTAE tamponu içeren yatay elektroforez tankında (E.C. Minicell EC 370M) yaklaşık 45 dakika, 55V/70 mA akımda gerçekleştirildi.

Total RNA'nın elektroforetik analizinde kullanılan tamponlar ve çözültüler Tablo 3.4'de verilmiştir.

RNA konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla örnekler spektrofotometre cihazında ("Nanodrop 2000 Spectrophotometer", Thermo Scientific) 260–280 nm dalga boyundaki absorbanları ayrı ayrı ölçüldü. RNA konsantrasyonları "RNA (µg/ml) = $A_{260} \times \text{sulandırım katsayısı} \times 40$ " formülü kullanılarak hesaplandı. A_{260}/A_{280} oranı dikkate alınarak da saflık dereceleri belirlendi.

Tablo 3.4: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar ve çözeltiler

Tampon ve Çözeltiler	İçerik
Tris-asetat (TAE) tamponu (50x) (toplam hacim: 1 litre)	Trizma Base 242 g
	Glasiyal asetik asit 57.1 ml
	0.5 M EDTA (pH 8.0) 100 ml
Etidium Bromür (EtBr)	Etidium Bromid (EtBr) 10 mg/ml

3.7. cDNA SENTEZİ

RNA moleküllerinden cDNA sentezi ticari bir kit (“Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit”, Roche) kullanılarak yapıldı. Bu süreçte üretici firmanın önerileri izlendi. Yaklaşık 11.4 µl’lik sentez reaksiyonu için; 2 µg total RNA için nanodrop ölçümlerine bağlı olarak 1.9-3.7 µl’lik total RNA, 1 µl “Anchored-oligo (dT₁₈)” primer ve üzerini ultra saf su ile tamamlanarak 65 °C 10 dakika bekletildi. Üzerine; 0,5 µl “Protector” RNaz inhibitör, 1.1 µl “Transcriptor HighFidelR” enzim, 2 µl dNTP karışımı (her biri 10 mM), 1 µl DTT ile 4 µl tampon eklenip 55 °C’de 30 dakika ve 85 °C’de 5 dakika bekletildi. Çalışma esnasında örnekler buzda tutuldu. Reaksiyon ürünlerinden alınan 3 µl örnek %1,5’lik agaroz jelde kontrol edildi. Ardından buzda soğutulan örnekler -20°C’de saklandı.

3.8. GERÇEK-ZAMANLI PZR

Tiamin biyosentez ve transportu ile genlerinin farklı koşullardaki anlatım profillerindeki değişim “SYBR Green” temeline dayalı Gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ PZR) yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu da “Roche 480” cihazı kullanarak yapıldı.

Gerçek-zamanlı PZR uygulamasında sonuçların normalizasyonu için referans gen olarak *S.pombe*’nin aktin (*act1*) geni kullanıldı (Johnsson ve diğ., 2006). Gen anlatım düzeyindeki değişimler, her bir reaksiyonun o andaki verimine bağlı olarak, hedef gen

için elde edilen çevrim sayısının (eşik çevrim, “crossing threshold”, Ct) referans gen için ölçülen çevrim sayısına oranlanması temeline dayanan Pfaffl denklemine göre hesaplandı (Pfaffl, 2001).

Bu tezde, üzerinde çalıştığımız genlere özgü primerler “Primer 3” programı kullanılarak tasarlandı (Tablo 3.5). Reaksiyonlar “FastStart SYBR Green Master Kit (Roche)” ticari kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Üzerinde çalıştığımız yedi gene özgü üretilen primerlerin dizisi Tablo 3.5’de verilmiştir. Primerlerin yaklaşık olarak 20 bç uzunluğunda, Tm değerlerinin 60 °C civarında ve % GC değerlerinin de 40-50 aralığında olmasına özen gösterildi. Primerlerin birbirlerinin tamamlayıcısı olmamalarına ve PZR ürünlerinin yaklaşık 100-120 bç uzunluğunda olmasına dikkat edildi. Primer tasarımı yaparken Primer 3 yazılımı kullanıldı (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Primerlerin sentezi “IDT Integrated DNA Technologies” tarafından yapıldı.

Reaksiyon karışımı 0,3’er µl primerler (ileri, geri), 10 µl SYBR Green master mix karışımı, 1 µl cDNA ve son hacim ultra saf su ile 20 µl’ye tamamlanarak hazırlandı.

Tablo 3.5: Gerçek-zamanlı PZR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin dizileri (P1: SPAC17A2.01, *bsu1*; P2: SPAC23H4.10c, *thi4*; P3: SPBC26H8.01, *thi2*; P4: SPBP4G3.02, *pho1*; P5: SPBP8B7.18c, *TENA/THI* ailesi proteinin geni; P6: SPCC18B5.05c, fosfometilprimidin kinaz (predicted) geni; P7: SPCC1223.02, *thi3*, *nmt1*.)

		Primer dizileri	% GC oranı	Tm (°C)
P1	SPAC17A2.01F	5'-GCCCCGTTTACTTTTGTTCCTCA-3'	45	53,7
	SPAC17A2.01R	5'-GCAACACCGATGATGAAATG-3'	45	52,3
P2	SPAC23H4.10cF	5'-GTGATGGGTGTAACGGCTTC-3'	55	56
	SPAC23H4.10cR	5'-GAGTTTTTCGCTTCCACTGC-3'	50	54,7
P3	SPBC26H8.01F	5'-CCCATTGGTTGTTTCTGCT-3'	45	53,8
	SPBC26H8.01R	5'-CGCATGTCGTGAAGGTTAGA-3'	50	54,9
P4	SPBP4G3.02F	5'-AGCATTGACTTTCCACCAC-3'	50	55,6
	SPBP4G3.02R	5'-ATTCCAACAGCATCGAAAGC-3'	45	53,8
P5	SPBP8B7.18cF	5'-GCAGCCCTGAAATCGTTAAG-3'	50	54,1
	SPBP8B7.18cR	5'-CGAGAGAATCCCCAGAAGTG-3'	55	54,8
P6	SPCC18B5.05cF	5'-GACGGCCGATCTGATTTATG3'	50	53,4
	SPCC18B5.05cR	5'-TGGCAGCTGTAAGAGAGCAA-3'	50	56,5
P7	SPCC1223.02F	5'-TCCCCAGAGATTGGAACAAG-3'	50	54,3
	SPCC1223.02R	5'-GGTCAAGTTCCAGGTCAAG-3'	55	55,5

3.8.1. GZ-PZR Koşulları

Reaksiyon koşulları ve cihaz ayarları kitte önerildiği biçimde, kullanılan primerlerin Tm

değerleri ve uzunluğu gibi bazı özellikler dikkate alınarak düzenlendi. Buna göre,

uygulama aşamaları aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi (Tablo3.6).

Tablo 3.6: PZR koşulları

Reaksiyon ařaması	Sıcaklık	Süre
Ön inkübasyon	95°C	10 dakika
Çođaltım (45 döngü)	95°C	10 saniye
	53°C	7 saniye
	72°C	5 saniye
Veri toplama	sadece çođaltım sonunda (“acquisition mode:single”)	
Erime eğrisi Sıcaklık değişim hızı: 0,1°C/s Veri toplama modu: sürekli	95°C	5 saniye
	48°C	5 dakika
	95°C	5 saniye

3.8.2 GZ-PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Genlerin anlatım düzeyindeki değişimler, her bir reaksiyonun o andaki verimine bağlı olarak, deney grupları (P1-P7) için elde edilen Ct (‘crossing threshold’) değerlerinin, referans gen (aktin) için aynı koşullarda ölçülen Ct değerlerine oranlanması temeline dayanan PFAFFL denklemine göre hesaplandı (Pfaffl, 2001). PFAFFL denklemi Şekil 3.1’de verilmiştir. Deneylerden elde edilen sonuçların istatistik analizi ‘Graphpad Ver.5’ yazılımı ile yapıldı.

$$\text{oran} = \frac{(E_{\text{hedef}})^{\Delta\text{Ct hedef (kontrol-deney)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{Ct ref (kontrol-deney)}}$$

Şekil 3.1: PFAFFL denklemi.

E: PZR'nin verimi. Her bir PZR için ayrı ayrı hesaplanmakta olup teorik olarak 2 olması gerekir.

$\Delta\text{Ct hedef}$: Hedef gen için, kontrol ve deney koşullarında saptanan Ct (anlamli artışın saptandığı çevrim sayısı) değerlerinin farkı.

