

**TY1 VİRÜSÜNDE GEN ANLATIMINA ETKİ
EDEN ÇEŞİTLİ SİNYAL İLETİM YOLLARININ
ARAŞTIRILMASI**

ELİF ARİK



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

**TY1 VİRÜSÜNDE GEN ANLATIMINA ETKİ EDEN ÇEŞİTLİ SİNYAL
İLETİM YOLLARININ ARAŞTIRILMASI**

Elif ARİK

**Prof. Dr. Sezai TÜRKEL
(Danışman)**

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

BURSA 2014

TEZ ONAYI

Elif Arik tarafından hazırlanan “Ty1 Virüsünde Gen Anlatımına Etki Eden Çeşitli Sinyal İletim Yollarının Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Sezai Türkel

Başkan: Prof. Dr. Nazan Dağüstü
Uludağ Ü. Ziraat Fakültesi,
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

İmza

Üye: Prof. Dr. Sezai Türkel
Uludağ Ü. Fen Edebiyat Fakültesi,
Moleküler Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı

İmza

Üye: Doç. Dr. C. Cem Ergül
Uludağ Ü. Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye: Yrd. Doç. Dr. Figen Ersoy
Uludağ Ü. Fen Edebiyat Fakültesi,
Moleküler Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı

İmza

Üye: Yrd. Doç. Dr. Tülay Turgut Genç
Çanakkale Onsekiz Mart Ü.
Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali Osman DEMİR

Enstitü Müdürü

...../...../.....

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

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

16/09/2014

Elif Arik

ÖZET

Doktora Tezi

TY1 VİRÜSÜNDE GEN ANLATIMINA ETKİ EDEN ÇEŞİTLİ SİNYAL İLETİM
YOLLARININ ARAŞTIRILMASI

Elif ARİK

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sezai TÜRKEKEL

Maya retrotranspozonu Ty1, virüslerin retroviridae gurubunda yer alır ve maya hücrelerinde retrovirüslere benzer bir mekanizma ile çoğalır. Herhangi bir transkripsiyon faktörü kodlamadığı için transkripsiyonunun düzenlenmesi tümüyle maya tarafından kodlanan faktörlere bağlıdır. Bu çalışmada haploid ve diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde retrotranspozon Ty1 transkripsiyonunun glukoz sinyali ve ozmotik strese yanıt olarak nasıl etkilendiğini araştırılmıştır. Ty1 transkripsiyonunun *tup1* mutanlığı haploid *S. cerevisiae* hücrelerinde 3 kat azaldığı, homozigot *tup1* mutanlığı diploid hücrelerde ise Ty1 transkripsiyonunun yaban tip diploid hücrelerdeki Ty1 transkripsiyonuna kıyasla değişmediği gözlenmiştir. Bununla birlikte, haploid *S. cerevisiae* hücrelerinde Ty1 transkripsiyonunun düzenlenmesinde glukoz sinyali ve ozmotik stresin önemli bir rolü olmamakla birlikte, diploid hücrelerde Ty1 transkripsiyonu glukoz sinyaline ve ozmotik strese yanıt olarak düzenlenmektedir ve bu düzenlemeler *Tup1p*'ye bağlı olarak gerçekleşmektedir. Ayrıca, Ty1 transkripsiyonunun *Tup1p* aracılığı ile düzenlenmesinde *Snf2p* ve *Ada2p* de gerekli gerekmektedir. Ty1 transkripsiyonunun *tec1* mutanlığı haploid *S. cerevisiae* hücrelerinde 3 kat azaldığı gözlenmiştir. Buna ek olarak, *Hog1p*'nin ve *Skp7p*'nin ozmotik strese yanıt olarak Ty1 transkripsiyonunun düzenlenmesinde fazla bir etkisi olmadığı, fakat *Skp7p*'nin Ty1 transkripsiyonunu yaklaşık 2 kat aktive ettiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ty1, *Tup1*, *Skp7*, Glukoz Sinyali, Ozmotik Stres, Transkripsiyon, Retrotranspozon.

2014, xii + 108 sayfa.

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF DIFFERENT SIGNALING PATHWAYS
TO GENE EXPRESSION IN TY1 VIRUS.

Elif ARIK

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

Supervisor: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

The yeast retrotransposon Ty1 belongs to retroviridae group and propagates with a retroviral-like mechanism within yeast cells. Ty1 does not encode any transcription factors and hence its transcriptional regulation completely depends on the yeast encoded factors. In this study, we have analyzed the transcriptional response to glucose signaling and osmotic stress of retrotransposon Ty1 in haploid and diploid cells. The transcription levels of Ty1 decreased at least 3-fold in haploid *tup1* mutant *S. cerevisiae* cells. However, Ty1 transcription levels in homozygous *tup1* mutant diploid *S. cerevisiae* cells were similar with Ty1 transcription levels of wild-type diploid cells. The correlation of transcription levels in repressed, derepressed and osmotic stress conditions indicate that Tup1p involves regulation of Ty1 transcription in response to glucose signaling and osmotic stress. Ty1 transcription is not regulated in response to glucose signaling and osmotic stress in haploid cells. In contrast to this, Ty1 transcription is regulated in response to glucose signaling and osmotic stress in diploid cells and these regulations depend on Tup1p. Moreover Tup1p requires Snf2p and partially Ada2p for Ty1 transcription. The transcription levels of Ty1 decreased at least 3-fold in haploid *tec1* mutant *S. cerevisiae* cells. Though Hog1p and Skn7p is not essential for the regulation of Ty1 transcription in response to osmotic stress, Skn7p activates Ty1 transcription at least 2-fold.

Key words: Ty1, Tup1, Skn7, Glucose signaling, Osmotic stress, Transcription, Retrotransposon.

2014, xii + 108 pages.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Lisans, Yüksek Lisans ve Doktora öğrenimim boyunca, bana verdiği kaliteli eğitimden dolayı, ayrıca; araştırmalarım ve tezim de dahil her türlü konuda bana gösterdiği sonsuz destek ve anlayışından dolayı saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Sezai Türkel'e; Hayatım boyunca bana gösterdikleri anlayış, maddi ve manevi desteklerinden dolayı sevgili aileme; Ayrıca doktora tezimdeki şekillerin çizimindeki yardımından dolayı arkadaşım Serap Aksoy'a çok teşekkür ederim.

Elif Arik
16/09/2014

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. <i>S. cerevisiae</i> 'nin Genel Özellikleri.....	4
2.2. Ty Elementlerinin Genel Özellikleri.....	5
2.1.1. Model Sistem Olarak Retrotranspozonlar.....	9
2.1.2. Ty1 Elementlerinin Genetik Yapısı.....	10
2.1.3. Ty1 Transkripsiyonunun Hücre Tipine Özel Kontrol.....	15
2.3. <i>S. cerevisiae</i> 'da Farklı metabolik yolların Etkileri.....	17
2.2.1. <i>S. cerevisiae</i> 'da Glukozun Metabolik Etkileri.....	17
2.2.2. <i>S. cerevisiae</i> 'da Glukoz Sinyalinin Algılanması.....	19
2.2.3. <i>S. cerevisiae</i> 'da Ozmotik Stresin etkileri.....	20
2.4. Kromatin Faktörlerinin Ty1 transkripsiyonuna etkileri.....	22
2.5. Ssn6-Tup1 represör kompleksinin genel mekanizması.....	24
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	30
3.1. Materyal.....	30
3.1.1. Araştırmada Kullanılan <i>S. cerevisiae</i> Suşları.....	30
3.2. Yöntem.....	33
3.2.1. <i>S. cerevisiae</i> Suşlarının Transformasyon İçin Üretilmesi.....	33
3.2.2. Araştırmada Kullanılan Plazmidler.....	33
3.2.3. Plasmidlerin <i>E. coli</i> 'ye Transformasyonu ve Saflaştırılması.....	35
3.2.4. Plasmidlerin <i>S. cerevisiae</i> 'ya ya Transformasyonu.....	35
3.2.5. <i>S. cerevisiae</i> Transformantlarının Üretilmesi.....	36
3.2.6. β -galaktosidaz Aktivitelerinin Ölçülmesi.....	37
4. BULGULAR.....	40
4.1. Glukoz Sinyalinin Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	40
4.1.1. Glukoz Sinyalinin Haploid ve Diploid <i>S. Cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	40
4.1.2. Tup1 Ko-represörünün Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid ve Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri....	42
4.1.3. Tec1 Transkripsiyon Faktörünün Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid ve Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	45
4.1.4. Snf3p ve Snf4p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid ve Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	48
4.1.5. Snf2p ve Ada2p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid ve Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	52
4.1.6. Transkripsiyon faktörleri Mot3, Tye7 ve Gcn4'ün Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid ve Diploid <i>S. Cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	57
4.1.7. Spt11p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploidve Diploid	

<i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	63
4.2. Ozmotik Stresin Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	66
4.2.1. Ozmotik Stresin Haploid ve Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	66
4.2.2. Tup1 Ko-represörünün Ozmotik Strese Yanıt Olarak Haploid ve Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	67
4.2.3. Tec1 Transkripsiyon Faktörünün Ozmotik Strese Yanıt Olarak Haploid ve Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	70
4.2.4. Hog1p'nin Ozmotik Strese Yanıt Olarak Haploid ve Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	72
4.2.5. Skn7p'nin Ozmotik Strese Yanıt Olarak Haploid ve Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	74
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	78
KAYNAKLAR.....	83
EKLER.....	103
Ek 1. Araştırmada Kullanılan Üreme Ortamları ve Çözeltilerin Hazırlanması....	103
Ek 2. β -Galaktozidaz Aktivitesinin Hesaplanması.....	106
ÖZGEÇMİŞ.....	107

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
α	- Alfa
β	- Beta
ϵ	- Epsilon
λ	- Lamda
bç	- Baz çifti
g	- Gravity
kbç	- Kilo baz çifti
kDa	- Kilo Dalton
M	- Molar
mM	- miliMolar
ml	- Mililitre
mg	- Miligram
nm	- Nanometre
μ	- Mikron
μ l	- Mikrolitre
μ g	- Mikro Gram
w/v	- Weight / Volume (ağırlık/hacim)
v/v	- Volume/ Volume (hacim/hacim)
°C	- Santigrad
Δ	- Delta (Delesyon)
%	- Yüzde
Kısaltmalar	Açıklama
ADA	-transcriptional ADaptor
Bla	- β -laktamaz
CaCl ₂	- Kalsiyum Klorür
c DNA	- Copy DNA, Complementary DNA
CHD1	Chromatin Organization Modifier
Col E	- Kolişin plazmiti Replikasyon Orijini
CT-Box	- CTTCC dizisi
DNA	-Deoksiribo Nükleik Asit
DTT	- 1,4-Dithio-DL-threitol

E.C.3.2.1.26	- İvertaz enzimi Enzyme classification sayısı
EDTA	- Ethylenediamine tetraacetic acid
ENV	- Envelop (Viral kılıf proteini)
FRE	-Filament Response Element
GAL	- Galactose Metabolism
GCR	- Glycolysis Regulatory Protein
GCN4	-General Control Nonderepressible 4
Gly	- Glycerol
Grr	- Glucose Repression-Resistant
H	-Histon
HAL1	-Halotolerance
HAT	-Histon Asteil Transferaz
HCl	- Hidroklorik asit
HIV	- Human Immunodeficiency Virus
HOG	-High Osmolarity Glycerol Response
HXT	- Hexose Transporter
IN	- İntegraz
ISWI	- Imitation of Switch
kDA	-kilo dalton
KanM	- Kanamycin
KCl	- Potasyum klorür
Lak	- Laktat
LB	- Luria Broth
LTR	- Long Terminal Repeat
M	- Molar
MAPK	-Mitogen Activated Protein Kinase
MAT	- Mating Type
MCM1	-Mini Chromosome Maintenance
MgCl ₂	- Magnezyum Klorür
MgSO ₄	. Magnezyum Sülfat
MIG1	- Multicopy Inhibitor of GAL Genes-1
mRNA	- Messenger RNA
MSN2/4	-Multicopy Supressor of SNF1 mutation
Mth	- MSN 3 homologu

MOT3	-Modifier of transcription
NaCl	- Sodyum Klorür
Na ₂ CO ₃	- Sodyum Karbonat
Na ₂ HPO ₄	- Disodyum Hidrojen ortofosfat
NaH ₂ PO ₄	- Sodyum dihidrojen fosfat
NRG1	-Negative Regulator of Glucose-repressed genes
OD	- Optical Density
ONPG	- Orto Nitro Phenyl Galactoside
PBS2	-Polymyxin B sensitivity
pH	- Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PEG	- Poly Etilen Glikol
PK	- Protein Kinase
PR	- Proteaz
PMSF	- Phenylmethanesulfonyl fluoride
RAP1	-Repressor Activator Protein 1
RGT	- Restores Glucose Transport
RH	- RNaseH
RNA	- Ribonükleik Asit
RNase-H	- Ribonükleaz-H
ROX1	-Regulation by OXYgen
RSC	-Chromatin Remodelling Complex
rpm	- Revolution Per Minute
RT	- Revers Transkriptaz
SAGA	- Spt-Ada-Gcn5-Acetylase
SC	- Synthetic Complete
SDS	- Sodium Dodesil Sülfat
SIR4	-Silent Information Regulator 4
SKO1	-Supressor of Kinase Overexpression
SKN	-Supressor of Kre Null
SLN1	-Synthetic Lethal of N-end rule
SNF	- Sucrose Non-Fermenting
SPT	- Supressor of Ty
SRB	-Supressor of RNA polymerase B
SRE	-Steril Response Element

SSK	-Supressor of Sensor Kinase
SSN6	- Supressor of Snf-6
STD	-Supressor of Tbp deletion
STE11	-STERile-11
STE12	-STERile-12
SUS1	-SI gene Upstream of ySa1
SWI	- SWItching deficient
TAF	-TATA binding protein-Associated Factor
TE	- Tris Edta Buffer
TEA1	-Ty Enhancer Activator 1
TEC1	Transposon Enhancement Control
tRNA	-Taşıyıcı Ribonükleik Asit
TPR	-Tetrikopeptid tekrarı
TRA1	-similar to human TRRAP
TUP1	- Timidin Uptake-1
Ty	- Transposon Yeast
TYE7	-Ty mediated expression
UBP8	-UBiquitin-specific processing Protease
URA	- Urasil Sentezi
YNB	- Yeast Nitrogen Base
YPAD	- Yeast Extract Peptone Adenin Dextrose
YPD1	-Tyrosine (Y) Phosphotase Dependent
YP	- Yeast Extract and Peptone
YPD	- Yeast Extract Peptone Dextrose
VLP	- Virus Like Particle
A ₆₀₀	- 600 nm'deki Absorbans
2DOG	- 2-Deoksi-D-Glukoz

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. <i>S. cerevisiae</i> retrotranspozonları ve genel yapıları.....	6
Şekil 2.2. Retrotranspozonların hayat döngüsü.....	8
Şekil 2.3. Ty1’de transkripsiyon kontrol bölgeleri.....	11
Şekil 2.4. Ty1 Promotorunun sekansı ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanma yerleri.....	13
Şekil 2.5. Ty1 retro virüs promotorunda bulunan Blok II bölgesinin sekans dizilimi ve Blok II bölgesinde yer alan MCM1 ve a1/a2 diploid kontrol dizileri.....	15
Şekil 2.6. <i>S. cerevisiae</i> ’de glukoz sinyalinin algılanması ve iletilmesi.....	20
Şekil 2.7. Tup1 faktörüyle etkileşim içinde olduğu bilinen faktörler.....	27
Şekil 2.8. Hiperozmotik strese yanıt olarak genlerin baskılanmasında görev alan faktörler.....	28
Şekil 3.1. Ty1-144’ün kromozom haritasındaki yeri.....	33
Şekil 3.2. Ty1-lacZ gen füzyonunu içeren plazmidin yapısı.....	34
Şekil 3.3. ONPG’nin ayrışması.....	38
Şekil 3.4. Lowry metodu.....	39
Şekil 5.1. Glukoz sinyalinin haploid ve diploid <i>S. cerevisiae</i> hücrelerinde Tup1-Ssn6 kompleksine bağlı olarak Ty1 transkripsiyonunu aktive etme modeli.....	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Ty1' e Bağlandığı Bilinen Transkripsiyon Faktörleri.....	12
Çizelge 2.2. Ssn6-Tup1 kompleksi ile etkileşen gen grupları ve bağlanma proteinleri.....	25
Çizelge 3.1. Bu araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşlarının genotipleri.....	30
Çizelge 4.1. Glukoz sinyalinin haploid ve diploid <i>S. cerevisiae</i> hücrelerinde Ty1 transkripsiyonuna etkileri.....	41
Çizelge 4.2. Tup1 Transkripsiyon Faktörünün Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	42
Çizelge 4.3. Tup1 Transkripsiyon Faktörünün Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	43
Çizelge 4.4. Tec1p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	46
Çizelge 4.5. Tec1p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	47
Çizelge 4.6. Snf3p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	48
Çizelge 4.7. Snf3p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	49
Çizelge 4.8. Snf4p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	50
Çizelge 4.9. Snf4p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	51
Çizelge 4.10. Snf2p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	53
Çizelge 4.11. Snf2p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	54
Çizelge 4.12. Ada2p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	55
Çizelge 4.13. Ada2p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	56
Çizelge 4.14. Mot3p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	57
Çizelge 4.15. Mot3p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	58
Çizelge 4.16. Tye7p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	59
Çizelge 4.17. Tye7p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	60
Çizelge 4.18. Gcn4p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	61
Çizelge 4.19. Gcn4p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	62
Çizelge 4.20. Spt11p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	63

Çizelge 4.21. Spt11p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	64
Çizelge 4.22. Ozmotik Stresin haploid ve diploid <i>S. cerevisiae</i> hücrelerinde Ty1 transkripsiyonuna etkileri.....	66
Çizelge 4.23. Tup1p'nin Ozmotik Strese Yanıt Olarak Haploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	68
Çizelge 4.24. Tup1p'nin Ozmotik Strese Yanıt Olarak Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	69
Çizelge 4.25. Tec1p'nin Ozmotik Strese Yanıt Olarak Haploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	70
Çizelge 4.26. Tec1p'nin Ozmotik Strese Yanıt Olarak Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	71
Çizelge 4.27. Hog1p'nin Ozmotik Strese Yanıt Olarak Haploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	72
Çizelge 4.28. Hog1p'nin Ozmotik Strese Yanıt Olarak Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	73
Çizelge 4.29. Skn7p'nin Ozmotik Strese Yanıt Olarak Haploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	75
Çizelge 4.30. Skn7p'nin Ozmotik Strese Yanıt Olarak Diploid <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.....	76

1- GİRİŞ

Genetik içeriğinin değişmeden korunduğu sanılan kromozom yapısının ve gen ifadelerinin, 1951 yılında McClintock tarafından ilk defa mısır bitkisinde keşfedilen hareketli genetik elementlerce değiştiği bulunmuştur (McClintock 1951, McClintock 1956, Peterson 1970). Bu hareketli genetik elementler, mısır (*Zea mays*) bitkisinden, insana kadar birçok eukaryotik canlıda görülmektedir. Bu elementler, genom içerisinde DNA veya RNA aracılığıyla yer değiştirmelerine göre iki farklı gruba ayrılmış olup, sırasıyla transpozonlar ve retrotranspozonlar olarak adlandırılırlar. *S. cerevisiae* genomunda bulunan, Ty (Transposon Yeast) elementleri retrotranspozonlar grubuna dahil olup 1979 yılında John R. Cameron ve arkadaşları tarafından bulunmuştur (Cameron ve ark. 1979). Ty elementleri retrovirüslere benzemekle birlikte, retrovirüslerden envelop (ENV) proteini kodlamamaları ve enfeksiyona neden olmamalarıyla ayrılırlar (Wickner 1989, Boeke and Sandmeyer 1991, Gabriel and Boeke 1993, Ciriacy 1995, Roth 2000).

Ty elementleri yaklaşık olarak 5.3-6 Kbç uzunlukta ve *S. cerevisiae* genomunun %3.1'ni oluşturan elementlerdir. Ty elementleri 5' ve 3' uçlarında bulunan LTR (Long Terminal Repeats) dizilerine göre 5 farklı sınıfa (Ty1-Ty5) ayrılır. Bu LTR dizileri yaklaşık olarak 335 bç. uzunluğunda olup farklı özelliklerden dolayı Ty1 ve Ty2'de delta, Ty3'te sigma, Ty4'te tau ve Ty5'te pseudo x olarak adlandırılmaktadırlar (Clark ve ark. 1988, Janetzky ve Lehle 1992). Ayrıca Ty1, Ty2 ve Ty4 genom dizilerindeki benzerlik nedeniyle, Retrovirales Ordo'sunun Pseudoviridae Familyasının Pseudovirüs Genusu içerisinde sınıflandırılmışken, Ty3 farklı genom yapısı nedeniyle, Retrovirales Ordo'sunun Metaviridae Familyasının Metavirüs Genusu içerisinde yer almaktadır (Capy 2005). Bu elementlerden Ty1 ve Ty2 birbirlerine %95 homoloji göstermekte olup, Ty1 en fazla transkribe edilen maya retrotranspozonudur.

Bir haploid *S. cerevisiae*'da genom başına Ty ailesi kopya sayısı bir gruptan diğerine değişmektedir. Haploid genom başına yaklaşık 35 adet Ty1, 5-15 adet Ty2, 1-3 adet Ty4 elementi bulunmaktadır (Hansen ve ark. 1988, Farabaugh ve ark. 1989, Janetzky ve Lehle 1992, Voytas ve Boeke 1992). Ty elementlerinin replikasyonları sonucu, mutasyonlar, genom organizasyonları ve cDNA rekombinasyonları meydana gelmektedir. Yapılan araştırmalar, Ty1, Ty2 ve Ty3'ün özel kromozom bölgelerine

integre olduklarını göstermektedir. Ty1 ve Ty3 RNA Pol III tarafından transkribe edilen genlerin 5' bölgesine integre olurken, Ty5 telomerlere yakın integre olmayı tercih etmektedir. Ty elementlerinin transkripsiyonları tek bir RNA pol (RNA pol II) tarafından yapılmakta olup, tek çeşit mRNA sentezlenir. Bu mRNA'nın translasyonu sonucu retrovirüslerdeki gag proteinine analog bir TYA proteini ve pol proteinine analog TYB proteini oluşur (Boeke ve Sandmeyer 1991). TYB proteini TYA-TYB füzyon proteini şeklinde oluşmaktadır. TYA polipeptidinden kesimler sonucu, Virüs benzeri partiküllerin (Ty-VLP) kapsid kısmı oluşturulurken, TYA-TYB füzyon proteini %20 ihtimalle ve ribozomal frameshift sonucu oluşur. Bu füzyon polipeptidinden de kesimler sonucu, proteaz, revers transkriptaz RNaz-H ve integras proteinleri oluşur. Oluşturulan virüs benzeri parçacıkları (VLP) içerisinde iki adet Ty mRNA'sı ve revers transkripsiyonda kullanılmak üzere bir adet tRNA bulunmaktadır (Farabaugh 1995, 1996, Voytas ve Boeke 1993, Roth 2000).

S.cerevisiae eukaryotik bir organizma olması, ucuz olması, kısa hayat döngüsü, haploid ve diploid olarak bulunabilmesi, patojen olmaması gibi nedenlerle uzun süredir eukaryotik moleküler çalışmalarda model sistem olarak kullanılmaktadır. *S. cerevisiae*'nin bu avantajlarının yanı sıra Ty elementlerinin de retrovirüslere benzerlik göstermesi nedeniyle Ty elementlerinin özellikle HIV araştırmaları için model sistem olarak kullanılmasına neden olmuştur.

Maya hücreleri bulunduğu ortamdaki besinleri algılayabilmekte ve gen ifadesini düzenleyerek ortamdaki değişimlere yanıt verebilmektedir. Ortam şartlarındaki değişiklik algılandığı anda bu bilgi nukleusa taşınarak bazı genlerin aktivasyonuna ya da baskılanmasına neden olabilmektedir (Gagiano ve ark. 2002). Örneğin, fermente edilemeyen üreme ortamında üremekte olan *S. cerevisiae* kültürlerine yüksek oranda glukoz (%2) eklendiğinde *S. cerevisiae* genomundaki genlerin yaklaşık %30'unda transkripsiyon seviyesinde artma veya azalma olduğu bulunmuştur (Schneper ve ark. 2004). Araştırmamızda model retrovirüs benzeri element olarak kullanılan Ty1 elementi herhangi bir transkripsiyon faktörü kodlamaz ve transkripsiyonu tamamen konak olarak bulunduğu *S. cerevisiae* tarafından kodlanan faktörlere bağlıdır. Bundan dolayı ortamdaki besin değişimlerine bağlı olarak bazı genlerin aktive edilmesi ya da baskılanması, hücre metabolizmasını ve hücre döngüsünü değiştirerek bu sayede Ty1 gen ifadesini etkileyebilmektedir.

S. cerevisiae'da gen ifadelerini değiştiren metabolik değişikliklerin Ty1'de transkripsiyona etkilerinin olup olmadığını araştırılması Ty elementlerinin retrovirüslere olan benzerliği nedeniyle önem kazanmaktadır. Bu tez araştırmasında Ty1'in transkripsiyonuna çeşitli sinyal iletim yollarının etkileri araştırıldı. Ayrıca haploid ve diploid *S. cerevisiae* suşlarında Ty1 transkripsiyon seviyelerinin farklı olduğunu göz önüne alınarak bu farklılığa neden olan faktörler de incelendi. Yaban tip ve mutant *S. cerevisiae* suşları kullanılarak glukoz sinyal iletim yolunun ve ozmotik stresin haploid ve diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde Ty1 transkripsiyonuna etkileri araştırıldı.

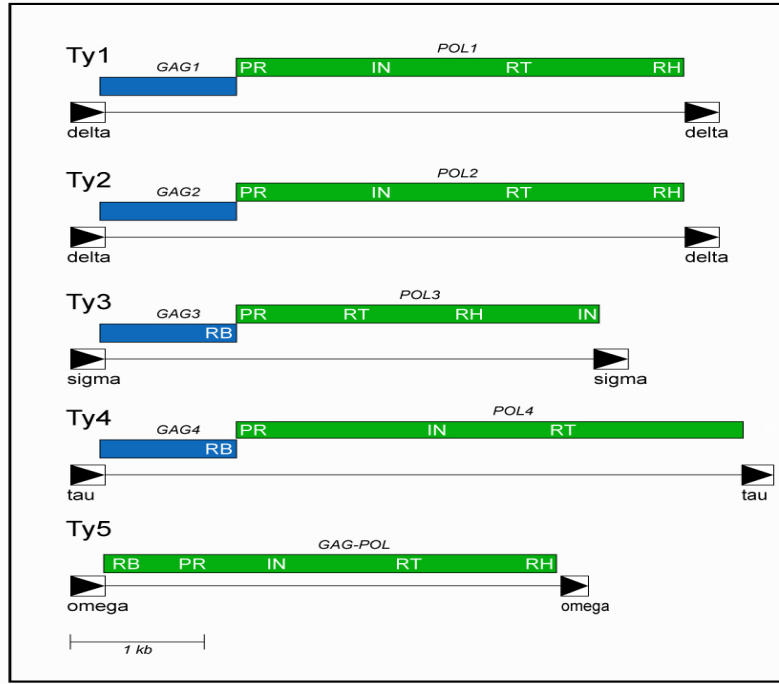
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *S. cerevisiae*'nin Genel Özellikleri

S. cerevisiae 1960'lı yıllardan beri moleküler biyoloji çalışmalarında kullanılan sekans analizi yapılmış ilk eukaryotik bir organizmadır. 16 tane kromozomu, 6275 geni vardır. Bu genlerden 5800 tanesi fonksiyoneldir. Genom büyüklüğü 12,8 Mb'tır. Maya genomu, 120 tane ribozomal RNA geni, 274 tRNA geni 50 kopya kadar da retrotranspozon içermektedir. Maya genlerinin %31'i insan genleriyle homoloji göstermektedir. Haploid hücreler a ve α hücresi olarak ikiye ayrılırken bu iki tip hücrenin birleşmesiyle diploid a/ α hücresi oluşur. Solunum olarak fakültatif aerobik solunum ve anaerobik fermentasyon yapar. Aerobik solunumda, oksijenle şeker kaynağını CO₂ ve ATP'ye çevirirken, aneorobik fermentasyonla şeker kaynağından, gliserol, etanol, süksinat ve CO₂ açığa çıkar. Besin ve enerji olarak tercih ettiği karbon kaynağı glukozdur. Heksoz şekerlerin yanı sıra, biyopolimer, pentoz, alkol, poliol, hidrokarbon, yağ asidi ve organik asitleri gibi geleneksel olmayan karbon kaynaklarını da kullanabilir. Ayrıca, farklı organik ve inorganik azot kaynaklarını da kullanabilmektedir. Sekans analizinin tamamlanmış olması ve genlerin %90'nın mutant olarak suşlarının bulunabilmesi eukaryotik organizmalara model olarak kullanılması için büyük avantajdır. Ayrıca, *S. cerevisiae* hücrelerinin kolay uygulama yapılabilen bir organizma olması, kısa hayat döngüsünün olması, haploid ve diploid olarak bulunabilmesi, transformasyonunun kolay olması, üreme ortamının ucuz ve basit olması, patojenik veya toksik olmaması, endüstride kullanılan bir organizma olması nedeniyle de tercih edilmektedir (Feldmann 2005).

2. 2. Ty Elementlerinin Genel Özellikleri

Ty (Transpozon yeast) elementleri, *S. cerevisiae* genomundaki bazı genlerin promotor veya yapısal bölgelerinde de bulunan hareketli genetik elementlerdir. Bu elementler genom içinde RNA aracılığı ile bir kromozom bölgesinden başka bir bölgeye veya başka bir kromozoma aktarılmaktadır (Boeke ve Sandmeyer 1991). Bu özellikleri nedeniyle retrovirüslere benzemekle birlikte envelop (ENV) proteini kodlamaz ve enfeksiyona neden olmazlar (Wickner 1989, Boeke ve Sandmeyer 1991, Gabriel ve Boeke 1993, Ciriacy 1995, Roth 2000). Yapılan çalışmalar Ty retrotranspozonlarının sitoplazmada virüs benzeri partiküller oluşturduklarını göstermiştir (Garfinkel ve ark. 1985). *Saccharomyces cerevisiae* genomunda 5 farklı tip Ty elementi (Ty1-Ty5) bulunmaktadır. Haploid *S. cerevisiae* hücresinde, yaklaşık olarak 25-35 adet Ty1, 5-15 adet Ty2, 2 adet Ty3, 1-3 adet Ty4 ve 1 adet Ty5 elementi bulunmaktadır (Hansen ve ark. 1988, Farabaugh ve ark. 1989, Janetzky ve Lehle 1992, Voytas ve Boeke 1992, Kingsman ve ark. 1981, Curcio ve ark. 1990). Bu elementler 5' ve 3' uçlarında yaklaşık olarak 335 bç. uzunluğunda uzun direkt tekrarlı bölgeler (Long Terminal Repeats, LTR) taşımaktadır (Şekil 2.1). Ty elementlerinin DNA uzunlukları yaklaşık olarak 6 kilobaz çiftidir (Kbç). Ty1 ise en fazla transkribe edilen maya retrotranspozonudur. Ty1 ve Ty2'nin %95 homoloji gösterdiği bilinmektedir. Ty elementleri *S. cerevisiae* genomunda tam Ty elementi olarak ya da aynı veya farklı Ty elementleri arasındaki rekombinasyonlar sonucu sadece LTR bölgelerinden (solo LTR's) oluşan kısa parçalar olarak bulunmaktadır (Roeder ve ark. 1980, Scherer ve Davis 1980, Sutton ve Liebman 1992). *S. cerevisiae* genomundaki tam Ty elementi ve LTR dizilerinin toplamı 331'dir ve genomun yaklaşık olarak %3.'ünü oluşturur (Kim ve ark. 1998). *S. cerevisiae*'daki toplam RNA miktarının yaklaşık %30'unun Ty mRNA'sından oluştuğu bilinmektedir (Elder ve ark. 1983).

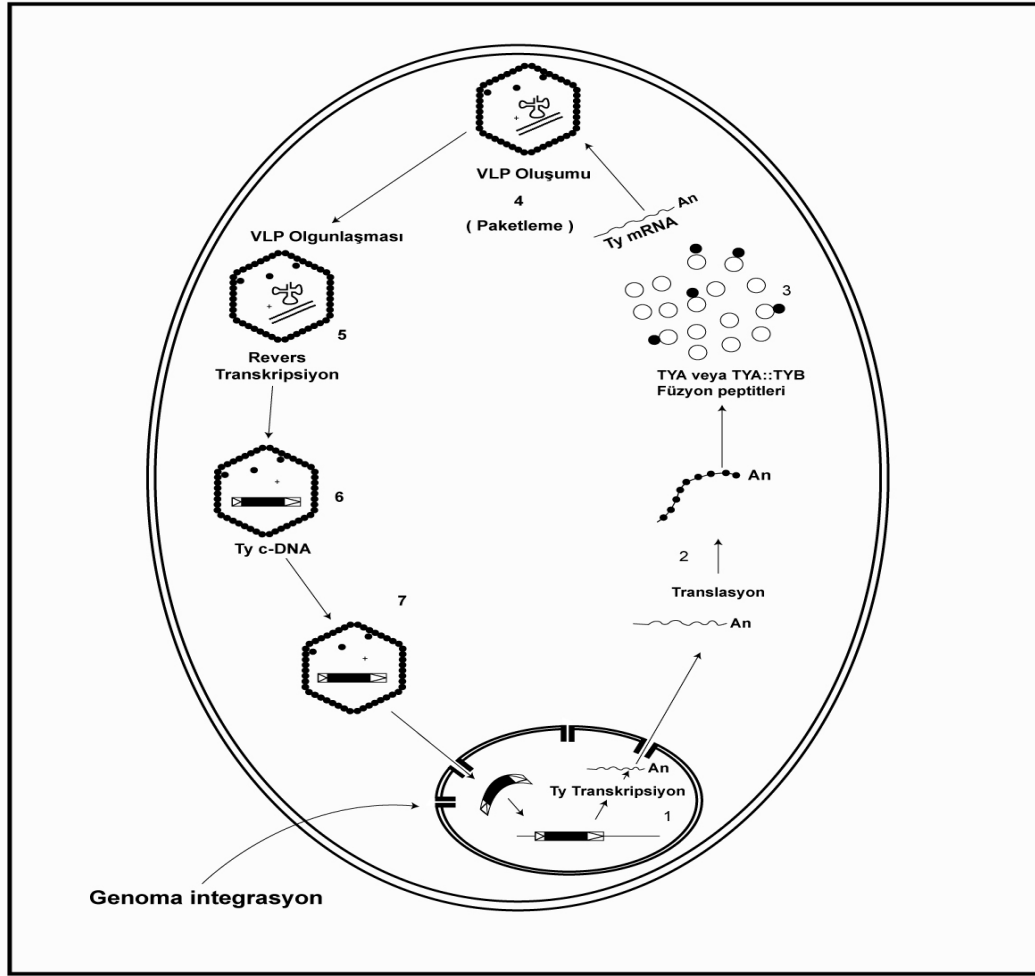


Şekil. 2. 1. *S. cerevisiae* retrotranspozonları ve genel yapıları.