$\Delta\text{Ct referans}$: Referans gen olarak kullanılan gen için, kontrol ve deney koşullarında saptanan Ct değerlerinin farkı.

4. BULGULAR

4.1. TİAMİN METABOLİZMASINA DAHİL OLAN GENLERİN ANLATIMLARININ SAPTANMASI

Tiamin içeren (zengin besiyeri) ve içermeyen (minimal besiyeri) büyüme ortamlarında üretilen *S.pombe*'nin 972 h yabani ırkı ve *ird11h* mutantında, tiamin biyosentez yolağında görev alan genlerin anlatım profilleri kantitatif gerçek-zamanlı PZR kullanılarak incelendi. Aynı zamanda, oksidatif stresin ele alınan genlerin anlatımları üzerine etkileri de araştırıldı.

4.1.1. Total RNA'nın İzolasyonu

Bölüm 3.6.'da açıklandığı üzere "Roche, High Pure RNA Isolation Kit" ticari kiti ile total RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen total RNA moleküllerinin kalitesi % 1'lik agaroz jelde kontrol edildi ve izolasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği tespit edildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Total RNA izolasyonlarının agaroz jel elektroforezi. 1) *S. pombe* 972h yabani ırk; 2) *S. pombe* *ird11*.

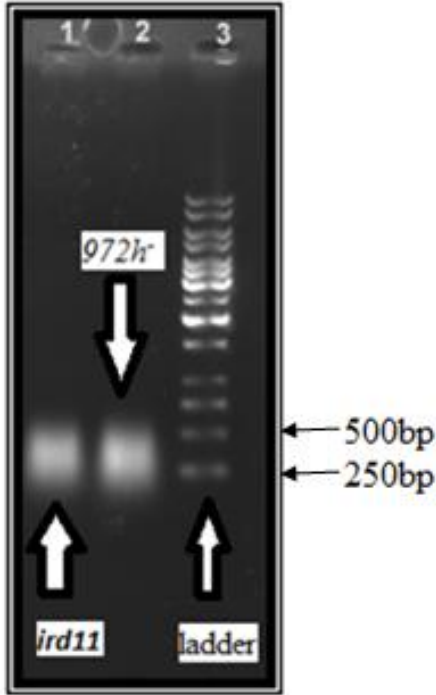
Örneklere ait spektrofotometrik ölçümlerden elde edilen total RNA miktarları Tablo 4.1'de verildi.

Tablo 4.1: Kontrol ve deney gruplarına ait total RNA miktarları

Örnekler	RNA konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\mu\text{l}/10^6$ hücre)	Absorbans (260/280)
972 h kontrol	1917,2	2,23
972 h MML	2110,9	2,22
972 h HP	1189,3	2,24
<i>ird11</i> kontrol	1850,4	2,24
<i>ird11</i> MML	1074,8	2,24
<i>ird11</i> HP	1234,5	2,22

4.1.2. cDNA Sentezi

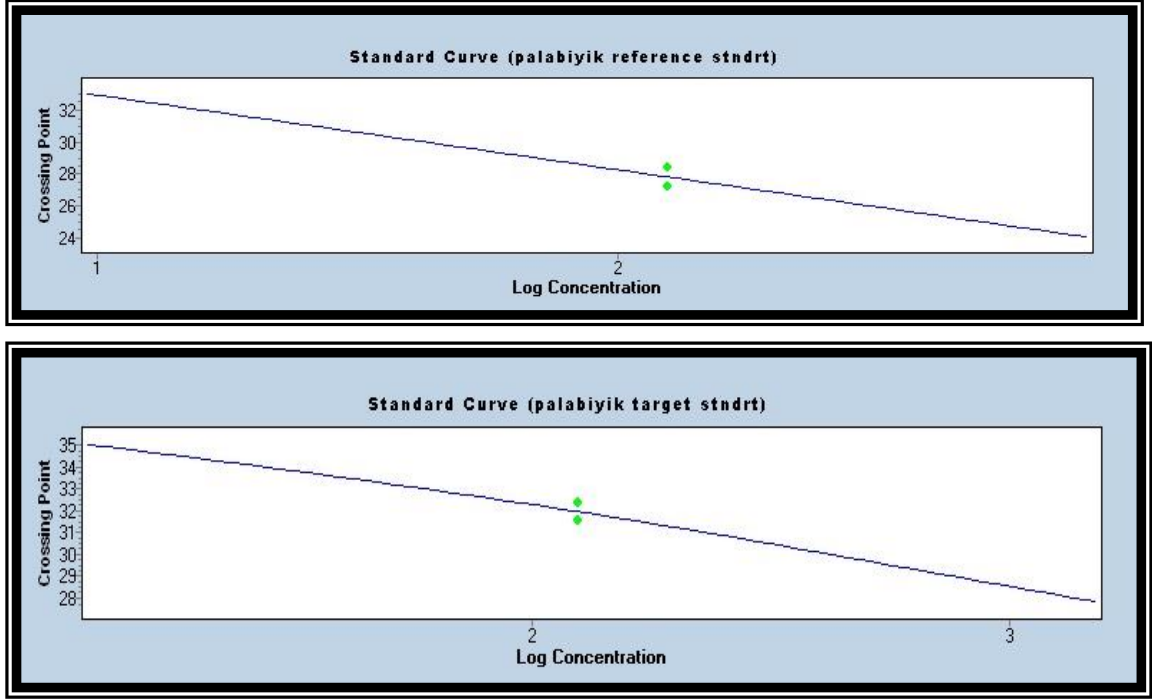
3.7. bölümde açıklandığı gibi yabancı ırk ile *ird11* mutant ırkının üç farklı ortamda (kontrol, MML ve HP) toplamda 6 farklı total RNA'nın cDNA'sı elde edildi. Reaksiyon ürünleri %1,5'lik agaroz jelde kontrol edildi. Kontrol grubuna ait cDNA sentez reaksiyonlarında elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2: cDNA sentezi ürünlerinin agaroz jel elektroforezi. 1) *S. pombe* 972h; 2) *S. pombe ird11 h*; 3) fermentaz 100bp ladder. (bp: baz çifti)

4.1.3. Gerçek-Zamanlı PZR

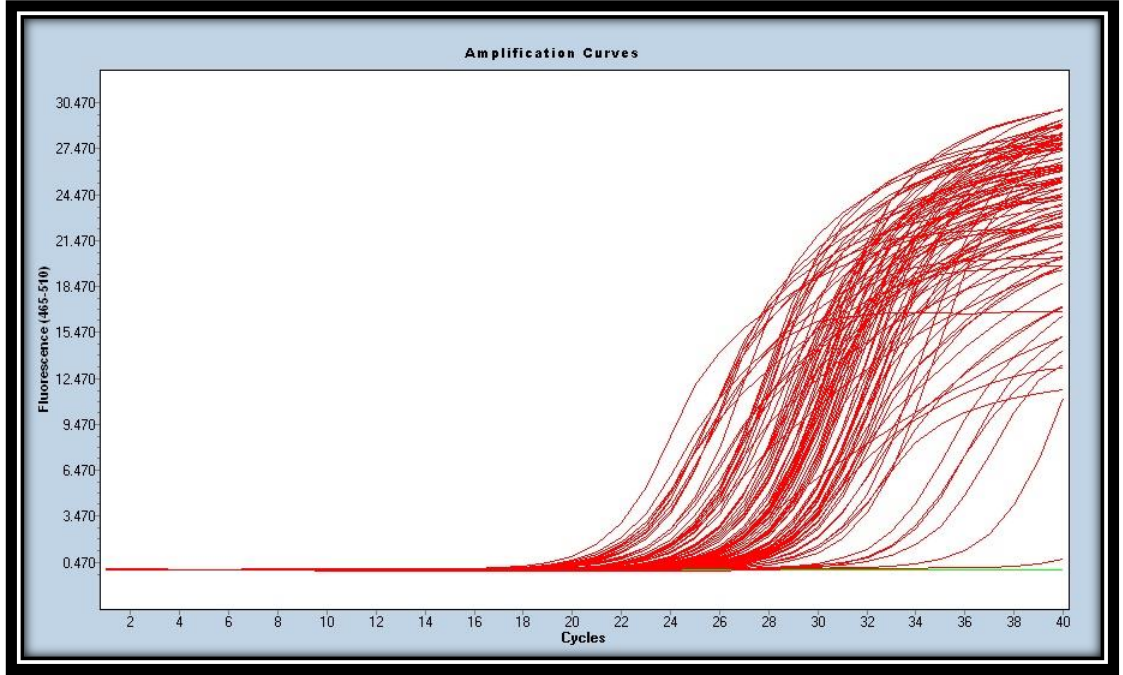
Tiamin metabolizmasına ait yedi genin (SPAC17A2.01, SPAC23H4.10c, SPBC26H8.01, SPBP4G3.02, SPBP8B7.18c, SPCC1885.05c, SPCC1223.02) anlatım düzeylerindeki değişimlerin sınanması ve nicel olarak değerlendirilmesi, SYBR Green temeline dayalı GZ PZR yöntemiyle, göreceli anlatım düzeyleri karşılaştırılarak yapıldı. Anlatım değişimleri araştırılan yedi gen (Tablo 3.5) için ölçülebilir çoğalmanın saptandığı çevrim sayılarına (eşik çevrim, "threshold cycle", C_t) göre çizilen grafiklerle standart logaritmik artış eğrileri elde edildi. Bu eğrilerden, her bir reaksiyonun verimi ("efficiency", E) cihaza ait yazılım tarafından otomatik olarak hesaplandı. Örnek olarak act1 ve P1 (SPAC17A2.01) genleri için elde edilen standart eğriler Şekil 4.3'de verildi. Teorikte 2 olması gereken E değerlerinin (Pfaffl, 2001) referans gen dahil yedi gen için gerçekleştirilen reaksiyonlarda ciddi bir sapma göstermeden 2 civarında olduğu tespit edildi.