Ty elementinin hayat döngüsü genomik retrotranspozon DNA'sının RNA polimeraz II aracılığıyla transkripsiyonu ile başlar ve tek çeşit mRNA transkribe edilir. (Boeke ve Stoye 1997, Jerome ve Jaehning 1986, Nonet ve ark. 1987). Transkripsiyon 5' LTR'daki promotor tarafından başlatılır ve 3' LTR'da sonlanır (Şekil 2. 2). Ty mRNA'larının translasyonu sonucu ilk olarak 58 kDa'luk TYA veya 190 kDa'luk TYA-TYB füzyonu şeklinde iki polipeptid oluşur. TYA, retroviral gag genine analogtur ve Ty Virüs Benzeri Partiküllerin (Ty-VLP) kapsid kısmını oluşturan proteinleri kodlamaktadır. TYB ise retroviral pol genine analogtur ve proteaz (pr), integraz (in), revers transkriptaz (rt) ve RNase H (rh) enzimlerini kodlamaktadır (Boeke ve Sandmeyer, 1991). Gag ve Pol proteinleri miktarları arasında belirli bir oran vardır. Bunun sebebi, virüs benzeri parçacık oluşumu için gerekli Gag proteini miktarının revers transkripsiyon ve integrasyonun enzimatik basamakları için gerekli olan Pol proteini miktarından daha fazla olmasıdır. Bu oranı düzenlemek için farklı stratejiler geliştirmiş olsa da bunlardan en yaygın olarak kullanılan strateji frameshifttir. TYB polipeptidi translasyon sırasında %5-20 ihtimalle gerçekleşen ribozomal frameshift sonucu TYA-TYB füzyonu olarak transle edilmektedir (Clare ve Farabaugh 1985,

Farabaugh 1995, 1996). Frameshift, retrovirüslerde tRNA'nın simültane olarak bir nükleotit geri yani -1 yönde kaymasıyla gerçekleşirken; Ty1 ve Ty2 maya retrotranspozonlarında tRNA'nın bir nükleotit ileri yani +1 yönde kaymasıyla gerçekleşir. Ty1 ve Ty2 elementlerinde programlı frameshift TYA ve TYB bölgelerinin çakıştığı 7 nükleotitli korunmuş CUU-AGG-C dizisi sayesinde yönlendirilir. AGG kodonuyla kodlanan Arjinin taşıyan tRNA az bulunduğundan translasyon sırasında ribozomda kısa bir duraksama olur bu yüzden ribozom bir nükleotit ileri kayarak UUA lösin kodununun lösin taşıyan tRNA ile etkileşmesine neden olur. Ty1'de frameshift gerçekleşme oranı %25-30'dur ve frameshift sonucu TYA-TYB füzyon proteini sentezlenir. Bu frameshit mekanizması Ty1,Ty2 ve Ty4 'de benzerken. Ty3' de GCG-AGU-U heptanükleotitinde az bulunan AGU serin kodonu yüzünden ribozomal bir duraksama olur ve frameshift mekanizması, hem translasyonel duraksama hem de frameshift alanına uzaktaki 12 nükleotit aracılığıyla uyarılmaktadır. Ty5 ise fonksiyonel bir element olmadığı için frameshift mekanizması anlaşılamamıştır. Oluşan TYA ve TYA-TYB füzyon proteinleri daha sonra proteaz enzimi aktivitesi ile olgun proteinlere dönüştürülmektedir (Farabaugh 1995, 1996).

Bu işlemler sonucunda Ty elementleri *S. cerevisiae* sitoplazmasında eukaryotik retrovirüslerde olduğu gibi virüs parçacıkları oluştururlar. Bu Ty-VLP'de iki adet Ty mRNA'sı ve revers transkripsiyonda primer olarak kullanılmak üzere bir tRNA molekülü bulunur. VLP'de mRNA'nın revers transkripsiyonunda primer olarak kullanılan tRNA'nın türü retrovirüs türüne göre değişmektedir. Ty1-VLP'de primer olarak kullanılan tRNA normal olarak *S. cerevisiae*'da translasyon sırasında metionin taşıyan tRNA_{met}'dir (Voytas ve Boeke 1993, Roth 2000). Proteinlerin yanı sıra, nükleik asitler de Ty1-VLP'lerin içinde paketlenmiş olarak bulunmaktadır. Olgun virüs benzeri parçacığın (VLP) oluşmasının ardından revers transkripsiyonla kopya DNA'sı (cDNA) sentezlenir ve bu Ty cDNA'sı nukleusa geçerek *S. cerevisiae* genomuna integre olur. İntegrasyon integras enzimi sayesinde gerçekleşmektedir.



Şekil 2. 2. Retrotranspozonların hayat döngüsü.

Ty RNA polimeraz II tarafından transkribe edilir. 1-Ty mRNA'sının translasyonu yapılır. Bu sırada +1 yönde ribozomal Frameshift olayı gerçekleşir. 2-TYA::TYB füzyon proteinleri bir araya gelerek VLP'leri (Virüs Benzeri Parçacıkları) meydana getirir. 4-Daha sonra VLPlerde TYA::TYB füzyon proteininin yine bu protein tarafından kodlanan Proteaz enzimi ile parçalanmasıyla Reverstranskriptaz, İntegraz, RNAaz H gibi fonksiyonel enzimler açığa çıkar. 5- Reverstranskriptaz tarafından Ty DNA'sından Ty cDNA'sı sentezlenir. 6- VLP açılır ve Ty cDNA'sı İntegraz enzimi ile kompleks oluşturur.7-İntegraz hedef DNA bölgesinde bir kesik yapar ve böylece Ty DNA'sı integrazın aracılığıyla yeni genomik bölgeye entegre olur (Boeke ve ark. 1985).

Ty retrotranspozonları *S. cerevisiae*'nin araştırılan hemen hemen bütün suşlarında bulunmuştur. Doğada Ty elementi içermeyen *S. cerevisiae* suşları çok az sayıdadır (Garfinkel ve ark. 2003). Ty elementleri hücreler arası enfeksiyonla yayılamaz. Buna rağmen *S. cerevisiae* hücrelerinin sıklıkla haploid ve diploid aşamalara girmeleri Ty

retrotranspozonlarının da *S. cerevisiae* populasyonlarında yayılmasına neden olur. Ty elementlerinde normal olarak transpozisyon frekansı 10^{-4} - 10^{-5} /jenerasyondur. Bu yer değiştirme en iyi olasılıkla onbin ile yüzbin hücreden birinde her bölünmede bir yerdeğiştirme demektir (Boeke ve ark. 1985). Transpozisyon frekansı bazı mutajenik etmenlerce aktive edilebilir (Staleva ve Venkov 2001).

2. 1. 1. Model Sistem Olarak Retrotranspozonlar

Genomik sekans analizi projelerinin tamamlanmasıyla, çoğu organizmanın genomlarında yüksek oranlarda transpozisyonla yer değiştirebilen hareketli elementler içerdikleri ortaya çıkmıştır. Örnek olarak; *Drosophila melanogaster* genomunun %22'si (Kapitanov ve Jurka 2003), insan genomunun ise %44'ü (Lander ve ark. 2001) bu transpoze olabilen elementlerden oluşmaktadır. Retroelementler ise genomda RNA aracılığıyla yer değiştirebilen elementlerdir ve mısır bitki genomunun %50'si (SanMiguel ve ark. 1996), insan genomunun %34'ünü (Lander ve ark. 2001), *Saccharomyces cerevisiae* genomunun ise %3 gibi az bir miktarını oluşturmaktadır (Kim ve ark. 1998). *S. cerevisiae* genomunda bulunan retrotranspozonlar Ty (Transpozon Yeast) adını alırlar ve retrovirüslere benzerlikleri nedeniyle ve retrovirüs araştırmaları tehlikeli ve masraflı olduğu için onlara model olarak kullanılırlar. Bunun yanı sıra, konak oldukları maya *S. cerevisiae* hücrelerinin kolay uygulama yapılabilen bir organizma olması, kısa hayat döngüsünün olması, haploid ve diploid olarak bulunabilmesi, transformasyonunun kolay olması, üreme ortamının ucuz ve basit olması, patojenik veya toksik olmaması, endüstride kullanılan bir organizma olması nedeniyle de tercih edilmektedir. *S. cerevisiae*'nin bu avantajları ve Ty retrotranspozonlarının retrovirüslere benzerlikleri nedeniyle bu elementlerin gen yapıları, gen ifadesi, genomdaki dağılımları ve genomda oluşturdukları mutasyon tipleri gibi olayların moleküler prensipleri *S. cerevisiae*'da yaygın olarak araştırılmaktadır.

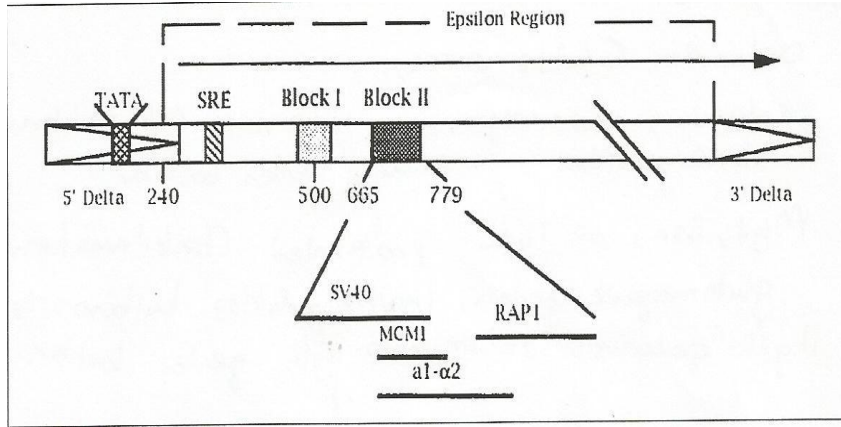
Retrovirüslerde mRNA'dan cDNA sentezi ve cDNA'nın genoma tekrar integrasyonu için gerekli olan enzimler proteaz, reverse transkriptaz, integraz, ve RNase H retroviral mRNA'nın POL olarak adlandırılan bölgesinden sentezlenir (Jacks ve ark. 1988). Retrovirüslerin hücre içinde çoğalmasının önlenmesi için frameshiftin önlenmesi gerektiği öne sürülmekte ve frameshifti engelleyecek anti-retroviral bileşik

araştırmalarında yapı olarak HIV'e benzeyen ancak onun gibi patojen olmayan Ty elementleri model olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar anisomycin benzeri antibiyotik olan preussin'nin frameshift bölgesinde kodonda –1 yönde 1 nükleotid kayma şeklinde olan frameshift'i durdurabildiğini göstermiştir (Dinman ve ark. 1998). Bu araştırmalar ayrıca HIV-Ty gen füzyonları yapılarak da gerçekleştirilmektedir. HIV virüsüne en çok benzeyen Ty elementi Ty3'tür. Ty elementlerinde retrovirslerin konak hücre genomuna nasıl integre olduğuna dair çalışmalar da gerçekleştirilmektedir. Bu alışmalar Ty elementlerinin genomda genellikle kodlama bölgeleri dışına integre olduklarını göstermiştir (Eibel ve Philippsen 1984, Ji ve ark. 1993). Ty3 retrotranspozonlarının ise en sık görüldüğü bölgeler tRNA genlerinin promotor bölgeleridir (Chalker ve ark. 1992, Devine ve Boeke 1996). Ty3'n bu rastgele olmayan integrasyonun nedeni heterokromatin yapısında bulunan Sir4 proteini ile integrasyonun etkileşimi nedeni ile olduğu görülmüştür (Zhu ve ark. 2003).

2. 1. 2. Ty1 Elementlerinin Genetik Yapısı

Ty1 elementi, 5,3 kb uzunluğunda internal kodlama bölgesi olan ve her iki ucunda δ (delta) adı verilen 335 b uzunlukta uzun tekrarlı dizilerden (LTR) oluşmaktadır (Boeke ve Sandmeyer, 1991). Internal bölge TY1A ve TY1B adı verilen, gag ve pol genlerine analog olan iki adet kodlama bölgesi içerir. Ty1 elementi, bir LTR'den diğer bir LTR'ye doğru RNA polimeraz II aracılığıyla transkribe edilir. Ty1 promotoru kompleks bir yapıdadır ve gelişmiş eukaryotlara oldukça benzemektedir. Promotor kısmı 1kb uzunluğundadır ve upstream ve downstreamde bulunan iki TATA kutusu yapısı ile 5' LTR ve TY1A açık kodlama bölgesini içermektedir. Yapılan moleküler analizler sonucu, Ty1 elementinin transkripsiyon birimi içerisine yerleşmiş çok sayıda düzenleyici bölgeler bulunmuştur. Bunlar Ty1 elementinin 5' ucuna doğru 1 kb'lık alana yerleşmiş durumdadırlar (şekil 2.3.). Bu düzenleyici bölgelerden birisi Ty promotununun 5' ucuna doğru bulunan A bölgesidir. SRE (Steril Response Element) veya FRE (Filamentation Responsive Element) adıyla da bilinen bu bölgeye Ste12 ve Tec1 transkripsiyon aktivatörleri bağlanır. A bölgesi Ty1 virüsünün transkripsiyonunu haploid maya hücrelerinde, mating feromonuna yanıt olarak aktive eder (Company ve Errede. 1987, 1988, Company ve ark. 1988, Kurjan, 1992). Diğer düzenleyici bölgeler

ise Ty1 transkripsiyonu başlama bölgesinin birkaç yüz baz çifti ilerisindeki Blok I ve Blok II bölgeleridir (Şekil 2.3). Bu düzenleyici bölgelerden Blok I Ty1 transkripsiyonu aktivasyonu için gereklidir; Blok II kontrol bölgesi ise üst üste çakışmış, *Simian Virus 40* (SV40) enhancer core, $\alpha 1$ - $\alpha 2$ diploid kontrol dizisi, RAP1 ve MCM1 tanıma dizisine (veya P bölgesi) homoloji gösteren düzenleyici bölgeler içerir. Bu dizilerin Ty1 transkripsiyonu üzerindeki etkileri tam olarak bilinmemekle birlikte $\alpha 1$ - $\alpha 2$ heterodimerinin bu bölgeye bağlanmasıyla diploid maya hücrelerinde Ty1 transkripsiyonununun 5-20 kata kadar azaldığı bildirilmiştir (Company ve ark. 1987, Gray ve Fassler 1993).



Şekil 2.3. Ty1'de transkripsiyon kontrol bölgeleri

Ty1 promotoruna en azından 8 adet transkripsiyon faktörü bağlanmaktadır (Çizelge 2.1. ve Şekil 2.4.). Bunlar; Gcr1, Ste12, Tec1, Mcm1, Tea1, Rap1, Gcn4 ve Mot3'tür (Laloux ve ark. 1990, Madison ve ark. 1998, Morillon ve ark. 2000, 2002, Türkel ve ark. 1997). Ayrıca, üç adet kromatin düzenleyici kompleksin haploid hücrelerde Ty1 transkripsiyonunu düzenlediği bilinmektedir. Bunlar; Swi/Snf, SAGA ve ISWI kompleksleridir (Ciriacy ve ark. 1991, Grant ve ark. 1997, Happel ve ark. 1991, Kent ve ark. 2001, Pollard ve ark. 1997). Swi/Snf ve SAGA kompleksleri Ty1 elementlerinin transkripsiyonlarını aktive ettiği bilinmektedir. Bunun aksine ISWI kompleksi elemanları Isw1 ve Isw2 ise Ty1 transkripsiyonunu engellemektedir. Bazı Ty elementleri, özellikle de yüksek miktarlarda ifade edilenler, 5' LTR bölgelerinde beş adet potansiyel Gcn4 bağlanma bölgesi içerirler. Fazla miktarlarda ifade edilen Ty1

elementlerinin transkripsiyonu, amino asit yokluğunda Gcn4 aracılığıyla olur (Morillon ve ark. 2002).

Transkripsiyon Faktörü	Bağlanma dizisi	Ty1'de bağlandığı konum	Referans
Tec1	GAATA GAATG	417,421	Morillon ve ark.2002
Ste12	<u>CGTTTCA</u>	395,401	Morillon ve ark. 2000
Gcr1	TGGAAGCC	114,120	Servant ve ark.2008
Mot3	(A/T)AGG(A/T/G)(A/T)	129,134 146,151	Madison ve ark. 1998
Tye7	ACACCTGC CCACCTGG TCACCTGA	463,468 661,666 727,732	Servant ve ark. 2012
Rap1	AAACCCGTA CGTCA	912,925	Gray ve Fassler 1996
Mcm1	CCAAATGGGA	834,850	Yu ve Fassler 1992
Tea1	CGGTGGTATTATTCCGA	884,900	Gray ve Fassler 1996
Gcn4 ^A	AAATCA	12,17	Morillon ve ark.2002
Gcn4 ^B	TGACGC	79,84	Morillon ve ark.2002
Gcn4 ^C	TAGTCA	98,103	Morillon ve ark.2002
Gcn4 ^D	TGAATA	155,160	Morillon ve ark.2002
Gcn4 ^E	CATTCA	318,323	Morillon ve ark.2002
a1/a2	GACTTTCCAAATTGGGTAAAACATACATCAAA	830,863	Yu ve Fassler 1993

Çizelge. 2.1. Ty1' e Bağlandığı Bilinen Transkripsiyon Faktörleri

Ty1 transkripsiyonu ve mobilitesi, ionize radyasyon, DNA hasarı, azot açlığı ve şiddetli adenin açlığı gibi farklı çevresel stresler aracılığıyla aktive edilir (Bradshaw ve

ve Mcentee 1989, McClanahan ve Mcentee 1984, Morillon ve ark. 2000, Rolfe ve ark. 1986, Sacerdot ve ark. 2005, Staleva ve Venkov 2001, Todeschini ve ark. 2005). Son yapılan çalışmalar ile Tye7 (Sgc1) transkripsiyon faktörünün Ty1 antisense transkripsiyonunu düzenlediği bulunmuştur (Servant ve ark. 2012). Ty1 transkripsiyonunun invazif/ filament yolağı tarafından azot açlığı gibi, çevresel sinyallere yanıt olarak aktivasyonu, Ste12 ve Tec1 transkripsiyonal aktivatörleri sayesinde gerçekleştirilir (Conte ve ark. 2000, Morillon ve ark. 2000). Bu proteinler, Ty1 promotorunun TATA kutularının 5' ucunda olan TY1A dizilerine yerleşmiş FRE dizilerini tanıyıp etkileşime geçmektedirler (Şekil 2.4.) (Baur ve ark. 1997). Ste12 ve Tec1, invazif/ filament sinyal yolağı aracılığıyla Ty1 aktivasyonunu sağlamanın yanında, haploid hücrelerdeki bazal seviyelerde Ty transkripsiyonu için de önemlidir (Laloux ve ark. 1990, Morillon ve ark. 2000).

```

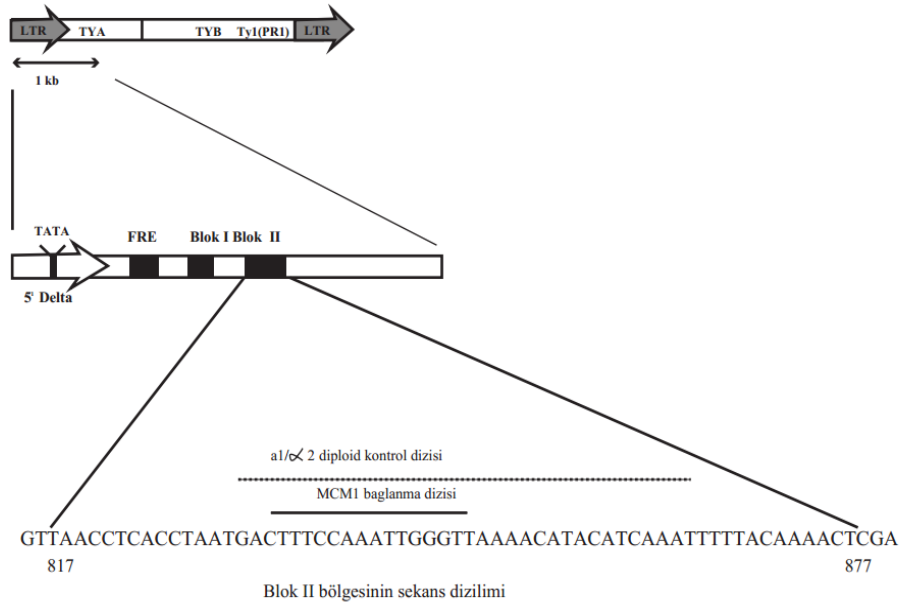
1... TGTGGAATA GAAATCACT ATCATCTACT AACTAGTATT TACATTACTA
GCN4A
51... GTATATTATC ATATACGGTG TTAGAAGA TCG ACGCAAATGA TGAGAAA TCG
GCN4B GCN
101... TCACTCTAAAT TAG TGGAAGC TGAACGCGAA GGATTGATAA TGTAATAGGA
4C GCR1 MOT3 MOT3
151... TCAATGAAAT TAAACATATA AAATGATGAT AATAATATTT ATAGAATTGT
GCN4D TATA TATA
201... GTAGAAITGC AGATTCCCTT TTATGGATT C TAAATCCTT GAGGAGAACT
251... TCTAGTATAI ICTGTATACC TAATATTATA GCCTTATCA ACAATGGAAT
301... CCCAACAAIT ATCTCAA GAT TCA CCCATTI CTCATGGTAG GGCCTGTGCT
GCN4E
351... TCGGITACTI CTAAGGAAGT CCACACAAAT CAAGATCCGT TAGA GGTTC
STE12
401... TGCCTCCAAA ACAGAA GAAT GTGAGAAGGC TTCCACTAAG GCTAACTCTC
TEC1
451... AACAGACAA CACCGTGT TCATCAGCTG TTCCAGAGAA CCCCATCAT
TYE7
501... GCCTCTCCTC AACTGCTCA GTCACATTCA CCACAGAATG GGCCGTACCC
551... ACAGCAGTGC ATGATGACCC AAAACCAAGC CAATCCATCT GGTGGTTCAT
601... TTTACGGACA CCCATCTATG ATTCCGTATA CACCTTATCA AATGTCGCCT
651... AIGTACTTTC CACCTGGGCC ACAATCACAG TTTCCGCAGT ATCCATCATC
TYE7 SKN7
701... AGTTGGAAGC CCTCTGAGCA CTCCA TCACC TGA GTCAGGT AATACATTTA
TYE7
751... CTGATTCAIC CTCAGCGGAC TCTGATATGA CATCCACTAA AAAATATGTC
801... AGACCACCAC CAATGTTAAC CTCACCTAAT GACTTTCCAA ATGGGTAA
SV40 a1/α2 MCM1
851... AACATACATC AAATTTTTAC AAAACTCGAA TCT GGTGGT ATTATTCCGA
a1/α2 TEA1
901... CAGTAAACGG AAAACCCGTA CGTCAGATCA CTGATGATGA ACTCACCTTC
RAP1
951... TTGTATAACA CTTTTCAAAT ATTTGCTCCC TCTCAATTCC TACCTACCTG
1001... GGTCAAAGAC ATCCTATCCG TTGATTATAC GGATATCATG AAAATCTTTT

```

Şekil 2.4. Ty1 Promotorunun sekansı ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanma yerleri

Ty ya da δ dizisinin, bir genin promotor dizisine insersiyonu sıklıkla komşu genlerin transkripsiyonlarını değiştirir ya da bozar. Bu tarz bir bozulma büyük ihtimalle Ty elementinin güçlü transkripsiyon sinyallerinin komşu geni etkilemesiyle gerçekleşir. SPT (Supressor of Ty) genleri, *S. cerevisiae*'da, Ty transpozonunun insersiyonu ile bozulmuş gen ifadesinin onarılmasını sağlayan mutasyonların genetik taramasıyla ortaya çıkmıştır. Tüm *Spt* mutantlarında Ty veya δ transkripsiyonlarının azaldığı, komşu genlerin transkripsiyonlarının eski hale geldiği gözlenmiştir. SPT genleri, ilave mutasyon fenotiplere ve insersiyon mutasyonların farklı baskılanma modellerine göre birkaç gruba ayrılmıştır. Bunlardan *SPT4*, *SPT5*, *SPT6*, *SPT11* ve *SPT12* mutasyonlarının oluşturduğu "histon grubu" solo δ insersiyon mutasyonlarını kuvvetli bir şekilde baskımlarken, Ty insersiyon mutasyonlarını zayıf bir şekilde baskıladığı görülmüştür. *SPT11* ve *SPT12* genleri H2A ve H2B histon proteinlerini kodlamaktadır. Histon genlerindeki bozulma ya da histon proteinlerinin fazlaca üretilmesi, nükleozom yapılarında ve Ty insersiyon bölgeleri de dahil bazı lokuslarda transkripsiyon seviyelerinin değişmesine neden olur (Winston, 1992). Histon grubu bu genlerin ayrıca *SNF2*, *SNF5* ve *SNF6* genlerini baskıladığı bulunmuştur. *SPT13* supresör geninin ise MCM1 aktivitesini negatif olarak etkilediği bilinmektedir (Yu ve ark. 1993).

Mcm1 transkripsiyon faktörü, arjinin metabolizması, mating tipi belirlenmesi, hücreye özel gen ifadesi ve hücre döngüsü gibi farklı prosesleri kontrol etmektedir. Bu işlemlere ek olarak Mcm1p Ty1 elementlerinin transkripsiyonunu kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. MCM1 mating-gen promotorlarına, *STE12*, $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ gibi koaktivatör ve represörlerle bağlanırken, Ty1'de bu DNA bağlanma proteinleri olmadan bağlandığı düşünülmektedir. Bu yüzden de MCM1'in Ty1 transkripsiyonundaki rolünün mating gen transkripsiyonundaki rolünden farklı olduğunu düşündürmektedir. (Şekil 2.5.) (Errede ve ark. 1993, Koranda ve ark. 2000, Kumar ve ark. 2000, McInerny ve ark. 1997, Pic ve ark. 2000, Yu ve ark. 1993, Zhu ve ark. 2000).



Şekil. 2.5. Ty1 retrovirüs promotorunda bulunan Blok II bölgesinin sekans dizilimi ve Blok II bölgesinde yer alan MCM1 ve a1/α2 diploid kontrol dizileri.

2.1.3. Ty1 Transkripsiyonunun Hücre Tipine Özel Kontrolü

S. cerevisiae, hücre tipine özel gen ifadelerini kontrol eden olayların çalışılması için bir model sistem olarak kullanılmaktadır. Mayalarda, üç farklı özelleşmiş hücre tipi bulunmaktadır. Bunlar, birbirleriyle eşleşmek için özelleşmiş olan a ve α tipi haploid hücrelerle, mayoz ve sporulasyon için özelleşmiş olan a/α diploid maya hücreleridir (Herskowitz 1986, Nasmyth ve Shore 1987, Company ve Errede 1988). *MAT*, mating tip lokusu tarafından kodlanan proteinler, mayanın hücre tipini belirler. *MATα*, α1 ve α2 DNA bağlanma proteinlerini kodlarken, *MATa* ise α1 DNA bağlanma proteinini kodlamaktadır. Haploid (a, α,) yada diploid (a/α) spesifik genler bu proteinlerin bulunup bulunmamasına göre ifade edilmektedir (Herskowitz, 1989, Sprague, 1990). Bu proteinlerden α1, α-spesifik genlerin pozitif regülatörü iken, α2 proteini ise a-spesifik genlerin negatif regülatörüdür (Bender ve Sprague 1987, Johnson ve Herskowitz 1985). *MATa/MATα* diploid hücrelerde α1 ve α2 proteinlerinin ikisi de kodlanır. Bu proteinler birlikte, *MATα1*, *STE12* gibi haploid spesifik genlerin yanında Ty virüsü ve Ty virüsü tarafından düzenlenen genlerin ifadesini baskılamaktadır (Elder ve ark. 1981, Errede ve

ark. 1980, Fields ve Herskowitz 1987, Goutte ve Johnson, 1988, Klar ve ark. 1981, Jensen ve ark. 1983, Nasmyth ve ark. 1981, Taguchi ve ark. 1984).

Ty retrotranspozonlarının, a ve α tipi haploid maya hücrelerinde, diploid a/ α maya hücrelerine göre 5 ila 20 kat arasında değişen bir oranda daha iyi ifade edildiği bilinmektedir (Elder ve ark. 1981). Bazı Ty promotörü insersiyon mutasyonları, komşu genlerde hücre tipine özel ifadelerle sebep olmaktadır (Errede ve ark. 1980, Taguchi ve ark. 1984). Hücre tipi büyük oranda *MAT α* tarafından kodlanan $\alpha 2$ represör proteini tarafından kontrol edilmektedir. Haploid α hücrelerinde ve diploid a/ α hücrelerinde $\alpha 2$ dimer proteinleri, Mcm1 protein dimerleri ile birleşir ve a hücrelerine spesifik genlerin 5' ucuna yakın kısmında özel bir diziyeye bağlanarak bu genlerin transkripsiyonunu baskılamaktadır (Johnson ve Herskowitz 1985, Keleher ve ark. 1988). Diploid hücrelerde ise $\alpha 2$, a1 proteini ile heterodimer oluşturmaktadır (Dranginis 1990) ve bu kompleks haploid spesifik genlerin 5' ucuna yakın ayrı bir diziyeye bağlanarak bu genlerin transkripsiyonlarının baskılanmasına neden olur (Goutte ve Johnson 1988). Mcm1 proteini de a1 proteini de Ssn6-Tup1 kompleksiyle $\alpha 2$ proteini aracılığıyla etkileşmektedir (Keleher ve ark. 1992, Komachi ve ark. 1994, Smith ve ark. 1995). Mcm1p ve Ste12p haploid a hücrelerinde a-spesifik genlerin aktivasyonunda görevlidir (Dolan ve Fields 1991). Ste12p, Mcm1p ile birlikte $\alpha 2$ operatörünün 3' ucuna doğru yerleşmiş olan Pheromone Response Element (PRE) bağlanmaktadır (Errede ve Ammerer 1989, Hwang-Shum ve ark. 1991, Mueller ve Nordheim 1991). STE12, matingte görevli bazı genlerin ifadesini tetikleyen feromon yanıt yolağı ile etkileşim içindedir (Dolan ve ark. 1989, Errede ve Ammerer, 1989, Song ve ark. 1991).

2.2. *S. cerevisiae*'da Farklı metabolik yolların Etkileri

2.2.1. *S. cerevisiae*'da Glukozun Metabolik Etkileri

S. cerevisiae, glukozun eukaryotik organizmalarda etkilerinin incelenmesi için uygun bir model sistemdir. Glukoz, mikroorganizmaların çoğunda olduğu gibi, *S. cerevisiae* için de tercih edilen bir karbon ve enerji kaynağıdır. Ayrıca, önemli bir primer sinyal molekülü olarak, *S. cerevisiae* metabolizmasını ve üremesini ortam şartlarına yanıt olarak düzenlemekte ve üreme hızı, fermentasyon kapasitesi, stres direnci gibi önemli ticari özelliklerini de etkilemektedir. *S. cerevisiae* kültürlerine glukoz ilave edilmesi sonucu, 20 dakika içinde *S. cerevisiae* genomundaki genlerin yaklaşık %20'sinde, yani 1200 gende üç kattan fazla ifade değişikliği olurken, genlerin yaklaşık %40'ında ise en azından iki kat ifade değişikliği olmaktadır (Wang ve ark. 2004). Glukozun alınımı ile glikolitik genler ve ribozomal protein (RP) genleri uyarılarak gen ifadelerinde aktivasyon ya da baskılanma gerçekleşir (Schneper ve ark. 2004). Üreme ortamında yüksek oranlarda (%2) glukoz bulunması ile alternatif karbon kaynaklarının kullanımı için gerekli olan genler ve bazı mitokondriyal genlerin baskılanması olayına "Glukoz Baskılaması" veya represyon denir. Glukoz baskılamasında görevli olan temel faktörler Mig1 transkripsiyonal baskılama kompleksi, Snf1-protein kinaz kompleksi ve protein fosfataz I'dir. Mig1 çinko parmak motif yapısındaki bir DNA bağlanma proteindir ve hedef genlerin baskılanması için Ssn6 ve Tup1 genel ko-represör proteinleri ile etkileşmektedir (Treitel ve Carlson 1995). Mig1p'nin hücre içindeki yeri de glukoz miktarına göre düzenlenmektedir. Ortamda yüksek glukoz bulunduğunda Mig1p sitoplazmadan nükleusa geçerek hedef genlerin promotorlarına bağlanıp baskılanmaya neden olur. Ortamda glukoz tüketildiğinde ise Mig1p nükleustan tekrar sitoplazmaya taşınır (DeVit ve ark. 1999) ve hedef genlerdeki baskılanma kalkar bu olaya derepresyon denir. Derepresyon sonucu, glukozla baskılanan genlerin yeniden transkripsiyonu Snf1-protein kinaz kompleksi aracılığıyla sağlanmaktadır. Snf1 kompleksi maya hücrelerinin glukozun az olduğu ortama adapte olması ve sukroz, galaktoz, etanol gibi daha az tercih edilir alternatif karbon kaynaklarının kullanılmasında görev almaktadır (Gancedo 1998, Carlson 1999). Snf1 PK kompleksi ayrıca, besinsel yanıt, mayoz bölünme ve sporulasyon gibi hücresel

gelişimle ilgili işlemler (Honigberg ve Lee 1998), yaşlanma (Ashrafi ve ark. 2000), haploid invazif üreme (Cullen ve Sprague 2000) ve diploid psödohifsel üremede (Kuchin ve ark. 2002) rol oynamaktadır. Ayrıca, genomik transkripsiyonal programı kontrol ederek ve metabolik enzimleri doğrudan etkileyerek hücrel işlemleri düzenlemektedir.

Snf1'in üçü beta (Sip1, Sip2, Gal83) biri gama (Snf4) olmak üzere dört farklı alt birimi vardır. Bu alt birimlerden Snf4 aktivasyon altünitesi Snf1 aktivesi için gereklidir (Celenza ve Carlson 1989, Woods ve ark. 1994). Glukoz sinyali, Snf1-Snf4 etkileşimini düzenleyerek kinaz oto-inhibisyonunu uyarır. Yani, Snf1 kinaz aktivitesi ortamdaki glukoz olduğunda oto-inhibisyonla bozulur, ortamda glukoz olmadığına ise Snf4 aktivasyon altünitesi Snf1 düzenleyici bölgesine bağlanarak kinaz kompleksindeki oto-inhibisyonu önler ve Snf1 aktive edilir. Bu sayede, Mig1 fosforile olarak nukleustan sitoplazmaya taşınır (Treitel ve ark. 1998, Ostling ve Ronne 1998, Smith ve ark. 1999, DeVit ve Johnston 1999, Devit ve ark. 1997, McCartney ve Schmidt 2001, Woods ve ark. 1994, Wilson ve ark. 1996, Jiang ve Carlson 1996) ve Mig1'in Ssn6-Tup1 kompleksi ile etkileşimini etkileyerek baskılanmayı azaltır (Papamichos-Chronakis ve ark. 2000). Bu sayede Snf1 PK kompleksi, transkripsiyonel represör Mig1'i kontrol ederek glukozla baskılanan birçok geni etkilemektedir.