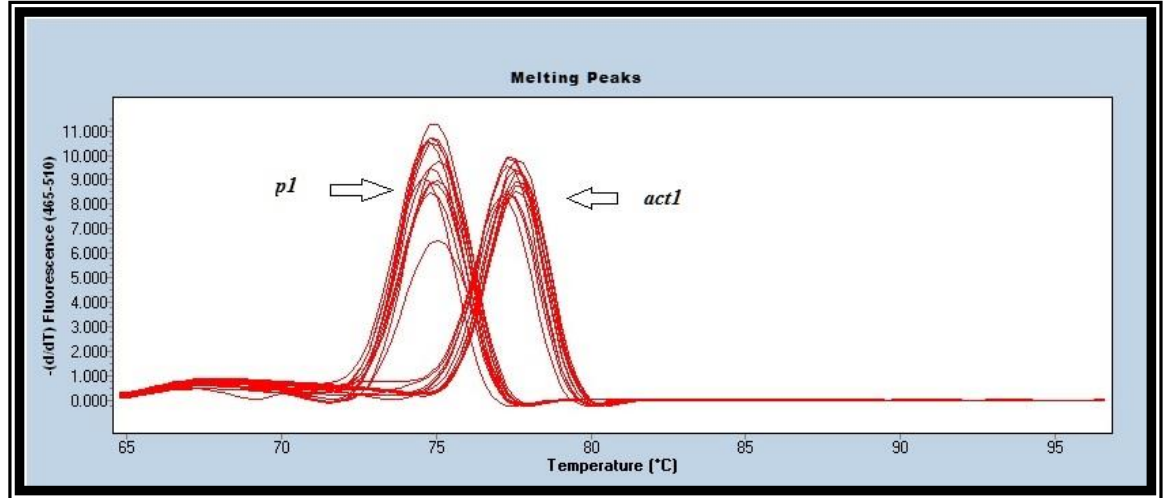
Şekil 4.3: Referans ve bir hedef genlere ait reaksiyon verimini gösteren standart eğriler.

Referans gen olarak kullanılan aktin (*act1*) genine ve anlatımları karşılaştırılacak genlere ait primerlerin kontrol edilmesi, elde edilen sonuçların değerlendirilmesi ve reaksiyon koşullarının optimize edilmesi amacıyla kullanılmak üzere cDNA molekülleri hazır hale getirildi. GZ-PZR çoğalma eğrileri incelendiğinde tüm genlerin çoğaltımı 22-24. çevrimlerden sonra başladığı gözlenmiştir (Şekil 4.4).

Tüm reaksiyonların sonunda erime eğrisi grafikleri incelendiğinde, floresans ışımaya şiddetindeki artışların özgün olarak tek bir hedef DNA dizisinin çoğaltılmasından kaynaklandığı, herhangi bir kontaminasyon veya primerlerin yanlış bağlanmasından ileri gelen farklı çoğalmaların olmadığı saptandı. Örnek olarak, *act1* ve P1 reaksiyonları için elde edilen erime eğrisi grafiği Şekil 4.5’de verildi. Bu genler için gerçekleştirilen reaksiyonlarda birer tane net tepe noktası elde edildiği görüldü. Reaksiyonlarda meydana gelen çoğalmaların özgünlüğünün doğrulanmasında önemli bir kontrol olan erime eğrileri, cihaza ait yazılım tarafından otomatik olarak çizilmektedir.



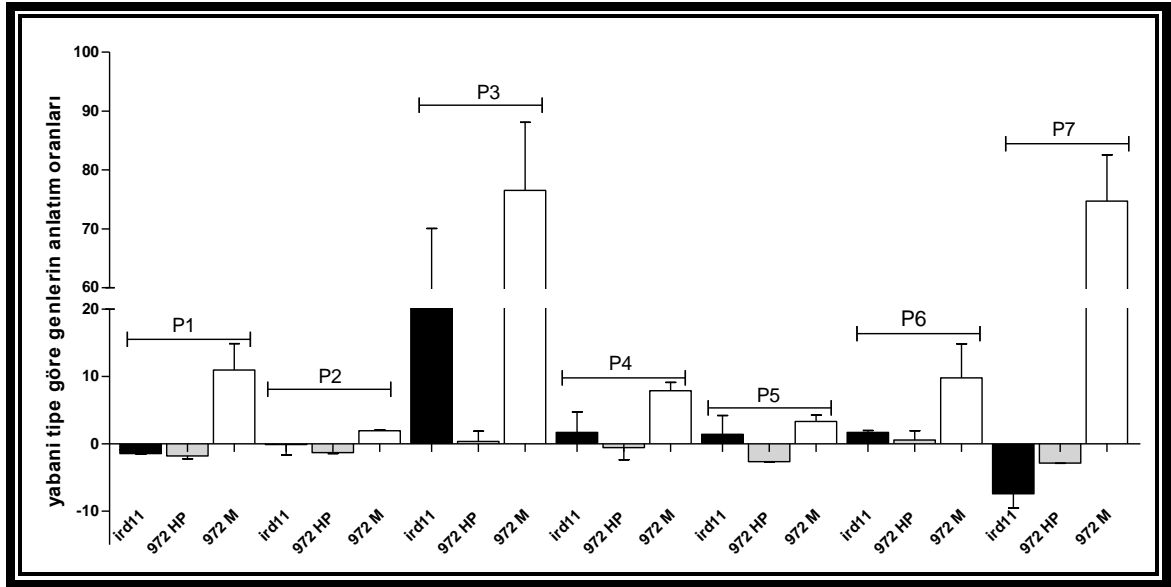
Şekil 4.4: P1-P6 genleri için belirlenen C_t değerleri.



Şekil 4.5: P1 (74.94) ve *act1* (77.26) genleri için elde edilen erime eğrileri.