Glukoz sinyali ile ribozomal protein genlerinin transkripsiyonları da aktive edilmektedir. Bu şekilde glukoz sinyali ile protein sentezi miktarı ve buna bağlı olarak da hücre döngüsü kontrol edilmektedir (Santangelo 2006). Glukoz sinyali ile glikolitik genlerin transkripsiyonlarında da hızlı bir artış olmaktadır (Boles ve ark. 1997). Ayrıca *S. cerevisiae* hücrelerinin düşük glukozdan yüksek oranda glukoz içeren ortama aktarılması sonucu hücrelere glukoz girişi de artış gösterir. Bu olaya ise "Glukoz aktivasyonu" denir. Bazı DNA'ya bağlanma faktörlerinin glikolitik genlerin yüksek miktarda ifade edilmesinde görev aldığı bilinmektedir. Örneğin, bir tür transkripsiyon faktörü olan Gcr1p glikolitik genlerin ifadesinin düzenlenmesinde oldukça önemlidir. Gcr1p çoğu glikolitik gende korunmuş olan CTTCC motif dizisine bağlanmaktadır. (Baker 1991, Rolland ve ark. 2002, Santangelo 2006). Gcr1p'nin Gcr2p transkripsiyon faktörüyle dimer oluşturduğu (Uemura ve Jigami 1992) ve glikolitik genlerin ve bazı heksos transport (*HXT2* ve *HXT4*) genleri promotor bölgelerine spesifik olarak bağlanıp

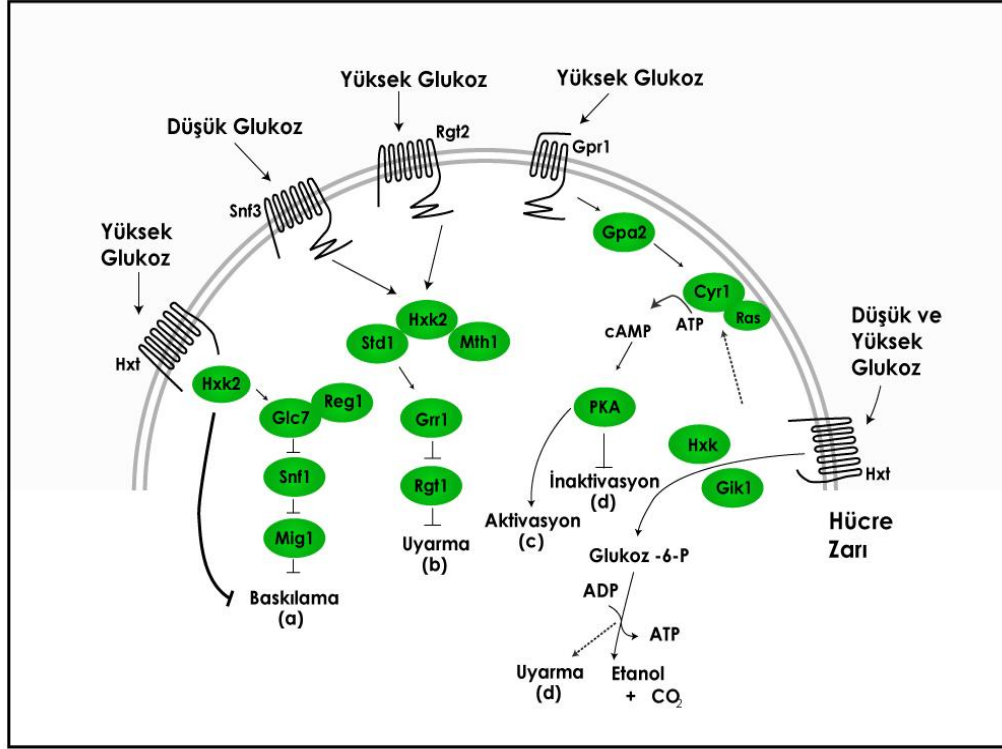
bu genlerin transkripsiyonlarını aktive ettiği bilinmektedir (Baker 1991, Türkel ve Bisson 1999).

2.2.2. *S. cerevisiae*'da Glukoz Sinyalinin Algılanması

S. cerevisiae'da glukozun hücre içine alınması kolaylaştırılmış diffüzyon mekanizmasıyla olup, çok sayıda glukoz taşıyıcı (Hexose transporters, Hxt) ve sensör proteinler (Snf3p, Rgt2p, Gpr1p) tarafından yapılmaktadır (Özcan ve Johnston, 1999). *S. cerevisiae*'da 17 farklı *HXT* geni bulunmakta (*HXT1-HXT17*) (Boles ve Hollenberg, 1997) ve bunlar üreme ortamındaki glukoz miktarına göre transkribe edilmektedir. *HXT* genleri; yüksek glukoz konsantrasyonunda ifade edilen düşük afiniteli *HXT* genleri (*HXT1*, *HXT3*), glukoz için orta dereceli affinite gösteren (*HXT2*, *HXT4*), düşük glukoz konsantrasyonunda ifade edilen yüksek afiniteli *HXT* genleri (*HXT6*, *HXT7*) olmak üzere üçe ayrılır (Boles ve Hollenberg 1997). Bununla birlikte glukoz için orta dereceli affinite gösteren *HXT2* ve *HXT4* transporterları ile yüksek affinite gösteren *HXT6* ve *HXT7* genleri düşük miktarda glukozla uyarılmakta ve yüksek miktarda glukozla baskılanmaktadır (Boles ve Hollenberg, 1997).

Hxt glukoz transporterlarına oldukça benzemelerine rağmen Snf3p ve Rgt2p, glukozu hücre içerisine taşıma kabiliyetini kaybetmiş, hücre dışındaki glukoz miktarını bildiren sensör proteini olarak görev yapmaktadır. Rgt2p yüksek miktardaki glukozu algılayıp düşük afiniteli *HXT1* genine iletirken, Snf3 düşük miktardaki glukozu yanıt olarak orta dereceli affinite gösteren *HXT2* ve *HXT4* genlerinin transkripsiyonunu sağlamaktadır (Özcan ve Johnston 1996, Özcan ve ark. 1998). Ortamda glukoz olduğunda plazma membranındaki Rgt2/Snf3 sensörlerine bağlanarak, Mth1 ve Std1 sitoplazmik proteinlerin fosforlanmasını sağlar (Şekil 2.6.). (Kim ve ark. 2006, Kim ve Johnston 2006, Moriya ve Johnston 2004, Flick ve ark. 2003, Spielwoy ve ark. 2004). Mth1p ve Std1p'nin parçalanmasıyla Rgt1p PKA tarafından fosforlanır ve DNA'ya bağlanması engellenir, böylece *HXT* geninin baskılanması kalkar ve *HXT1-HXT4* genlerinin transkripsiyonlarını sağlar (Roland ve ark. 2002). Ortamda glukoz olmadığında ise, Mth1p ve Std1p, Rgt1p transkripsiyonal represörüne bağlanır; Rgt1p de Ssn6-Tup1 genel ko-represörü ile etkileşerek *HXT* geninin baskılanmasını sağlar (Özcan ve ark. 1996, Polish ve ark. 2005). Düşük glukoz varlığında ise Snf3p, Mth1p'e

etki ederek Grr1p'ı aktive eder (Şekil 2.6.). Aktif Grr1p de Rgt1p'ı inaktive ederek glukoz taşıyıcıları olan *HXT2-HXT4*'ün transkripsiyonları yapılıır (Özcan ve ark. 1996).



Şekil 2. 6. *S. cerevisiae*'de glukoz sinyalinin algılanması ve iletilmesi.

2.2.3. *S. cerevisiae*'da Ozmotik Stresin Etki Mekanizması

Ortamdaki ozmolarite değişikliklerine uyum sağlanması maya yaşamı için oldukça önemlidir. *Saccharomyces cerevisiae*'da tuz toleransının mekanizması ile ilgili çalışmalar, hücrenin ozmotik düzenlemesi ve iyon homeostazisinin temel prensiplerinin anlaşılması için önem arz etmektedir (Ferrando ve ark. 1995, Hohmann 1997, Serrano ve ark. 1997). Tuz, toksik sodyum iyonlarının hücre içinde toplanması ve plazma membranı boyunca ozmotik gradiyentin azalması yüzünden turgor basıncının azalması gibi iki farklı etkisi dolayısıyla maya hücreleri için oldukça toksiktir (Marquez ve ark. 1998). Ozmotik stresle, Hog1p ve kromatin yeniden modelleme kompleksi (RSC) aracılığıyla strese yanıt lokuslarında nukleozom organizasyonu büyük oranda değişmektedir. *Saccharomyces cerevisiae*'ya ozmotik şok uygulandığında, genel olarak transkripsiyonal kapasitede eş zamanlı bir azalma olmasına rağmen, yüzlerce gende bir

uyarılma olmaktadır. Ozmotik stres sonucu, tüm genomdaki mRNA miktarının üçte bir oranında değiştiği rapor edilmiştir (O'Rourke ve Herskowitz 2004). Ozmotik stres yanıtının başlangıç fazı sırasında, stresin ilk birkaç dakikası gerçekleşen genel hasar nedeniyle global transkripsiyon oranı %50 düşmektedir. Ozmotik stresle, MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), Hog1p ve RSC bir araya gelerek, ozmo-yanıt genlerinin kodlama bölgelerinde kümelenirler.

Tomurcuklanan mayalarda HOG yolağı ve MAP basamağı, hiperozmotik strese uyum sağlamada önemli ve özel bir göreve sahiptir. MAP kinaz basamağı beş adet protein kinazdan oluşmaktadır bunlar; Skk2p, Ssk22p, Ste11p, Pbs2p ve Hog1p'dir. Sho1p ve Ste11p ise membran proteinleridir Diğer bir sinyal protein kompleksi ise üç elemandan oluşan; Sln1p, Ypd1p ve Ssk1p'dir. Hog1p'nin aktive ettiği transkripsiyon faktörleri; Mns2p/Mns4p'dür; Bunlar stres respons elementlere (STRE) bağlanarak, ozmotik strese yanıt olarak düzenlenen genlerin transkripsiyonlarını aktive ederler (Marchler ve ark. 1993, Martinez-Pastor 1996, Schmitt 1996). Ayrıca, bazı transkripsiyon faktörleriyle etkileşerek, hücre duvarı sentezlenmesinde görev alan genlerin sentezlenmesinde de rol oynarlar. Diğer bir transkripsiyonal regülatörlerden biri de Hot1p'dir ve yapılan çalışmalarla HOG yolağının bir parçası olduğu ortaya konmuştur (Rep ve ark. 1999). Skn7p transkripsiyon faktörü ise fosforilasyon durumuna bağlı olarak gen gruplarının aktive eden bir transkripsiyon aktivatörüdür (Krems ve ark. 1996, Li ve ark. 1998, Morgan ve ark. 1995, 1997). Skn7 transkripsiyon faktörünün aktive ettiği genler arasında, mannoziltransferaz geni *OCHI*, hücre duvarı integrasyonu ile ilgili genler, hücre döngüsü progresyonu ile ilgili genler, oksidatif stres genleri gibi gen grupları bulunur (Li ve ark. 1998, Morgan ve ark. 1997). Skn7, Ssk1 ile birlikte respons regülatörleri olarak HOG yolağını düzenleyen iki bileşenli fosfor yolağında görev almaktadır (Ketela ve ark. 1998, Li ve ark. 1998, Maeda ve ark. 1994, Posas ve Saito 1998, Posas ve ark. 1996). Skn7 transkripsiyon faktörünün de Ssn6-Tup1 ile etkileştiği ve Mcm1p'ye bağlı genlerin aktivitesini HOG yolağından bağımsız olarak düzenlediği bilinmektedir.

Strese yanıt MAP kinazı olan Hog1 kromatin düzenleyici enzimler, transkripsiyon faktörleri ve RNA Pol II ile etkileşerek bazı özel genlerin aktivasyonunu sağlar. Yapılan çalışmalar, ozmotik stresin RNA Pol II'yi stres yanıt genlerine doğru kaydırıldığını böylece lokalizasyonunu değiştirdiğini göstermiştir. RNA Pol-II'nin yeniden

lokalizasyonu, stres yanıt genleri bölgesine yerleşmiş Hog1 transkripsiyonal düzenleyicisini gerektirmektedir (Ribelles ve ark. 2012). Hog1p, bazı iyon membran transporterlarının aktivitelerini düzenlenmesi (Proft ve Struhl, 2004), G1 fazında hücre döngüsünde duraklamanın yönetilmesi (Escote ve ark. 2004), global gen ifadesinin düzenlenmesinin kontrolünün sağlanması (Posas ve ark. 2000, Rep ve ark. 2000) ve son olarak, başlangıç aşamasında duraklamanın ardından translasyonun yeniden devamının sağlanması için gereklidir (Uesono ve Toh-E, 2002). Yapılan çalışmalar sonucunda, hafif ve daha güçlü ozmotik stres sonrasında mRNA seviyesinde bir miktar artış olsa da ozmatik şok sonrasında önemli miktarda azalma olduğu ve mRNA stabilitesinin yeni ortam şartlarına uyum için önemli olduğu ortaya çıkmıştır (Gasch ve ark. 2000, Posas ve ark. 2000, Rep ve ark. 2000, Melamed ve ark. 2008). Ozmotik şok sonrasındaki mRNA miktarındaki azalmanın önemli bir bölümü Hog1p ile bağlantılıdır. Ayrıca, Hog1p ozmotik stres ile uyarılmış genler için bir transkripsiyonel elongation faktörü olarak da görev yapar (Pokholok ve ark. 2006, Proft ve ark. 2006).

2.3.Kromatin Faktörlerinin Ty1 transkripsiyonuna etkileri

Temel hücresel işlemlerin gerçekleşmesinde, kromatin yapısının düzenlenmesi önemli bir rol oynamaktadır. Nükleozomlar temel olarak her biri H2A, H2B, H3 ve H4'ten oluşmuş iki molekül histon oktamerinin bir araya gelip, 146 bp'lik DNA'nın bu histon yapısının etrafında sarmal oluşturmasıyla meydana gelmiştir (Luger ve ark. 1997). Kromatin yapı olarak stabil olmayıp farklı mekanizmalar tarafından değişime uğratılabilmektedir. Protein modifiye edici kompleksler ve bunların hedef proteinleri arasındaki etkileşimleri farklı kromatin yapılarının oluşmasına neden olur. Bu da, gen ifadesi, DNA replikasyonu, DNA onarımı ve rekombinasyonu gibi işlemler üzerinde büyük etkiler gösterir. Kromatin giriş-çıkışını düzenleyen iki ana enzimatik aktivite vardır. Bunlar; kromatin modifiye edici kompleksler ve kromatini yeniden düzenleyici komplekslerdir. (Becker ve Hörz, 2002). Histonları modifiye eden postranslasyonel mekanizmaları, histon asetilasyonu, metilasyon, fosforilasyon, ubikütilasyon, sumolasyon ve ADP-ribozilasyonudur (Peterson ve Laniel 2004, Turner 2005).

Asetilasyon; histon modifikasyonları ve gen regülasyonu gibi birçok hücresel prosesi kolaylaştırmaktadır. Histon asetilasyonunun, histonların DNA'dan ayrılmasında

ya da nukleozomlar arası etkileşimlerin gevşemesinde görev alır. Böylece, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyon için genomik bölgeye girmeleri kolaylaşır. İlk kez histon asetil transferaz (HAT) aktivitesi görülen proteinler Gcn5p ve Ada2p'dir. Gcn5p bir transkripsiyonal ko-aktivatör proteini olup Histon asetiltransferaz (HAT) enziminin mayadaki ortoloğudur. Araştırmalarda, SAGA kompleksi alt birim, rekombinant Gcn5p'in non-nukleosomal H3'ü asetillediği gösterilmiştir. SAGA'nın Histon H3 ile etkileşmesi sayesinde SAGA kromatinde toplanıp, stabilize olarak kalmaktadır. Bu etkileşim Gcn5p'in HAT aktivesinin düzenlenmesini sağlayarak bu sayede de aktif kromatin oluşumu veya aktif kromatin yapısının korunmasında doğrudan rol aldığı sanılmaktadır. (Eisenmann ve ark. 1992, Laprade ve ark. 2007, Deckert ve ark. 2002, Shukla ve ark. 2006, Balasubramanian ve ark. 2002).

Histon ubikütinleşmesi ise, hem gen aktivasyonu hem de gen baskılanması için gereklidir. Bu post translasyonel modifikasyonları katalizleyen histon modifiye edici enzimler substratlara spesifitelerini arttırmak ve enzimatik aktivitelerini arttırmak için çok sayıda alt üniteyle kompleks oluştururlar. Bunlardan birisi de SAGA (Spt, Ada, Gcn5 Asetiltransferaz) adı verilen mayalardan insanlara kadar evrimsel olarak korunmuş bir multiprotein kromatin modifiye edici komplekstir. Yapılan çalışmalar SAGA kompleksinin maya aktivatörleri için çok önemli olduğunu göstermiştir (Bhaumik ve ark. 2004). SAGA kompleksi yapı olarak modüler bir yapıdadır ve farklı fonksiyonel üniteler içermektedir. SAGA'nın esansiyel olmayan Ada (1-3), Gcn5p, Ada5p, Sptp (3, 7, 8, 20), Sgfp (11, 29, 73), Ubp8p, Sus1p ve Chd1p gibi bölgeleri yanında TBP faktörlerinin altünitesi olan Tra1, TAF (5, 6, 9, 10, 12) esansiyel bölgeleri de içerir. Ada1p, Spt7p ve Spt20p SAGA'nın bütünlüğünü sağlamaktadır (Sterner ve ark. 1999, Bhaumik ve ark. 2002).

Kromatin yeniden düzenleyici kompleksler ise, kısmi bir DNA dizisi boyunca nukleozom lokasyonunu değiştiren ya da histon-DNA etkileşimini değiştirerek nukleozomu yeniden düzenleyen mekanizmalardır. Kromatinin yeniden düzenlenmesi ile ilgili tüm kompleksler birer ATPaz alt ünitesidir. Bu tarz bir aktivite ilk olarak SWI/SNF multiprotein kompleksinin bir parçası olan Swi2/Snf2 ATPazlarında bulunmuştur. Bu kompleksin ana görevi, nukleozom yapısında histon-DNA etkileşimini değiştirmektir. Ayrıca, SWI/SNF kompleksinin bazal transkripsiyon mekanizmasında RNA pol-II ile etkileştiği bilinmektedir. SWI/SNF kompleksi kromatin yapısını

değiştirerek, transkripsiyon bağlanma bölgelerini açarak, transkripsiyon faktörlerinin bu bölgelere rahatça bağlanmasını ve bu sayede transkripsiyonun artmasını sağlar (Martens ve Winston, 2002). RNA pol-II ile etkileştiği bilinen diğer kompleksler arasında, genel transkripsiyon faktörü kompleksleri, SRB/aracı kompleksi, histon modifiye edici kompleksler (SAGA gibi) ve bir genel represör olan Ssn6-Tup1 kompleksi bulunmaktadır. Transkripsiyonun kromatin tarafından baskılanabileceği Grunstein Laboratuvarında yapılan deneylerle ispatlanmıştır (Durrin ve ark. 1992). Bu çalışmalarda, mayadaki tüm nükleozomların oluşumunun H4 histon miktarının tüketilmesi ile durduğu gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada ise Histon H3 ve H4 amino uçlarının, a1/a2 diploid kontrol kompleksi aracılığıyla gerçekleşen gen baskılanması için gerekli olduğu gösterilmiştir (Roth ve ark. 1995).

Haploid *S. cerevisiae* hücrelerinde Ty1 transkripsiyonunun SAGA histon modifiye edici kompleksi, SWI/SNF ve ISWI kromatin yeniden düzenleyici kompleksi tarafından düzenlendiği bilinmektedir (Happel ve ark. 1991, Winston ve Carlson 1992). SAGA kompleksi alt birimleri olan Spt3p, Spt7p, Spt8p, Spt20p, Ada2p, Ada3p ve Gcn5p'in Ty1 transkripsiyonu için gerekli olduğu bilinmektedir (Grant ve ark. 1997, Pollard ve Peterson, 1997). Ayrıca, Swi/Snf kompleksi alt birimleri Snf2p, Snf5p ve Snf6p'nin de Ty1 transkripsiyonlarını artırdığı bilinmektedir (Ciriacy ve ark. 1991, Happel ve ark. 1991) Bunların aksine, ISWI kompleks alt birimleri Iswi1p ve Iswi2p'nin Ty1 transkripsiyonunu inhibe ettiği bilinmektedir (Kent ve ark. 2001).

2.4. Ssn6-Tup1 represör kompleksinin genel mekanizması

Ssn6-Tup1 represör sistemi, sineklerden memelilere kadar korunmuş olan bir sistem olup; kromatin düzenlenmesi, aktivatörlerle etkileşim ve doğrudan transkripsiyon mekanizmasına etki ederek hedef genleri baskılanması gibi görevleri vardır. *Saccharomyces cerevisiae*' da genlerin %3'ünün Ssn6-Tup1 kompleksi tarafından baskılandığı bilinmektedir (DeRisi ve ark. 1991). Kompleks, transkripsiyonu iki genel mekanizma ile baskılamaktadır. (i) Bu mekanizmalar, kromatin yapısını değiştirip, DNA hedef bölgelerini aktivatör ve transkripsiyon faktörlerinden gizleyerek ve (ii) transkripsiyonun aktivasyonunu engelleyerek baskılamadır.

Ssn6-Tup1 represörü fonksiyonlarına göre farklı gen gruplarıyla etkileşmektedir. Bu gen gruplarının DNA bağlanma proteinleri, farklı DNA dizilerine bağlanmaktadır (Keleher ve ark. 1992, Tzamarias ve Struhl 1995). Fonksiyonlarına göre bu gen grupları ve bunların DNA bağlanma proteinleri sırasıyla Çizelge 2.2.'deki gibidir.

Gen fonksiyonu	DNA-bağlanma proteini	Kaynak
a-spesifik	$\alpha 2$ /Mcm1	Mukai ve ark. 1991; Keleher ve ark. 1992
Haploid-spesifik	$\alpha 1$ / $\alpha 2$	Mukai ve ark. 1991; Keleher ve ark. 1992
Glukoz baskılaması	Mig1	Trumbly ,1992
DNA hasarı	Crt1	Zhou ve Elledge, 1992
Oksijen kullanımı	Rox1	Zitomer ve Lowry, 1992
Nişasta parçalayıcı enzimler	Nrg1	Fujimori ve ark. 1997
Ozmatik stres	Sko1	Marquez ve ark. 1998
Sporulasyon spesifik	Bilinmiyor	Friesen ve ark. 1997
Mayoz spesifik	Bilinmiyor	Mizuno ve ark. 1998
Flokulasyon spesifik	Bilinmiyor	Teunissen ve ark. 1995

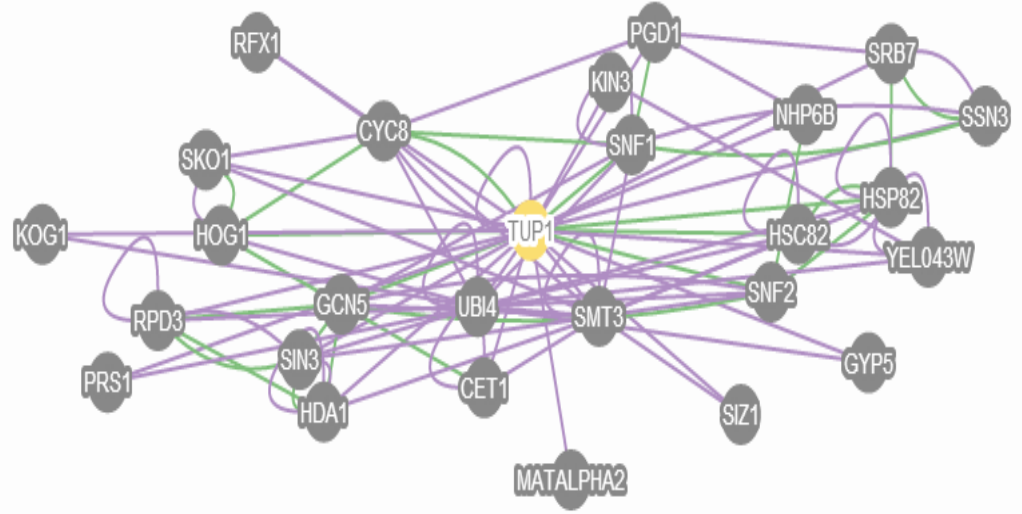
Çizelge 2.2. Ssn6-Tup1 kompleksi ile etkileşen gen grupları ve bunların bağlanma proteinleri.

Ssn6-Tup1 represörü ve DNA bağlanma proteinine özel bir dizi arasında zayıf bir protein-protein etkileşimi olur; bu da hedef genin baskılanması için yeterli bir etkileşimdir. Ssn6-Tup1 kompleksi, dört adet Tup1 ve bir adet de Ssn6 ünitesinden oluşmaktadır (Redd ve ark. 1997, Varanasi ve ark. 1996). Bu komplekste baskın olan protein Tup1 proteindir (Huang ve ark. 1997). Tup1p tekrarlanmış bir amino asit motifinin yedi kopyasını içermektedir buna WD tekrarı denilir (Williams ve Trumbly

1990, Zhang ve ark. 1991). Bu bölge *MAT α 2* geni ürünü olan α 2 ile etkileşmektedir (Komachi ve ark. 1994). Ssn6 ise tetratricopeptid tekrarı (TPR) adını alan başka bir tekrarlanmış motif içermektedir. Ssn6-Tup1'in diğer DNA bağlanma proteinleri ile etkileşimleri araştırılmış ve bunun sonucunda da DNA bağlanma proteinlerinden en yaygın olarak Tup1'in WD40 motifi ile Ssn6'nın TPR motifine bağlandığı ve bazı DNA bağlanma proteinlerinin Ssn6 ile doğrudan, Tup1 ile doğrudan olmayan bir şekilde etkileştiği gözlenmiştir (Tzamarias ve Struhl 1995). Ssn6-Tup1 kompleksinin RNA polimeraz II'nin altüniteleri (Balciunas ve Ronne 1995, Kuchin ve ark. 1995, Wahi ve Johnson, 1995, Song ve ark. 1996, Kuchin ve Carlson, 1998, Conlan ve ark. 1999, Gromoller ve Lehmig 2000, Papamichos-Chronakis ve ark. 2000, Han ve ark. 2001, Zaman ve ark. 2001) ile SWI/SNF ve SAGA kromozom düzenleyici kompleksleriyle doğrudan etkileştiği bilinmektedir (Fleming ve Pennings 2001, 2007) Ayrıca, strese verilen yanıtta Skn7 transkripsiyon faktörünün de Ssn6-Tup1 kompleksi ile etkileştiği bilinmektedir (Hanlon ve ark. 2011).

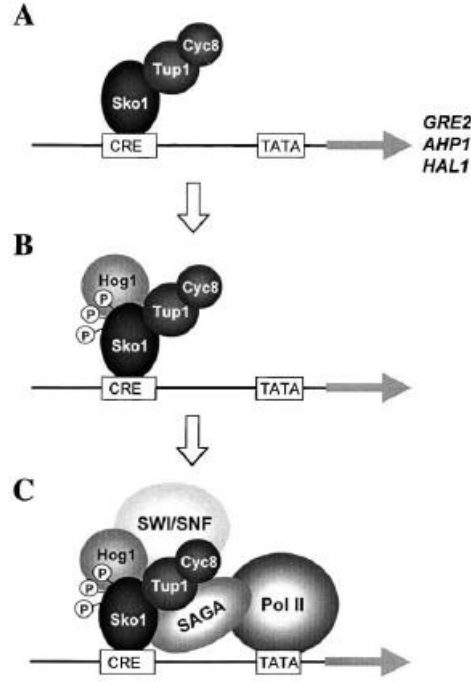
Ssn6-Tup1 ve α 2 proteininin etkileşimi bilinmekte olup, araştırmacılar tarafından detaylı olarak incelenmiştir. α 2 proteini Ssn6-Tup1 kompleksini iki farklı gen grubuna yönlendirir. Bunlar; α 2 proteininin Mcm1 ile birlikte bağlandığı a-spesifik genler ve α 2'nin α 1 proteini ile birlikte bağlandığı haploid-spesifik genlerdir. Her iki etkileşim de tam baskılama için gereklidir (Johnson 1995, Komachi 1994, Smith ve Johnson 2000). Tup1'in Mcm1 ile etkileşerek a-spesifik genlerin ifadesini aktive etme yeteneğini bozduğu gösterilmiştir (Gavin ve ark. 2000). Yapılan son çalışmalar, bazı promotorlarda spesifik metabolik sinyallerin Ssn6-Tup1 kompleksini transkripsiyonel ko-represörden ko-aktivatöre çevirebileceğini göstermiştir (Conlan ve ark. 1999).

ssn6 ve *tup1* mutantı olan maya suşları farklı mutant fenotipler gösterirler. Bu fenotipler arasında; glukozla baskılanan genlerin temel ifadesi, kalsiyuma bağlı flokulasyon, *MAT α* hücrelerinde mating hataları, homozigot diploidlerin sporulasyona uğrayamamaları, gliserol gibi alternatif karbon kaynaklarında zayıf üreme ve ısı sensivitesini sayabiliriz (Rothstein ve Sherman 1980, Trumbly 1986). Bu farklı fenotiplerin, bazı gen sınıflarının baskılanmasındaki eksiklik sonucu olduğu düşünülmektedir.



Şekil 2.7. Tup1 faktörünün etkileşim içinde olduğu bilinen faktörler (<http://www.yeastgenome.org/>, 2014)

S. cerevisiae hücrelerinde Ssn6-Tup1 kompleksi aracılığıyla, Ozmotik stres tarafından aktive edilen genler de baskılanmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucu, hiperozmotik stres sayesinde uyarılan bazı genlerin transkripsiyonlarının Sko1p tarafından baskılandığını ve bu mekanizmada Ssn6-Tup1 kompleksinin Sko1p'ye yardımcı olduğu ve Sko1p'nin Tup1p ile etkileştiği bulunmuştur (Proft ve Serrano 1999, Garcia-Gimeno ve Struhl, 2000, Pascual-Ahuir 2001, Proft, 2001). Ozmotik şok ile Ssn6-Tup1 baskılamasından kurtulmak için Sko1p'yi birçok yerden fosforlayan Hog1 MAP kinaz gerekmektedir (Proft 2001). Hog1p fosforilasyonu ile Sko1p, represörden aktivatöre dönüşür, böylece Hog1p, SAGA histon asetilaz ve SWI/SNF nükleozom tekrar modelleme kompleksleri promotorda bir araya gelirler. Tup1p ise SAGA ve SWI/SNF komplekslerinin bir araya gelmesi için gereklidir (Proft ve Struhl 2002). Bu da Ssn6-Tup1 kompleksinin, hem ozmotik stresle düzenlenen promotorların transkripsiyonal baskılaması için, hem de hiperozmotik stres sayesinde gerçekleşen hızlı transkripsiyonal uyarılma için gerekli olduğunu göstermektedir.



Şekil 2.8. Hiperozmotik strese yanıt olarak genlerin baskılanmasında görev alan faktörler (Proft ve Struhl, 2002)

Şekil 2.8.'de görüldüğü gibi;

(A) Normal üreme şartlarında Sko1p tarafından düzenlenen promotorların aktif olarak baskılanması. Sko1p ozmotik olarak uyarılabilen genlerin, CRE dizilerinin 3' kısmına bağlıdır ve Ssn6-Tup1 korepresörü ile birleşerek ön başlama kompleks oluşumunu engelleyerek transkripsiyonu aktif olarak engeller (Proft ve Struhl 2002).

(B) Hiperozmotik stres ile Hog1 kinaz nukleusa geçer; Böylece Sko1 ile etkileşerek hedef promotora bağlanır. Hog1p, Sko1p ile etkileşerek N terminal kısmından fosforlar, bu fosforilasyon ilerdeki kromatin modifiye edici komplekslerin bir araya gelmesinin ön koşulunu oluşturur (Proft ve Struhl 2002).

(C) Promotor aktivasyonu tam olarak, ozmotik strese maruz kaldıktan birkaç dakika sonra gerçekleşir. Fosforile Sko1-Ssn6-Tup1-Hog1 kompleksi, RNA polimeraz II'ye bağlanmayı ve transkripsiyonal aktivasyonu organize eden, SWI/SNF ve SAGA kromatin modifiye edici kompleksleri ile bir araya gelir. Bu faktörlerin bir araya gelmesi için; Sko1p, Tup1p ve Hog1p gereklidir (Proft ve Struhl 2002).

Ssn6-Tup1 represörünün, transkripsiyonal seviyede ozmotik strese yanıtın düzenlenmesinde hem HOG'a bağımlı hem de HOG'dan bağımsız olarak görev aldığı bilinmektedir. Örneğin; Tuz toleransının önemli bir belirleyicisi olan *HAL1*'in ozmotik indüksiyonu HOG'dan bağımsızdır ve transkripsiyonal baskılamanın kalkmasıyla gerçekleşir. HAL1 promotorundaki upstream baskılama dizisi stressiz hücrelerde, transkripsiyonu baskılar ve proteinlere bağlanır. Bu baskılama, Ssn6-Tup1 kompleksi aracılığıyla gerçekleşir ve ozmotik stresin varlığında kalkar (Marquez ve ark. 1998).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırmada Kullanılan *S. cerevisiae* Suşları

Bu araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşları BY serisi *S. cerevisiae* suşları olup, Frankfurt Üniversitesi'nden sağlandı (Brachmann ve ark. 1998). Bu *S. cerevisiae* suşlarından YST 124 haploid yaban tip maya suşudur ve diğer haploid YST 301, YST 278, YST 265, YST 307, YST 222, YST 240, YST 303, YST 261, YST 280, YST 282, YST 289, YST 305 suşlarıyla sırasıyla, *tup1*, *snf2*, *tec1*, *ada2*, *snf4*, *hog1*, *skn7*, *gcn4*, *mot3*, *spt11*, *tye7*, *snf3* mutasyonları hariç birbirleriyle izogeniktir. Ayrıca YST 125 diploid yaban tip suşu da diğer diploid YST 302, YST 296, YST 267, YST 308, YST 310, YST 309, YST 304, YST 263, YST 281, YST 284, YST 290, YST 306 suşlarıyla sırasıyla *tup1*, *snf2*, *tec1*, *ada2*, *snf4*, *hog1*, *skn7*, *gcn4*, *mot3*, *spt11*, *tye7*, *snf3* mutasyonları hariç birbirleriyle izogeniktir. Araştırmada kullanılan maya suşlarının genotipleri her bir suş için Çizelge 3.1'de verilmiştir.