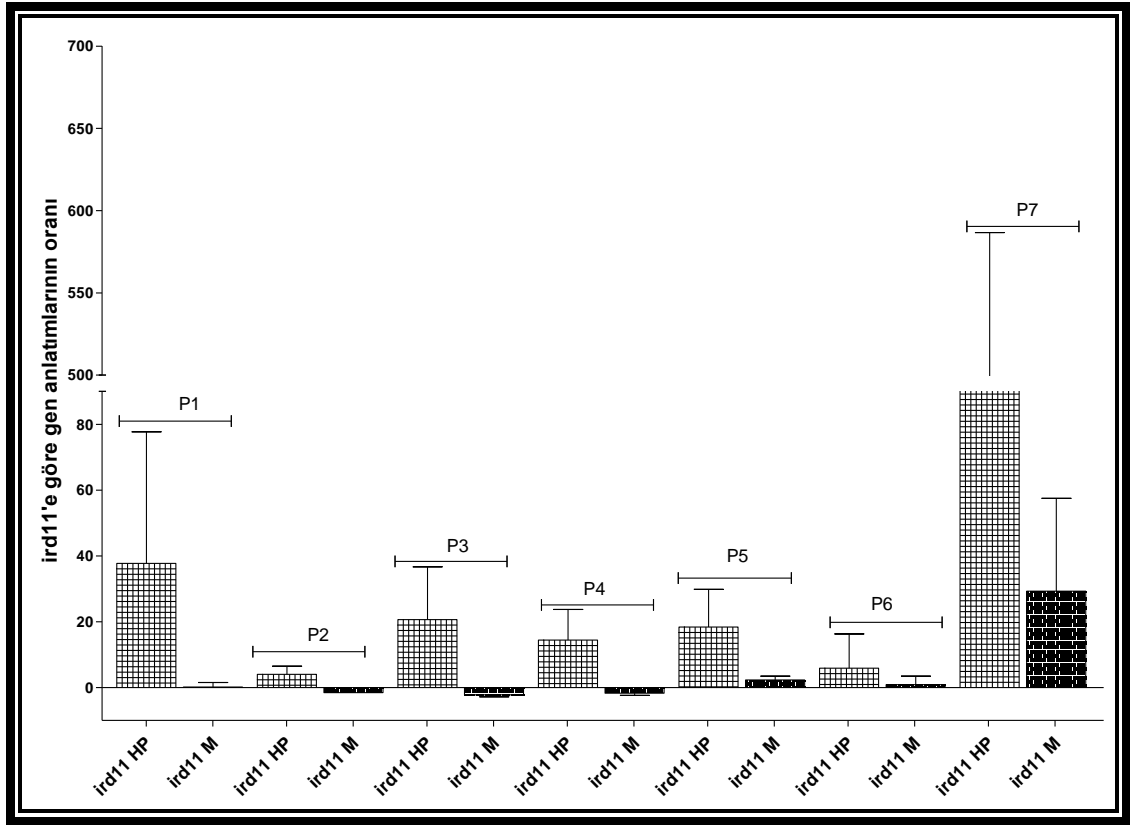
Araştırılan genlerin anlatım düzeylerindeki göreceli değişimler, GZ- PZR'nin verimine bağlı olarak farklı koşullarda (kontrol, HP ve MML) elde edilen C_t değerlerinin, referans gen, *act1*, için aynı koşullarda saptanan değerlere oranlanması temeline dayalı PFAFFL formülüne göre hesaplandı (Bölüm 3.8). Tüm deney koşulları iki kopyalı ve farklı zamanlarda hazırlanmış olan kalıp cDNA'lar kullanılarak en az iki tekrarlı yapıldı.

Şekil 4.6'da tiamin metabolizmasına dahil olan genlerin normal koşullarda üretilen *ird11*'deki (*ird11*) ve farklı koşullarda üretilen 972 h'deki (972 h^{HP} ve 972 h^M) anlatımlarının normal koşullarda üretilen yabani (972 h) ırktaki anlatımlarına oranları verilmektedir. Burada tiamin metabolizmasına dahil olan tüm genlerin minimal ortamda üretilen yabani ırkta belirgin bir şekilde anlatım seviyelerinin arttığı tespit edildi. Özellikle de tiamin fosfat dipirofosforilaz / hidroksietiltiazol kinaz enzimini şifreleyen *thi2* ve 4-amino-5-hidroksimetil-2-metilpirimidin fosfat sentaz Nmt1 enzimini şifreleyen *thi3* genlerinin yaklaşık 80 kat arttığı görülmüştür. Oysa oksidatif stres uygulanan yabani ırkta söz konusu genlerin anlatım seviyelerinin düştüğü belirlenmiştir. Normal koşullarda üretilen *ird11*'de *thi2* geninin anlatımı yabani ırkına göre belirgin bir şekilde artarken *thi3* geninin anlatımının da düştüğü saptanmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: Tiamin metabolizmasına dahil olan genlerin yabani tip (972h) ile karşılatırmalı olarak anlatım profilleri. P1: SPAC17A2.01, *bsu1*; P2: SPAC23H4.10c, *thi4*; P3: SPBC26H8.01, *thi2*; P4: SPBP4G3.02, *pho1*; P5: SPBP8B7.18c, *TENA/THI* ailesi proteininin geni; P6: SPCC18B5.05c, fosfometilprimidin kinaz (predicted) geni; P7: SPCC1223.02, *thi3*, *nmt1*. HP: Normal koşulda üretildikten sonra hidrojen peroksit uygulanmış örnek; M: Minimal ortamda üretilmiş örnek.

Şekil 4.7’de tiamin metabolizmasına dahil olan genlerin farklı koşullarda üretilen *ird11*’deki (*ird11HP* ve *ird11M*) anlatımlarının normal koşullarda *ird11*’deki (*ird11*) anlatımlarına oranları verilmektedir. Oksidatif strese maruz bırakılan *ird11*’de (*ird11HP*) tüm genlerin anlatım seviyelerinin arttığı özellikle *thi3* geninin anlatımının çok yükseldiği (yaklaşık 500 kat) görüldü. Buna karşın, minimal ortamda üretilen *ird11* ırkında ilgili genlerin anlatımlarının yabancı ırktaki anlatımları kadar artmadığı tespit edildi (Şekil 4.7). Bu sonuç bize; *ird11* mutant ırklarının oksidatif strese karşı kullandıkları savunma mekanizmalarında tiamine ihtiyaç duyduklarını ve dolayısı ile bu kofaktörün biyosentez ve transportundan sorumlu oldukları bilinen genlerin anlatımlarının artmasının beklenen bir sonuç olduğunu düşündürdü.



Şekil 4.7: Tiamin metabolizmasına dahil olan genlerin *ird11* ile karşılaştırmalı olarak anlatım profilleri. P1: SPAC17A2.01, *bsu1*; P2: SPAC23H4.10c, *thi4*; P3: SPBC26H8.01, *thi2*; P4: SPBP4G3.02, *pho1*; P5: SPBP8B7.18c, *TENA/THI* ailesi proteinin geni; P6: SPCC18B5.05c, fosfometilprimidin kinaz (predicted) geni; P7: SPCC1223.02, *thi3*, *nmt1*. HP: Normal koşulda üretildikten sonra hidrojen peroksit uygulanmış örnek; M: Minimal ortamda üretilmiş örnek.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tiamin, hemen tüm organizmalarda enerji metabolizmasında kofaktör olarak görev yapmasının yanısıra lipit ve aminoasit metabolizmasında da görev yapan temel bir vitamindir (Friedrich, 1987; GianPietro ve Alessandro, 2007). Ayrıca, tiaminin hayvan hücrelerinde impuls iletimi, immün sistem aktivasyonu ve sinyalinde önemli rolü olduğu da bilinmektedir (Manzetti ve diğ., 2014).

Bu tez çalışması kapsamında, öncelikle, tiamin içermeyen koşullarda üretilen *S. pombe* yabani tipinde ve glukoz baskılamasına ve oksidatif strese karşı dirençli olan *S.pombe ird11* mutantında (Kig ve diğ., 2005; Palabiyik ve diğ., 2012), tiamin biyosentez ve transportuna dahil genlerin anlatım profilleri karşılaştırıldı. Tiamin biyosentez yoluna ilişkin genlerin anlatımlarının ortamdaki tiamin tarafından tamamen baskılandığı, buna karşın tiamin yokluğunda da anlatımlarının yüksek düzeyde arttığı bilinmektedir (Maundrell, 1990; Praekelt ve diğ., 1994, Nosaka, 2006). Ayrıca, *S. pombe*'de tiaminin, kendi metabolizmasında görevli *thi2*, *thi3*, *thi4*, *pho4* ve *car1* gibi birçok genin mRNA sentezini baskıladığı rapor edilmiştir (Schweingruber ve diğ., 1991). Tiamin içermeyen ortamda üretilen *S. pombe* yabani tip hücrelerinde *thi3* (P7) ve *thi2* (P3) genlerinin anlatımlarının diğer tiamin biyosentez ve transportu ile ilişkili genlerin anlatımlarına göre oldukça fazla arttığı (yaklaşık 70 kat) gözlemlendi (Şekil 4.6). *S. cerevisiae*'de tiamin yokluğunda yapılan mikroarray verilerinde, *thi3*'ün ortoloğu olan THI5 ve THI12 ile *thi2*'nin ortoloğu olan THI4 genlerinin anlatımlarının da çok yüksek bir düzeyde arttığı gözlemlenmiştir (Nosaka ve diğ., 2005). THI4 geni HET-P öncülü olan molekülü sentezlerken, THI5 ve THI12 genleri HMP-P öncülünü sentezlemektedir (Praekelt ve diğ., 1994; Wightman ve Meacock, 2003; Morett ve diğ., 2003). Ancak, *ird11* mutantında sadece *thi3* (P7) geninin anlatımının arttığı (yaklaşık 40 kat) tespit edildi (Şekil 4.7).

Bu tez kapsamında ikinci olarak, glukoz baskılamasına ve oksidatif strese karşı dirençli olan *S.pombe ird11* mutantı (Kig ve diğ., 2005; Palabiyik ve diğ., 2012) model olarak

kullanılarak, tiaminin oksidatif stres yanıtındaki rolü araştırıldı. Tiaminin enerji metabolizmasına dahil olan sitosolik (transketolaz) ve mitokondrial (piruvat dehidrogenaz, dallanmış zincir ketoasit dehidrogenaz ve α -ketoglutarat dehidrogenaz) bazı enzimlerin katalizinde kofaktör olarak görev yaptığı bilinmektedir. Transketolaz enzimi pentoz fosfat yolunun anahtar bir enzimidir ve NADPH'leri üretir. Piruvat dehidrogenaz enzimi glikoliz ile trikarboksilik asit siklusunu bağlar. Dallanmış zincir ketoasit dehidrogenaz ise aminoasitlerin trikarboksilik asit siklusuna girişini sağlar. α -ketoglutarat dehidrogenaz da trikarboksilik asit siklusunun hız sınırlayıcı basamağını oluşturur (Gibson ve Blass, 1976).

Normal şartlarda mitokondri hücresel oksijenin % 90'ını tüketir (Gorman ve Taylor, 2011; Anupama ve diğ., 2013) ve bunun da % 15'ini ROTlara dönüştürür (St-Pierre J., ve diğ., 2002). Antioksidan savunma ise SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimlerle yapılır (Mutoh ve diğ., 1995; Nakagawa ve diğ., 1999). ROT'ların artması elektron transfer zincirini bloke edip üretilen ATP ile tüketilen oksijen oranını azaltır. Diabet ve nörodejeneratif hastalıklarda mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak; oksidatif strese neden olan serbest radikal üretimi artarken, enerji metabolizmasında aksamalar meydana gelir (Blass, 2001; Tang ve diğ., 2012). Ek olarak, Alzheimer, Parkinson, Huntington, Wernicke-Korsakoff sendromu gibi nörodejeneratif hastalıklarda tiamin eksikliğinin oksidatif stresi artırması, enerji metabolizmasındaki tiamin bağımlı enzimlerin ve bu enzimlerin dahil oldukları süreçlerin oksidatif strese duyarlı olması, tiamin varlığının oksidatif stres sürecini geri çevirmesinin yanında diğer antioksidantların tiamin eksikliği ile tetiklenen değişiklikleri geri çevirmesi tiamin ile oksidatif stres etkileşimini desteklemektedir (Gibson ve diğ., 1999; Lin ve Beal, 2006; Hazell ve diğ., 2010; Jhala ve Hazell, 2011).

Bu çalışmada da, tiamin içeren normal koşullarda üretilen *ird11*'de yabancı tipte karşılaştırıldığında, tiamin metabolizması ile ilgili genlerden yalnızca *thi2* (P3)'nin anlatımının arttığı tespit edildi (4.7). Ancak ele alınan bu genlerin anlatımları, oksidatif strese maruz bırakılan yabancı tipte (972 HP) kontrol yabancı tipe göre düşerken (Şekil 4.7), oksidatif stres uygulanan *ird11*'de (ird11 HP) uygulanmayan *ird11*'e göre arttığı

belirlendi (Şekil 4.7). Bu durum, *ird11*'in oksidatif strese karşı oluşturduğu savunma mekanizmalarında, tiamin biyosentez ve transportu ile ilişkili genlerin iş gördüğünün ipuçlarını verdiği düşünülmektedir. Oksidatif stres ile tiamin metabolizması arasındaki ilişki, Palabıyık ve diğ., (2014, GMR, baskıda) mikroarray verilerinde de belirtilmiştir. Burada *thi3* geninin anlatımının *ird11*'de yabancı tipe göre 33,5 kat azaldığı, ancak H₂O₂'ye maruz bırakılan *ird11*'de 31 kat arttığı tespit edilmiştir. Hatta tiamin metabolizmasına ilişkin diğer genlerde de, bu kadar belirgin olmamakla beraber, benzer durum saptanmıştır.

Tiaminin hem enerji yollarında hem de oksidatif strese karşı geliştirilen savunma mekanizmalarında iş gördüğünün ortaya konması, sağlık alanında halen gizemini koruyan bir çok hastalığın tanı ve tedavisinde yardımcı olacağını düşündürmektedir. Örneğin bunların başında mitokondri fonksiyon bozukluğuna bağlı ortaya çıkma oranı artan nörodejeneratif hastalıklar gelmektedir (Jhala ve Hazell, 2011). Beri-beri hastalarında da tiamin eksikliğinin tespit edilmiş olması; tiamin biyosentez ve transportundan sorumlu genlerin anlatım profillerinin ortaya çıkarılması bu hastalığın tanı ve tedavisinde araştırmacılara yol göstereceğine inanılmaktadır.

KAYNAKLAR

- Alan, S. H., and Roger, F. B., 2009. "Update of Cell Damage Mechanisms in Thiamine Deficiency: Focus on Oxidative Stress, Excitotoxicity and Inflammation." *Alcohol & Alcoholism* Vol. 44, No. 2, pp. 141–147.
- Anupama, S., Renu, B. and Parvesh, B., 2013. "Thiamine deficiency induces oxidative stress in brain mitochondria of *Mus musculus*." *Journal of Physiology and Biochemistry*, Volume 69, Issue 3, pp 539-546.
- Bahler, J., and Wood, V., 2006. "Probably the best model organism in the world." *Yeast* 23: 899-900.
- Begley, T. P., Downs, D. M., Ealick, S. E., McLafferty, F. W., Van Loon, A. P., Taylor, S., Campobasso, N., Chiu, H. J., Kinsland, C., Reddick, J. J., and Xi, J. 1999. "Thiamin biosynthesis in prokaryotes." *Arch. Microbiol.* 171, 293–300.
- Beskow, A., and Wright, A. P. H., 2006. "Comparative analysis of regulatory transcription factors in *Schizosaccharomyces pombe* and budding yeasts." *Yeast* 23: 929-935.
- Bettendorff, L., 1996. "A non-cofactor role of thiamine derivatives in excitable cells?" *Arch. Physiol. Biochem.* 104, 745-751.
- Blass, J.P., 2001. "Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia?" *J Neurosci Res* 66(5):851–856
- Bolker, M., 1998. "Sex and crime: heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis." *Fungal Genet. Biol.* 25, 143–156.
- Celik, G., Kaya, A., Poyraz, B., Ciledag, A., Elhan, A. H., Öktem, A., Tozkoparan, E. and Ozkan, M. (2006), Diagnostic value of leptin in tuberculous pleural effusions. *International Journal of Clinical Practice*, 60: 1437–1442. doi: 10.1111/j.1742-1241.2006.00831
- Chance, B., Sies, H., and Boveris, A., 1979. "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." *Physiol Rev* 59:527–605
- Chatterjee, A., Jurgenson, C.T., Schroeder, F.C., Ealick, S.E., and Begley, T.P., 2007. "Biosynthesis of thiamin thiazole in eukaryotes: conversion of NAD to an advanced intermediate." *J. Am. Chem. Soc.* 14, 2914-2922.
- Chen, D., Toone, W. M., Mata J., Lyne R., Burns G, Kivinen K, Brazma A, Jones N, Bähler J., 2003. "Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress." *Mol Biol Cell.* 2003 Jan;14(1):214-29.
- Chen, D., Wilkinson, C. R. M., Watt, S., Penkett, C. J., Toone, W. M., Jones, N., Bahler J., 2008. "Multiple pathways differentially regulate global oxidative stress responses in fission yeast." *Mol Biol Cell* 19:308–317