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

Maya Suşu Lab Kod No:	Genotipi ve ilgili mutasyon
YST 124	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0 (yaban tip haploid)
YST 125	Mat a/ α ; his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2; MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0 (yaban tip diploid)
YST 301	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YCR084c::kanMX4 (haploid <i>tup1</i> mutanı)
YST 302	Mat a/ α ; his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2; MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; YCR084c::kanMX4/YCR084c::kanMX4. (diploid <i>tup1</i> mutanı)
YST 278	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YOR290c::kanMX4

	(haploid <i>snf2</i> mutantı)
YST 296	Mat a/ α ; his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2; MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; YOR290c::kanMX4/YOR290c::kanMX4 (diploid <i>snf2</i> mutantı)
YST 265	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YBR083w::kanMX4 (haploid <i>tec1</i> mutantı)
YST 267	Mat a/ α ; his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2; MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; YBR083w::kanMX4/ YBR083w::kanMX4 (diploid <i>tec1</i> mutantı)
YST 307	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YDR448w::kanMX4 (haploid <i>ada2</i> mutantı)
YST 308	Mat a/ α ; his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2; MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; YDR448w::kanMX4/YDR448w::kanMX4 (diploid <i>ada2</i> mutantı)
YST 222	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YGL115w::kanMX4 (haploid <i>snf4</i> mutantı)
YST 310	Mat a/ α ; his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2; MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; YGL115w::kanMX4/YGL115w::kanMX4 (diploid <i>snf4</i> mutantı)
YST 240	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YLR113w::kanMX4 (haploid <i>hog1</i> mutantı)
YST 309	Mat a/ α ; his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2; MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; YLR113w::kanMX4/YLR113w::kanMX4 (diploid <i>hog1</i> mutantı)
YST 303	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YHR206w::kanMX4 (haploid <i>skn7</i> mutantı)
YST 304	Mat a/ α ; his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2; MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; YHR206w::kanMX4/YHR206w::kanMX4 (diploid <i>skn7</i> mutantı)
YST 261	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YEL009c::kanMX4 (haploid <i>gcn4</i> mutantı)
YST 263	Mat a/ α ; his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2;

	MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; YEL009c::kanMX4/YEL009c::kanMX4 (diploid <i>gcn4</i> mutantı)
YST 280	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YMR070w::kanMX4 (haploid <i>mot3</i> mutantı)
YST 281	Mat a/a; his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2; MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; YMR070w::kanMX4/ YMR070w::kanMX4 (diploid <i>mot3</i> mutantı)
YST 282	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YDR225w::kanMX4 (haploid <i>spt11</i> mutantı)
YST 284	Mat a/a; his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2; MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; YDR225w::kanMX4/ YDR225w::kanMX4 (diploid <i>spt11</i> mutantı)
YST 289	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YOR344c::kanMX4 (haploid <i>tye7</i> mutantı)
YST 290	Mat a/a; his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2; MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; YOR344c::kanMX4/ YOR344c::kanMX4 (diploid <i>tye7</i> mutantı)
YST 305	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YDL194w::kanMX4 (haploid <i>snf3</i> mutantı)
YST 306	Mat a/a; his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2; MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; YDL194w::kanMX4/YDL194w::kanMX4 (diploid <i>snf3</i> mutantı)

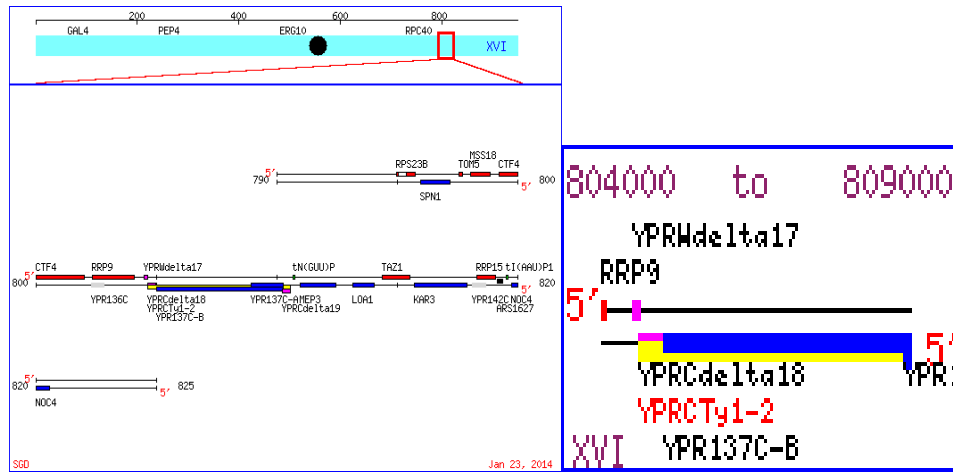
3.2. Yöntem

3.2.1. *S. cerevisiae* Suşlarının Transformasyon İçin Üretilmesi

Araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşları Frankfurt Üniversitesi *S. cerevisiae* koleksiyonundan taze petri kültürü olarak sağlandı. Maya kültürleri YPD (%1 yeast extract, %2 peptone, %2 glukoz, % 2 agar) ortamında canlandırıldı. Daha sonra canlandırılmış bu kültürler 30 °C’de üretilip stoklar oluşturuldu (Rose ve ark. 1990) (Ek 1). Deneylerimiz boyunca taze *S. cerevisiae* kültürlerinin hazırlanmasında + 4 °C’de YPD petrilerinde muhafaza edilen bu stoklar kullanıldı. Ayrıca uzun süreli stoklar için YPD’de üretilen *S. cerevisiae* suşlarından steril kürdan ile alınan maya örnekleri 1 ml’lik steril %20 gliserol içinde resuspense edilerek –70 °C’de saklandı. Araştırmada kullanılan çözeltilerin içerikleri ve hazırlanması ek-1’de verildi.

3.2.2. Araştırmada Kullanılan Plazmidler

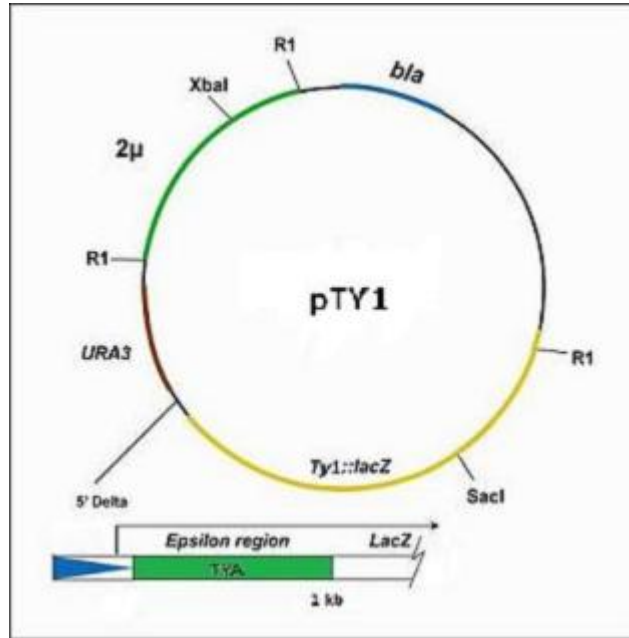
Bu araştırmada, Paris Diderot Üniversitesinden Dr. Pascale Lesage tarafından sağladığımız Ty1-lacZ füzyonu plazmid vektörü kullanıldı (Morillon ve ark. 2002). Bu Ty1-lacZ gen füzyonu *S. cerevisiae*’da 16. kromozomdaki sentromerin sağındaki ilk Ty1 elementinden klonlanmıştır (Şekil 3.1.). (Morillon ve ark. 2002).



Şekil 3.1. Ty1-144’ün *S. cerevisiae* 16. kromozomdaki yeri- Araştırmalarımızda kullandığımız Ty1-144 elementi (YPRCTy1-2) *S. cerevisiae* 16. Kromozomunda

sentromerin sağında 810562 ile 804645 koordinatları arasında bulunmaktadır (SGD-*Saccharomyces* Genome Database, 2014).

Araştırmada kullandığımız Ty1-lacZ gen füzyonu Ty1 retrotranspozonunun transkripsiyonunun kontrolü için gerekli olan promotor elementlerinin ilk 1500 nükleotidlik bölgesinde yer aldığı daha önce gösterilmiştir (Morillion ve ark. 2002). Bu bölge Tec1p ve Ste12p bağlanma bölgesi FRE, Blok I ve Mcm1p ve a1/α2 diploid kontrol dizilerini içeren Blok II transkripsiyon kontrol bölgelerini içermektedir (Company ve Errede. 1987, 1988, Company ve ark. 1988, Kurjan 1992, Gray ve Fassler 1993).



şekil 3. 2. Ty1-lacZ gen füzyonunu içeren plazmidin yapısı

Araştırmamızda Ty1 transkripsiyonunun regulasyonunu incelemek için kullanılan Ty1-lacZ plazmidinin genel yapısı şekil 3.2'de verilmiştir. Plazmidler *E. coli*'de replikasyon için ColE replikasyon orijini ve seçilebilir marker olarak da ampisillin direnç geni olan β-laktamaz içermektedirler. Ayrıca, *S. cerevisia*'da replikasyon ve mitotik stabilite için 2μ plazmidinin bir bölümünü ve seçilebilir marker gen olarak *URA3* genini içermektedirler. Bu plazmitlerin *S. cerevisiae* hücrelerinde

kopya sayılarının sabit olduğu ve hücreden hücreye çok değişmediği, ayrıca *S. cerevisiae* transformantlarında ölçülen β -Galaktozidaz aktivitelerinin Ty1-lacZ gen füzyonlarının mRNA seviyeleri ile de orantılı olduğu bilinmektedir.

3.2.3 Plazmidlerin *E.coli*'ye Transformasyonu ve Saflaştırılması

Araştırmada kullanılan Ty1-lacZ gen füzyonunu içeren plazmitler daha önce hazırlanan stoklardan *E. coli* DH5 α suşuna transformasyon ile aktararak çoğaltıldı. *E. coli*'ye transformasyon için önce bakteri hücreleri -70 C'deki stoktan alınıp LB petrilerinde 37 °C'de üretildi (Ek-1). Petride aktif olarak üredikleri görülen bu *E. coli* suşu 10 ml LB (%1 Bacto- tripton, %0.5 yeast extract, %1 NaCl) sıvı ortamda bir gece üretildi. Daha sonra bu sıvı kültürdeki *E. coli* suşundan 100 μ l alınıp 10 ml LB ortamında 37°C'de logaritmik faza kadar üretildi (Ek-1). Kompetent *E. coli* hücreleri MgCl₂/CaCl₂ yöntemi kullanılarak daha önce açıklandığı şekilde elde edildi ve taze olarak transformasyonda kullanıldı (Ausubel ve ark. 1987). *E. coli*'ye transformasyon da rutin olarak izlenen yöntem kullanıldı. Transformant bakteriler LB-ampicillin petrilerinde üretildi (Ek 1).

E.coli'ye transform edilen Ty1-lacZ plazmiti Sigma-Prep miniprep plazmit izolasyon kiti kullanılarak izole edildi. *E. coli*'den plazmit saflaştırma işleminde üretici firma tarafından verilen yöntem izlendi. Saflaştırılan Ty1-lacZ plazmit DNA'ları 100 μ l'lik 1x TE (pH:7.4) çözültisi içinde -20°C de saklandı (Ek-1).

3. 2.4. Plazmitlerin *S. cerevisiae*'ya Transformasyonu

Ty1-lacZ gen füzyonunu içeren URA3-2 μ m plazmiti *S. cerevisiae* hücrelerine lityum asetat polyetilen glikol yöntemi kullanılarak transform edildi (Ito ve ark. 1983). Bunun için önce 4 °C'de bekletilen stok *S. cerevisiae* suşlarından 5 ml'lik YPD ortamlarına steril kürdan kullanılarak ekim yapıldı ve çalkalamalı inkübatörde 130 devir/dakika hızda ve 30 °C'de bir gece (18 saat) üretildi. Bu sıvı kültürdeki *S. cerevisiae* suşlarından 2,5 ml alınarak tekrar son hacimi 25 ml olan YPD ortamına ekim yapıldı ve aynı şartlarda logaritmik aşamaya kadar üretildi (Rose ve ark. 1990). Logaritmik fazdaki *S. cerevisiae* hücreleri santrifüjde 3000 g'de 5 dakika çöktürüldü.

Çöken *S. cerevisiae* hücreleri 25 ml steril saf su ile yıkandı ve tekrar santrifüj ile 3000 g'de 5 dakika çöktürüldü. Sıvı faz atılıp çöken *S. cerevisiae* hücreleri taze hazırlanmış 1ml steril 0.1M lityum asetat çözeltisinde çözüldü ve hücre süspansiyonu mikrofüj tüplerine alınarak nazikçe karıştırıldı. Mikrofüj tüplerindeki süspansiyon 10 sn. süresince mikrosantrifüj cihazında en üst devirde çöktürüldü. Daha sonra *S. cerevisiae* süspansiyonundan lityum asetat pipet aracılığıyla uzaklaştırıldı ve tekrar 450 µl 0.1M lityum asetat eklenerek maya hücreleri ile tekrar bir süspansiyon oluşturuldu. Bu süspansiyondan 50 µl steril mikrofüj tüplerine alındı ve en üst devirde tekrar 10 sn. mikrosantrifüj cihazında çöktürüldükten sonra lityum asetat pipetle uzaklaştırıldı. Daha sonra mikrofüj tüplerindeki *S. cerevisiae* çökeltilerinin üzerine, 4-5 µg plazmid DNA'sı, 5-6 µg denatüre edilmiş herring sperm DNA'sı, 240 µl PEG, 36 µl 1 M lityum asetat ve 60 µl steril saf su ilave edildi. Bu plazmit *S. cerevisiae* karışımları 30 °C'de etüvde 30 dakika bekletildi. Daha sonra bu hücre plazmit karışımına 42°C' de su banyosunda 30 dakika ısı şoku verildi. Isı şokunun ardından mikrosantrifüjde 8000 rpm'de 15 saniye çöktürüldü ve mikropipetle transformasyon karışımı uzaklaştırıldı. Çöken *S. cerevisiae* hücreleri 400-500 µl steril saf su ile çözüldü. Bu hücre süspansiyonundan 75-100 µl alınıp urasil içermeyen sentetik tam minimal üreme ortamı (-Ura, SC + %2 glukoz) petrilere ekim yapıldı ve 30°C'deki etüve konuldu.

Transformantlar yaklaşık 4 gün sonra petrilere seçilebilir koloniler oluşturdu. Transformant maya kolonilerinden 8-10 adeti seçilip yeni minimal petrilere üretilerek β-galaktozidaz deneyi için daha önce tanımlandığı şekilde hazırlandı (Guarente 1983).

3.2.5. *S. cerevisiae* Transformantlarının Üretilmesi

Glukoz sinyal iletim yolunun haploid ve diploid *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonuna etkilerini araştırabilmek için Ty1-lacZ plazmitini içeren *URA*⁺ *S. cerevisiae* transformantları önce 2'li olarak 5ml SC-URA+ %2 glukoz veya %2 gliserol-laktat içeren üreme ortamında 30 C'de çalkalamalı etüvde 130 devir dakika hızda durağan faza kadar üretildi (yaklaşık 20-24 saat). Daha sonra bu durağan faz *S. cerevisiae* kültürlerinden 200µl alınıp 5 ml'lik taze SC-URA + %2 glukoz üreme ortamına ekim yapıldı ve *S. cerevisiae* kültürleri aynı şartlarda logaritmik faza kadar (*A*₆₀₀: 1.0) üretildi. Bu üreme periyodu sonunda *S. cerevisiae* hücreleri santrifüj ile 3000

g'de çöktürüldü. Çöktürülen *S. cerevisiae* kültürleri 1 ml'lik steril saf su ile bir kez yıkanıp tekrar çöktürüldü. Bu kez hücre çökeltisinin üzerine 200 µl Breaking Buffer eklendi ve hücreler bu şekilde -70 °C'de donmaya bırakıldı (Ek 1).

Ayrıca, logaritmik faza kadar SC-URA+ %2 glukoz ortamında üreyen *S. cerevisiae* hücreleri çöktürüldü ve 5 ml'lik steril saf su ile yıkandı ve tekrar çöktürüldü. Çöken maya hücreleri SC-URA+ %0,01 glukoz içeren ortamda çözülerek logaritmik faza kadar üretildi (Neugeborn ve Carlson 1987) ve çöktürülerek donduruldu ve daha sonra β-Galaktozidaz aktiviteleri ölçüldü.

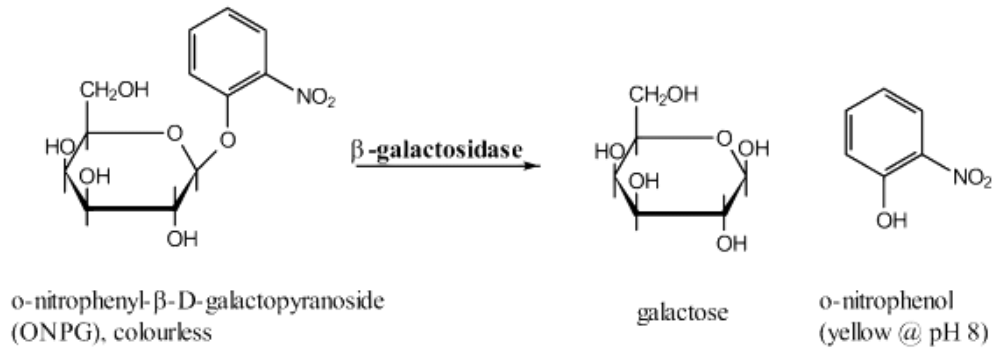
Ty1 transkripsiyonuna ozmotik stresin etkisini ölçebilmek için ise Ty1-lacZ plazmiti ile transform edilmiş *S. cerevisiae* hücreleri önce SC-URA+ %2 glukoz üreme ortamında logaritmik faza kadar üretilildi. Daha sonra son konsantrasyon 0,8 M olacak şekilde steril NaCl eklenerek maya hücreleri 4 saat daha üretildi. 4 saatlik üreme periyodu sonunda hücreler 2000 rpm'de 5 dakika santrifujle çöktürüldü ve yukarıda açıklandığı şekilde β-Galaktozidaz aktivitelerinin belirlenmesi için hazırlanarak donduruldu.

Tup1 mutanlığı *S. cerevisiae* suşunun flokulasyon gösterdiği belirlendi. Flokulasyonun önlenmesi için üreme ortamına ortamına son konsantrasyon 10 mM olacak şekilde steril EDTA çözeltisi eklendi.