- Coddington, A., and Schweingruber, M.E., 1986. "Acid phosphatase deficient mutants of *Schizosaccharomyces pombe* are defective in tyrosine uptake." *Curr Genet* 11:113-117 1986 Europe PMC | PubMed
- Cook, C. C., Hallwood, P. M., and Thomson, A.D., 1998. "B Vitamin deficiency and neuropsychiatric syndromes in alcohol misuse." *Alcohol Alcohol* 33:317–36.
- Degols, G., and Russell P., 1997. "Discrete roles of the Spc1 kinase and the Atf1 transcription factor in the UV response of *Schizosaccharomyces pombe*". *Mol. Cell. Biol.* 17:3356–3363
- Degols, G., Shiozaki K., and Russell P., 1996. "Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*". *Mol. Cell. Biol.* 16:2870–2877.
- Desjardins, P., and Butterworth, R. F., 2005. "Role of mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of selective neuronal loss in Wernicke's encephalopathy". *Mol Neurobiol* 31:17–25
- D'Souza, C. A., and Heitman, J., 2001. "Conserved cAMP signaling cascades regulate fungal development and virulence". *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 349–364.
- Egel, R. 2004. "The Molecular Biology of *Schizosaccharomyces pombe*: Genetics, Genomics and Beyond". *Springer-Verlag Berlin, Heidelberg*; ISBN: 3-540-00693-1..
- Elliott, S., Chang, C. W., Schweingruber, M. E., Schaller, J., Rickli, E. E., Carbon, J., 1986. "Isolation and characterization of the structural gene for secreted acid phosphatase from *Schizosaccharomyces pombe*". *J Biol Chem* 261:2936-2941 1986 Europe PMC | PubMed
- Enjo, F., Nosaka, K., Ogata, M., Iwashima, A. and Nishimura, H., 1997. "Isolation and characterization of a thiamin transport gene, *THI10*, from *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Biol. Chem.* 272; 19165-19170.
- Ephrussi, B., Slonimsky, P. P., Yotsuyanagi, Y., and Tavlikki, J., 1956. "Variations physiologiques de la levure au cours du cycle de la croissance aerobie". *C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Physiol.* 26,87- 102
- Fankhauser, H., Zurlinden, A., Schweingruber, A. M., Edenharter, E., and Schweingruber, M. E., 1995. "*Schizosaccharomyces pombe* thiamine pyrophosphokinase is encoded by gene *tnr3* and is a regulator of thiamine metabolism, phosphate metabolism, mating, and growth". *J Biol Chem* 270:28457-28462, Europe PMC | PubMed
- Flores CL, Rodriguez C, Petit T and Gancedo C (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 507-529.
- Friedrich, W., 1987. "Thiamin (Vitamin B1, aneurin). in". *Hanbuch der Vitamine*, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 240-258.

- Gaits, F., Shiozaki K., and Russell P., 1997. "Protein phosphatase 2C acts independently of stress-activated kinase cascade to regulate the stress response in fission yeast". *J. Biol. Chem.* 272:17873–17879.
- Gaits, F., Degols G., Shiozaki K., and Russell P., 1998. "Phosphorylation and association with the transcription factor Atf1 regulate localization of Spc1/ Sty1 stress-activated kinase in fission yeast". *Genes Dev.* 12:1464–1473.
- GianPietro, S., and Alessandro, S., 2007. "Wernicke's encephalopathy: new clinical settings and recent advances in diagnosis and management". *The Lancet Neurology*, Volume 6, Issue 5, Pages 442 - 455
- Gibson, G. E., Park, L. C., Zhang, H., Sorbi, S., and Calingasan, N. Y., 1999. "Oxidative stress and a key metabolic enzyme in Alzheimer brains, cultured cells, and an animal model of chronic oxidative deficits. " *Ann N Y Acad Sci.*;893:79-94. Review. PMID: 10672231 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Gibson, G. E., and Blass, J. P., 1976. "Inhibition of acetylcholine synthesis and of carbohydrate utilization by maple-syrup-urine disease metabolites". *J Neurochem.*;26(6):1073–1078. [PubMed]
- Gorman G. S., Taylor R.W., 2011. "Mitochondrial DNA abnormalities in ophthalmological disease". *Saudi J Ophthalmol* 25(4):395–404
- Gustin, M. C., J. Albertyn, M. Alexander, and K. Davenport. 1998. "MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1264–1300.
- Gutz H., Heslot H., Leupold U., Loprieno N., 1974. *Schizosaccharomyces pombe*. In: *King RC (eds) Handbook of genetics*. Plenum Press, New York, pp 395–446
- Halliwell B., 2006. "Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life". *Plant Physiol.* 141: 312–322. [PMC free article] [PubMed]
- Hazell, A. S., Sheedy, D., Oanea, R., Aghourian, M., Sun, S., and Jung, J. Y., 2010. "Loss of astrocytic glutamate transporters in Wernicke encephalopathy". *Glia*, 58(2), 148-156.
- Hoffman, C. S., and Winston, F., 1991. "Glucose repression of transcription of the *Schizosaccharomyces pombe* fbp1 gene occurs by a cAMP signaling pathway". *Genes Dev.* 5, 561–571.
- Hoffman, C. S., 2005 "Glucose sensing via the protein kinase A pathway in *Schizosaccharomyces pombe*". *Biochem Soc Trans.*; 33(Pt 1):257-60
- Hohmann, S., and Meacock, P.A., 1998. "Thiamin metabolism and thiamin diphosphate-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation". *Biochim. Biophys. Acta* 1385; 201-219.

- Holzer, H., 1968. "in *Aspects of Yeast Metabolism*". (Mills, A. K. & Krebs, Sir H., eds) pp. 155- 178, *Blackwell Scientific Publ.*, Oxford and Edinburgh.
- Iwashima, A., Nishino, H., and Nose, Y., 1973. "Carrier-mediated transport of thiamine in baker's yeast". *Biochim. Biophys. Acta* 330:222-234.
- Johnsson A, Xue-Franzen Y, Lundin M, Wright AP: Stress-specific role of fission yeast Gcn5 histone acetyltransferase in programming a subset of stress response genes. *Eukaryot Cell* 2006, 5(8):1337-1346
- Jhala, S. S., and Hazell, A. S., 2011. "Modeling neurodegenerative disease pathophysiology in thiamine deficiency: consequences of impaired oxidative metabolism". *Neurochem Int*, 58(3), 248-260.
- Kato T., Jr., Okazaki K., Murakami, H., Stettler, S., Fantès, P. A., and Okayama, H., 1996. "Stress signal, mediated by a Hog1-like MAP kinase, controls sexual development in fission yeast". *FEBS Lett.* 378:207–212.
- Kig C., Turkel S., Temizkan G., 2005. "Isolation and characterization of glucose derepressed invertase mutants from *Schizosaccharomyces pombe*". *Biosci Biotechnol Biochem* 69(12):2475–2478
- Kim D.U., Hayles J., Kim D., Wood V., Park H.O., Won M., Yoo H.S., Duhig T., Nam M., Palmer G., Han S., Jeffery L., Baek S.T., Lee H., Shim Y.S., Lee M., Kim L., Heo K.S., Noh E.J., Lee A.R., Jang Y.J., Chung K.S., Choi S.J., Park J.Y., Park Y., Kim H.M., Park S.K., Park H.J., Kang E.J., Kim H.B., Kang H.S., Park H.M., Kim K., Song K., Song K.B., Nurse P., Hoe K.L., 2010. "Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*". *Nat Biotechnol* 28:617-623, Europe PMC | PubMed
- Koser S. A., 1968. "*Vitamin Requirements of Bacteria and Yeasts*" Charles C. Thomas, Springfield, IL
- Kubista M., Andrade J. M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., 2006. "The real-time polymerase chain reaction". *Mol Aspects Med* 2006;27:95-125.
- Lai E.C., 2003. "RNA sensors and riboswitches: self-regulating messages". *Curr. Biol.* 13, 285-291.
- Lakaye, B., Wirtzfeld, B., Wins, P., Grisar, T. and Bettendorff, L., 2004. "Thiamine triphosphate, a new signal required for optimal growth of *Escherichia coli* during amino acid starvation". *J. Biol. Chem.* 279, 17142-17147.
- Landry S., Pettit M. T., Apolinario E., Hoffman C. S., 2000. "The fission yeast *git5* gene encodes a Gbeta subunit required for glucose-triggered adenylate cyclase activation". *Genetics.*;154(4):1463–1471. [PMC free article] [PubMed]
- Landry, S., and Hoffman, C. S., 2001. "The *git5* Gbeta and *git11* Ggamma form an atypical Gbetagamma dimer acting in the fission yeast glucose/cAMP pathway". *Genetics* 157, 1159–1168.

- Lee S, Choi H, Suh S, Doo I-S, Oh K-Y, Choi EJ, Schroeder Taylor AT, Low PS, Lee Y (1999) "Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. " *Plant Physiol* 121: 147–152
- Lengeler, K. B., Davidson, R. C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W. C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M. & Heitman, J., 2000. "Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 746–785.
- Leupold, U., 1950 *S. pombe*. *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, SQR. Physiol.* 24: 381480.
- Lindner, P., 1893. *Schizosaccharomyces pombe* n. sp., ein neuer Gahrungserreger. *Wochenschr Brauerei* 10, 1298–1300
- Lin, M. T., Beal, M. F., 2006. "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases". *Nature.* ;443(7113):787-95.
- Lin, S. J., Defossez P. A., Guarente L., 2000. "Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*". *Science* 289(5487):2126–2128
- Lin, S.-J., Kaeberlein, M., Andalis, A.A., Sturtz, L.A., Defossez, P.-A., Culotta, V.C., Fink, G.R., and Guarente, L. 2002. "Calorie restriction extends life span by shifting carbon toward respiration". *Nature* 418: 344–348.
- Machado, C.R., Praekelt, U.M., Costa de Oliveira, R.L., Barbosa, A.C.C., Byrne, K.L., Meacock, P.A. and Menck, C.F.M., 1997. "Dual role for yeast *THI4* CELLULAR & MOLECULAR BIOLOGY LETTERS 281 gene in thiamine biosynthesis and DNA damage tolerance". *J. Mol. Biol.* 273 (1997) 114-121.
- MacQuillan, A. M., Winderman, S. & Halvorson, H. O., 1960. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3, 77-80.
- Manzetti S., Zhang J., and Van der Spoel D., 2014, "Thiamin function, metabolism, uptake, and transport". *Biochemistry.* ;53(5):821-35. doi: 10.1021/bi401618y.
- Mathews, Christopher, Kensal Van Holde and Kevin Ahern. 2000. *Biochemistry* 3 rd edition. <http://www.aw-bc.com/mathews/ch07/c07emhp.htm> . Accessed March 2005.
- Medina-Silva, R., Barros, M.P., Galhardo, R.S., Netto, L.S., Colepicolo, P. and Menck, C.F., 2005. "Heat stress promotes mitochondrial instability and oxidative responses in yeast deficient in thiazole biosynthesis". *Res. Microbiol.* 157, 275-281.
- Manetti, A. G., Rosetto, M., and Maundrell, K. G., 1994. "nmt2 of fission yeast: a second thiamine-repressible gene co-ordinately regulated with nmt1". *Yeast* 10, 1075–1082

- Marobbio, C. M. T., Voza, A., Harding, M., Bisaccia, F., Palmieri, F., and Walker, J. E., 2002. "Identification and reconstitution of the yeast mitochondrial transporter for thiamine pyrophosphate". *The EMBO Journal* Vol. 21 No. 21 pp. 5653-5661.
- Maundrell, K., 1990. "nmt1 of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine". *J. Biol. Chem.* 265, 10857–10864
- McQuire T.A., Young P.G., 2006. "joint regulation of the nmt1 promotor and sporulation by *thi1* and *thi5* in *Schizosaccharomyces pombe*". *Curr Genet.*; 50(4):269-79. Epub 2006 Jul 28.
- Millar, J. B., Russell, P., Dixon, J. E., and Guan, K. L., 1992. "Negative regulation of mitosis by two functionally overlapping PTPases in fission yeast". *EMBO J.* 11:4943-4952.
- Millar, J. B., Buck, V., and Wilkinson, M. G., 1995. "Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast". *Genes Dev.* 9:2117–2130.
- Mojzita, D., and Hohmann, S., 2006. "Pdc2 coordinates gene expression in the yeast *THI* regulon". *Molecular Genetics and Genomics* 276:147-161
- Moreno, S., Nurse, P. and Russell, P., 1990. "Regulation of mitosis by cyclic accumulation of p80cdc25 mitotic inducer in fission yeast". *Nature* 343, 549-552.
- Morett, E., Korbelt, J. O., Rajan, E., Saab-Rincon, G., Olvera, L., Olvera, M., Schmidt, S., Snel, B., and Bork, P., (2003) "Systematic discovery of analogous enzymes in thiamin biosynthesis". *Nat Biotechnol* 21: 790–795.
- Morgan, M. Y., 1999. "Nutritional aspects of liver and biliary disease". In Bircher J, Benhamou JP, McIntyre N, Rizzetto M, Rode's J (eds). *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. Oxford: Oxford Medical Publication, 1923–81.
- Mutoh, N., Nakagawa, C. W., and Hayashi, Y., 1995. "Adaptive response of *Schizosaccharomyces pombe* to hydrogen peroxide". *FEMS Microbiol. Lett.* 132, 67-72.
- Nakagawa, Y., Koyama, M., and Matsumoto, M., 1999. "Flutamide-induced hepatic disorder and serum concentrations of flutamide and its metabolites in patients with prostate cancer". *Acta Urol Jpn* 45:821– 826.
- Nosaka, K., Kaneko, Y., Nishimura, H., and Iwashima, A., 1989. "A possible role for acid phosphatase with thiamin-binding activity encoded by PHO3 in yeast". *FEMS Microbiol Lett* 51(1):55-9
- Nosaka, K., Kaneko, Y., Nishimura, H., and Iwashima, A., 1993. "Isolation and characterization of a thiamin pyrophosphokinase gene, *THI80*, from *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Biol. Chem.* 268, 17440-17447.

- Nosaka, K., Onozuka, M., Konno, H., Kawasaki, Y., Nishimura, H., Sano, M., and Akaji, K., 2005. "Genetic regulation mediated by thiamin pyrophosphate-binding motif in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Microbiol.* 58, 467–479
- Nosaka, K., 2006. "Recent progress in understanding thiamin biosynthesis and its genetic regulation in *Saccharomyces cerevisiae*". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 30-40.
- Ohmiya, R., Yamada, H., Kato, C., Aiba, H., and Mizuno, T., 2000. "The Prr1 response regulator is essential for transcription of *ste11_* and for sexual development in fission yeast". *Mol. Gen. Genet.* 264:441–451.
- Ohmiya, R., Kato, C., Yamada, H., Aiba, H., and Mizuno, T., 1999. "A fission yeast gene (*prr1_*) that encodes a response regulator implicated in oxidative stress response". *J. Biochem. (Tokyo)* 125:1061–1066.
- Osterwalder, A. (1924). *Schizosaccharomyces liquefaciens* n. sp., eine gegen freie schweflige Säure widerstandsfähige Gärhefe. Mitt Gebiete Lebensmittelunters Hyg 15, 5–28
- Palabiyik, B., Kılıç, C., Pekmez, M., Dalyan, L., Arda, N., Temizkan, G., 2012. "Investigation Of The Relationship Between Oxidative Stress And Glucose Signaling In *Schizosaccharomyces Pombe*". *BIOCHEMICAL GENETICS*, vol.50, pp.336-349.
- Palabiyik, B., Ghods, F. J., and Uçar, E. O., 2014. on publication. "A potential protective role for thiamine in glucose-driven oxidative stress". *GMR*.
- Pekmez M., Arda N., Hamad İ., Kılıç C., Temizkan G., "Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Damages In *Schizosaccharomyces Pombe*", *Biologia, Section Cellular and Molecular Advances In Experimental Medicine And Biology*, vol.63, pp.151-155, 2008
- Pfaffl, MW., "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR". *Nucleic Acids Res.*, 29 (9): e45 2001.
- Polakis, E., S., and Bartley W., 1965. "Changes in the Activities of Respiratory Enzymes During the Aerobic Growth of Yeast on Different Carbon Sources". *Biochem. J.* 97, 284-297.
- Praekelt, U. M., Byrne, K. L., and Meacock, P. A., 1994. "Regulation of *THI4(MOL1)*, a thiamine-biosynthetic gene of *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast* 10, 481–490
- Samejima, I., Mackie, S., and Fantès, P. A., 1997. "Multiple modes of activation of the stress-responsive MAP kinase pathway in fission yeast". *EMBO J.* 16:6162–6170.
- Schüller, G., Brewster, J. L., Alexander, M. R., Gustin, M. C., and Ruis, H., 1994. "The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae CTT1* gene". *EMBO J.* 13:4382–4389.

- Schweingruber, M. E., Fluri, R., Maundrell, K., Schweingruber, A. M., and Dummermuth, E. 1986. "Identification and characterization of thiamine repressible acid phosphatase in yeast". *J. Biol. Chem.* 261:15877–15882.
- Schweingruber, M. E., and Edenharter, E., 1990. "Thiamin regulates agglutination and zygote formation in *Schizosaccharomyces pombe*". *Curr. Genet.* 17:191–194.
- Schweingruber, A. M., Dlugonsky, J., Edenharter, E., and Schweingruber, M. E., 1991. "Thiamine in *Schizosaccharomyces pombe*: dephosphorylation, intracellular pool, biosynthesis and transport". *Curr. Genet.* 19:249–254.
- Settembre, E., Begley, T. P., and Ealick, S. E., 2003. "Current Opinion in Structural Biology". 13, 739–747
- Shieh, J. C., Wilkinson, M. G., Buck, V., Morgan, B. A., Makino, K., and Millar, J. B., 1997. "The Mcs4 response regulator coordinately controls the stressactivated Wak1-Wis1-Sty1 MAP kinase pathway and fission yeast cell cycle". *Genes Dev.* 11:1008–1022.
- Shiozaki, K., and Russell, P., 1995. "Cell cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast". *Nature* 378:739–743. (a)
- Shiozaki, K., and Russell, P., 1995. "Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAPKK homolog in the osmoregulation of fission yeast". *EMBO J.* 14:492–502.(b)
- Shiozaki, K., and Russell, P., 1996. "Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast". *Genes Dev.* 10:2276–2288.
- Shiozaki, K., Shiozaki, M. and Russell, P., 1997. "Mcs4 mitotic catastrophe suppressor regulates the fission yeast cell cycle through the Wik1-Wis1- Spc1 kinase cascade". *Mol. Biol. Cell* 8:409–419.
- Stolz J., Wöhrmann H. J., and Vogl C., 2005. "Amiloride uptake and toxicity in fission yeast are caused by the pyridoxine transporter encoded by *bsu1+* (*car1+*).". *Eukaryot Cell* 4:319-326 Europe PMC | PubMed
- St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J., Brand, M. D., 2002. "Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain". *J Biol Chem* 277:44784–44790
- Takeda, T., Toda, T., Kominami, K., Kohnosu, A., Yanagida, M., and Jones, N., 1995. "*Schizosaccharomyces pombe atf1*_ encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase". *EMBO J.* 14:6193–6208.
- Tang J., Yan H., Zhuang S., 2012. "Inflammation and oxidative stress in obesity-related glomerulopathy". *Int J Nephrol* 2012:1–11

- Thornalley P. J., Babaei-Jadidi R., Al Ali H., Rabbani N., Antonysunil A., Larkin J., Ahmed A. et al., 2007. "High prevalence of low plasma thiamine concentration in diabetes linked to a marker of vascular disease". *Diabetologia*;50(10):2164–2170. [PMC free article] [PubMed]
- Toda, T., Shimanuki, M., and Yanagida, M., 1991. "Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast FUS3 and KSS1 kinases". *Genes Dev.* 5:60–73.
- Toda, T., Shimanuki, M., Saka, Y., Yamano, H., Adachi, Y., Shirakawa, M., Kyogoku, Y., and Yanagida, M., 1992. "Fission yeast *pap1*-dependent transcription is negatively regulated by an essential nuclear protein, *crm1*". *Mol. Cell. Biol.* 12:5474–5484.
- van der Velden, V. H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., Van Dongen, J. J., 2003. "Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects". *Leukemia*; 17:1013-34.
- Veal, E. A., Day A. M., Morgan, B. A., 2007. "Hydrogen peroxide sensing and signaling". *Mol. Cell* 26: 1–14. [PubMed]
- Vogl, C., Klein, C. M., Batke, A. F., Schweingruber, M. E., Stolz, J., "Characterization of *Thi9*, a novel thiamine (Vitamin B1) transporter from *Schizosaccharomyces pombe*". *J Biol Chem* 283:7379-7389 2008 Europe PMC | PubMed
- Walker G., 1998, Yeast physiology and biotechnology. *John Wiley & Sons*. UK.
- Warbrick, E., and Fantes, P. A., 1991. "The *wis1* protein kinase is a dosagedependent regulator of mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*". *EMBO J.* 10:4291–4299.
- Welton, R. M., and Hoffman, C. S., 2000. "Glucose monitoring in fission yeast via the Gpa2 galpha, the git5 Gbeta and the git3 putative glucose receptor". *Genetics* 156, 513–521.
- Wightman, R., and Meacock P. A., 2003. " The *THI5* gene family of *Saccharomyces cerevisiae*: distribution of homologues among the hemiascomycetes and functional redundancy in the aerobic biosynthesis of thiamin from pyridoxine ". *Microbiology*, 149, 1447–1460
- Wilkinson, M. G., Samuels, M., Takeda, T., Toone, W. M., Shieh, J. C., Toda, T., Millar, J. B., and Jones, N., 1996. "The *Atf1* transcription factor is a target for the *Sty1* stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast". *Genes Dev.* 10:2289–2301.

- Wood V., Gwilliam R., Rajandream M. A., Lyne M., Lyne R., Stewart A., Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, Basham D, Bowman S, Brooks K, Brown D, Brown S, Chillingworth T, Churcher C, Collins M, Connor R, Cronin A, Davis P, Feltwell T, Fraser A, Gentles S, Goble A, Hamlin N, Harris D, Hidalgo J, Hodgson G, Holroyd S, Hornsby T, Howarth S, Huckle EJ, Hunt S, Jagels K, James K, Jones L, Jones M, Leather S, McDonald S, McLean J, Mooney P, Moule S, Mungall K, Murphy L, Niblett D, Odell C, Oliver K, O'Neil S, Pearson D, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rutherford K, Rutter S, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Skelton J, Simmonds M, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Taylor RG, Tivey A, Walsh S, Warren T, Whitehead S, Woodward J, Volckaert G, Aert R, Robben J, Grymonprez B, Weltjens I, Vanstreels E, Rieger M, Schäfer M, Müller-Auer S, Gabel C, Fuchs M, Düsterhöft A, Fritzc C, Holzer E, Moestl D, Hilbert H, Borzym K, Langer I, Beck A, Lehrach H, Reinhardt R, Pohl TM, Eger P, Zimmermann W, Wedler H, Wambutt R, Purnelle B, Goffeau A, Cadieu E, Dréano S, Gloux S, Lelaure V, Mottier S, Galibert F, Aves SJ, Xiang Z, Hunt C, Moore K, Hurst SM, Lucas M, Rochet M, Gaillardin C, Tallada VA, Garzon A, Thode G, Daga RR, Cruzado L, Jimenez J, Sánchez M, del Rey F, Benito J, Domínguez A, Revuelta JL, Moreno S, Armstrong J, Forsburg SL, Cerutti L, Lowe T, McCombie WR, Paulsen I, Potashkin J, Shpakovski GV, Ussery D, Barrell BG, Nurse P., 2002. "The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*". *Nature*. 21;415(6874):871-80.
- Yamamoto, M., 1996. "Regulation of meiosis in fission yeast". *Cell Struct. Funct.* 21:431–436.
- Zurlinden, A., and Schweingruber, M. E., 1992. "Cloning and regulation of *Schizosaccharomyces pombe thi2*, a gene involved in thiamine biosynthesis". *Gene (Amst.)* 117, 141–143
- Zurlinden, A., and Schweingruber, M. E., 1994. "Cloning, nucleotide sequence, and regulation of *Schizosaccharomyces pombe thi4*, a thiamine biosynthetic gene". *J. Bacteriol.* 176:6631–6635.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler



Adı Soyadı	Ahmet AKÇAY
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	10.06.1987, Dargeçit/MARDİN
Telefon	+905533646477
E-mail	2601110181@ogr.iu.edu.tr

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/Moleküler Biyoloji ve Genetik ABD/ Moleküler Biyoloji ve Genetik	2011-14
Lisans	İ.Ü. Fen Fakültesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik	2006-10
Erasmus (Undergraduate)	Roskilde University/Molecular Biology	2010 (Spring)
Erasmus (Internship)	Kopenhagen University/ Danish Archaea Center	2009-10
Lise	Kızıltepe Lisesi (Mardin)	2000-03
Bildiği Diller	Arapça, İngilizce, Kürtçe, Türkçe	