3.2.6. β-Galaktozidaz Aktivitelerinin Ölçülmesi

Dondurulan *S. cerevisiae* hücreleri β-Galaktozidaz aktivitelerinin ölçümünden hemen önce oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Hücre süspansiyonları çözününce 20 µl saf kloroform ve 20 µl 0.1%'lik SDS ilave edilerek permeabilize edildi ve 10-15 saniye süreyle en yüksek hızda vorteks cihazı ile karıştırıldı. Permeabilize *S. cerevisiae* süspansiyonlarından 20 µl'lik bir karışımın orta kısmından alınarak üçer adet hazırlanmış olan 980 µl'lik β-galaktozidaz tampon çözeltisi (Z-Buffer) içine ilave edildi. Böylece β-Galaktozidaz aktivitesi her transformant hücresi için tekrarlanmış oldu. Daha sonra reaksiyonun gerçekleşmesi için deney çözeltisinin optimum sıcaklık olan 30 °C'de su banyosunda 2 dakika bekletildi ve bu süre sonunda da permeabilize edilmiş hücre karışımına 200 µl ONPG eklenerek yavaşça karıştırıldı ve 30 °C'de açık sarı renk oluşuncaya kadar beklendi ve bunun için geçen süre de kayıt edildi. Bu

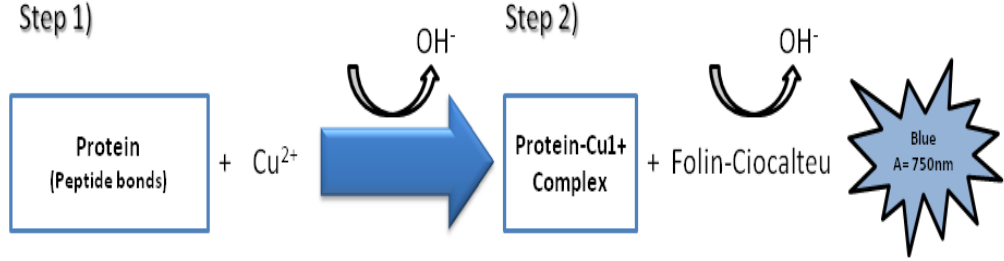
reaksiyon Şekil 3.3’de görüldüğü gibi o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozidaz (ONPG) bileşiğinin plazmid vektöründeki lacZ geninden kodlanan β -Galaktozidaz enzimi tarafından bir galaktoz ve sarı rengi veren o-nitrofenole ayrışması ile gerçekleşti. Bekleme süresi sonunda ONPG- β -Galaktozidaz reaksiyonları 500 μ l 1M sodyum karbonat ilave edilerek ve tekrar yavaşça karıştırılarak durduruldu. Reaksiyon tüpleri 1000 g’de 5 dakika santrifüj edildi, hücreler çöktürüldü. Çözeltilerin absorbansları 420’nm’de Shimadzu Mini 1240 model spektrofotometrede ölçüldü.



Şekil 3.3. ONPG’nin ayrışması. o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozidaz (ONPG) bileşiğinin β -Galaktozidaz enzimi ile bir galaktoz ve sarı rengi veren o-nitrofenole ayrışması (Tedin et al. 1995)

Permeabilize edilen *S. cerevisiae* süspansiyonlarının toplam protein konsantrasyonları da Lowry metoduna göre daha önce açıklandığı şekilde belirlendi (Lowry ve ark. 1951). Bunun için önce 10 ml’lik cam tüplere 180 μ l’lik steril saf su konuldu. Permeabilize edilmiş hücre lizatlarından 20 μ l alınarak tüp içine eklendi. Bu karışıma 1 ml Lowry C çözeltisi eklenerek vortex ile kısa süre karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika beklendi (Ek 3). Bekleme süresi sonunda karışıma 1N folin (Sigma F 9252) fenol çözeltisinden 100 μ l eklenerek vorteks ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika beklendi ve daha sonra da oluşan mavi renkli protein komplekslerinin OD₇₅₀ nm’de absorbansları belirlendi. Bu reaksiyon Şekil 3.4.’de görüldüğü gibi alkali ortamda bakır iyonunun (Cu⁺²) proteindeki peptid bağları ile bir kompleks oluşturarak (Cu⁺¹)’e indirgenmesi ve indirgenmiş bakır ve proteinlerin yan

zincirinde yer alan Tyr, Trp ve Cys aminoasitlerinin Folin-Fenol reaktifini indirgeyerek renk oluşturması esasına dayanmaktadır.



Şekil 3.4. Lowry metodu-Lowry metodu alkali ortamdaki bakır iyonunun (Cu^{+2}) proteindeki peptid bağları ile bir kompleks oluşturarak (Cu^{+1})'e indirgenmesi ve indirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan Tyr, Trp ve Cys aminoasitlerinin Folin-Fenol reaktifini indirgeyerek mavi renk oluşturması esasına dayanmaktadır (JOHNSON, <http://www.labome.com/method/Protein-Quantitation.html>, 2014).

Deneylerde her transformant *S. cerevisiae* suşu için en az 4 farklı transformant kullanıldı. Deneyler üçlü olarak yapıldı ve en az iki kez tekrarlandı. Bu nedenle sonuçlar bölümünde verilen çizelgelerdeki β -Galaktozidaz aktiviteleri en az 12 farklı deneyin ortalamasını göstermektedir. Elde edilen sonuçların çoğunda standart sapmanın %10'nun altında olduğu bulundu. β -Galaktozidaz aktiviteleri Ek-2'de verilen yönteme göre hesaplandı ve dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verildi.

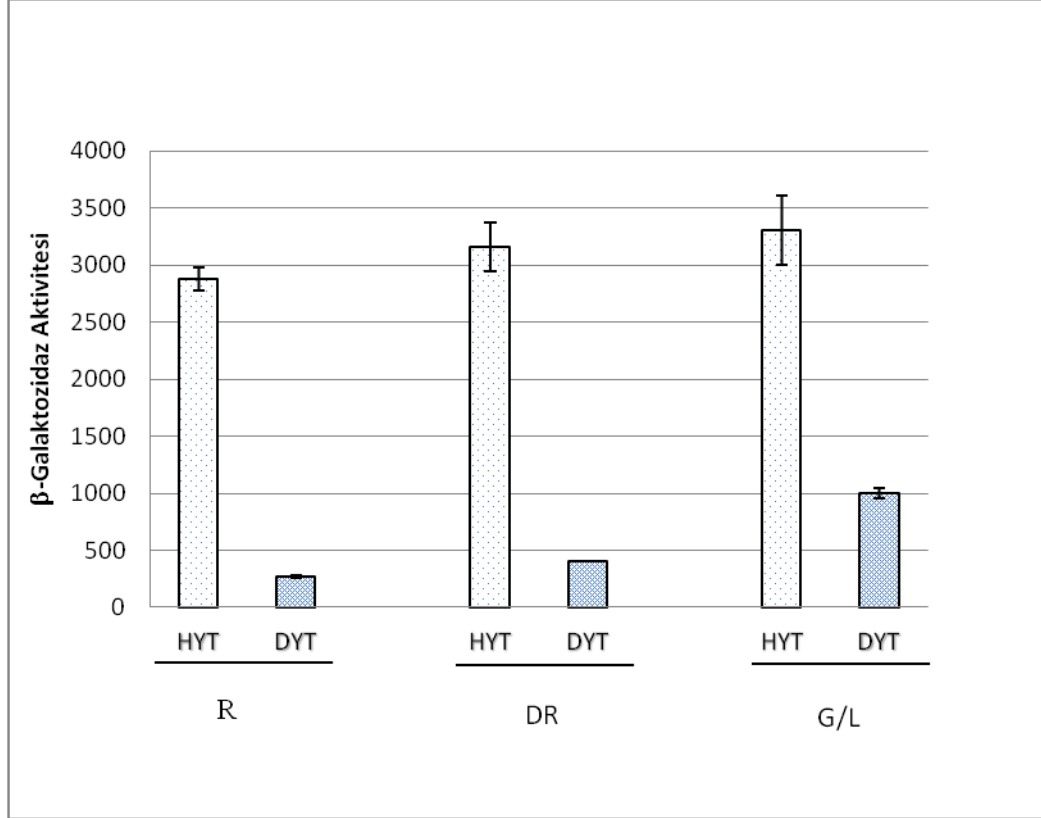
4. BULGULAR

4. 1. Glukoz Sinyalinin Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri

4.1.1. Glukoz Sinyalinin Haploid ve Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri

S. cerevisiae hücreleri doğada haploid ve diploid olarak bulunurlar. Ty1 retrotranspozonlarının transkripsiyonlarının diploid hücrelerde, haploid hücrelere göre 5 ila 20 kat arası daha az ifade edildiği bilinmektedir (Elder ve ark. 1981, Errede ve ark 1980). Bu ifade farkının sebepleri tam olarak bilinmemekle beraber Ty1 promotorunda Blok II bölgesinde $a1/a2$ diploid kontrol dizisinin olduğu ve diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde Ty1 transkripsiyonu baskılandığı bilinmektedir (Company ve ark. 1987, Gray ve Fassler 1993). Ty1 retrotranspozonu herhangi bir transkripsiyon faktörü kodlamaz ve transkripsiyonu tümüyle *S. cerevisiae* genomundan kodlanan faktörlere bağlıdır. Ty1 transkripsiyonunun glukoz sinyalinden nasıl etkilendiği tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle glukoz sinyalinin Ty1 retrotranspozonu transkripsiyonuna etkileri kontrol edildi. Ty1 promotor bölgesini içeren Ty1-lacZ gen füzyonu plazmiti yaban tip haploid (YST124) ve yaban tip diploid (YST125) *S. cerevisiae* suşlarına transform edildi. Transformantlar Yüksek glukoz (%2 glukoz), düşük glukoz (%0,05) ve fermente edilmeyen karbon kaynakları olarak gliserol-laktat içeren üreme ortamlarına ekildi ve transkripsiyonlarının seviyeleri belirlendi. Sonuç olarak Şekil 4. 1'de gördüğü gibi Ty1-lacZ gen füzyonu içeren haploid *S.cerevisiae* hücrelerinde her üç ortamda da benzer seviyelerde transkripsiyonun gerçekleştiği, Ty1-lacZ gen füzyonu içeren diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde ise gliserol-laktat içeren ortamdaki transkripsiyon seviyesinin yüksek glukoz içeren ortama göre üç kat, düşük glukoz içeren ortama göre ise iki kat fazla olduğu belirlendi. Diploid hücrelerde Ty1 transkripsiyonunun haploid hücrelere göre her üç üreme ortamında da daha önce rapor edildiği şekilde düşük seviyede gerçekleştiği görüldü (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4. 1. Glukoz sinyalinin haploid ve diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde Ty1 transkripsiyonuna etkileri.



β-Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir. β-Galaktozidaz aktiviteleri *S. cerevisiae*'nın yaban tip haploid suşu olan YST124 (HYT) ve yaban tip diploid suşu olan YST125 (DYT) transformantlarında ölçülmüştür.

-R: Repres üreme koşulları (%2 glukoz)

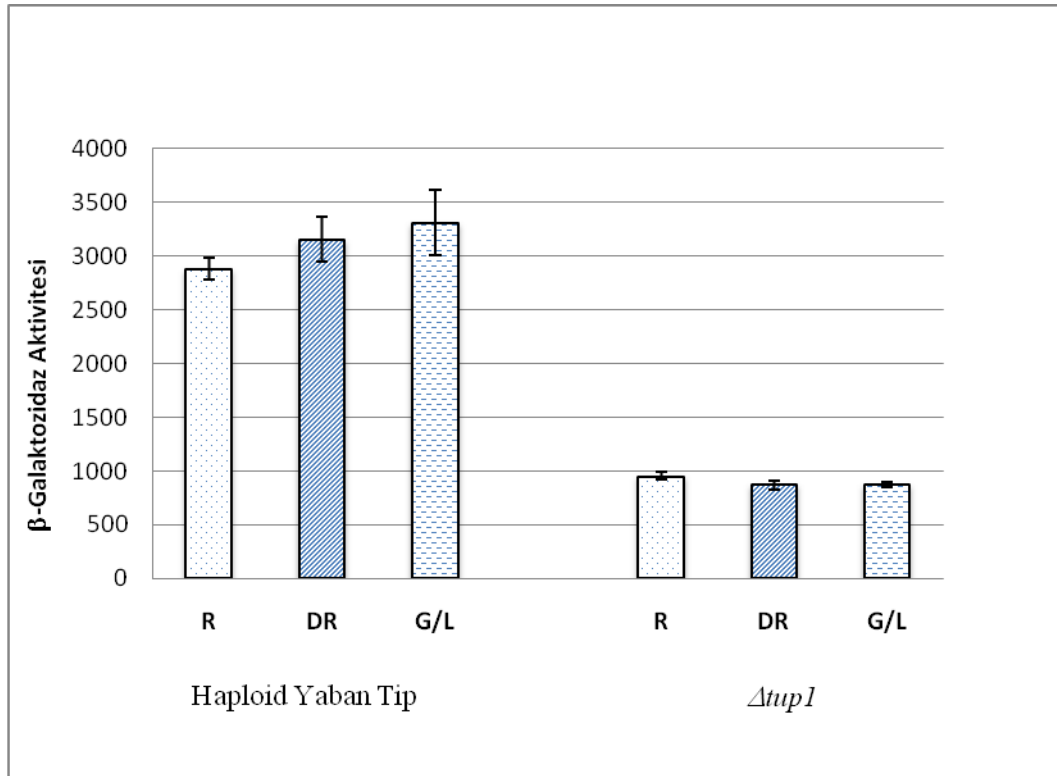
-DR: Derepres üreme koşulları (%0,05 glukoz)

-G/L: %2 Gliserol, %2 Laktat üreme ortamı

4.1.2. Tup1 Ko-represörünün Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid ve Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri

Bu araştırmada, Rap1p, Mcm1p ve diploidlerde $\alpha 1/\alpha 2$ heterodimeriyle etkileştiği bilinen Ssn6-Tup1 kompleksinin korepresörlerinden Tup1p'nin haploid ve diploid *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinde Ty1 transkripsiyonuna etkilerini ölçmek için Ty1-lacZ plazmiti, haploid ve diploid *tup1* mutantı *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerine transform edildi. Transformantlar yüksek glukoz içeren repressed veya düşük glukoz içeren derepressed üreme ortamlarında üretildi.

Çizelge 4. 2. Tup1 Ko-represörünün Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.



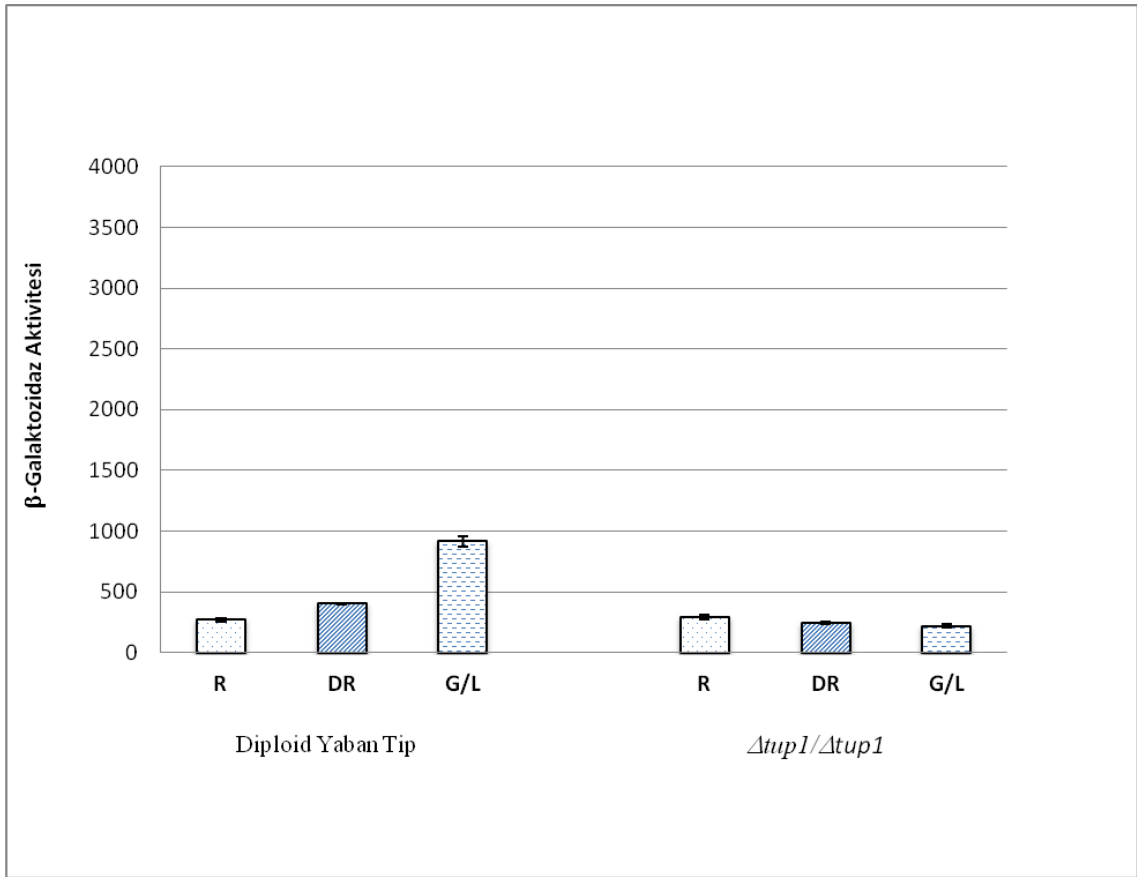
β-Galaktosidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST124'tür.

tup1 S. cerevisiae'nın YST301 suşudur ve YST124'e izogeniktir.

Sonuç olarak Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi maya hücrelerinin üretildiği yüksek glukoz ve düşük glukoz şartlarında *tup1* mutanlığı haploid maya hücrelerinde Ty1 transkripsiyonunun aynı ortamda üretilen yaban tip haploid hücrelerdekine göre üç kat azaldığı belirlendi.

Çizelge 4. 3. Tup1 Ko-represörünün Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.



β-Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST125'tir.

tup1/tup1 S. cerevisiae'nin YST302 suşudur ve YST125'e izogeniktir.

-R: Repres üreme koşulları (%2 glukoz)

-DR: Derepres üreme koşulları (%0,05 glukoz)

-G/L: %2 Gliserol, %2 Laktat üreme ortamı

Homozigot *tup1* mutantı diploid hücrelerde ise Çizelge 4.3’de görüldüğü gibi yüksek glukoz içeren repressed şartlarda transkripsiyon seviyesinin yaban tip diploid hücrelerle aynı seviyede kaldığı ve düşük glukoz içeren derepressed şartlarda ise Homozigot *tup1* mutantı diploid hücrelerde Ty1 transkripsiyonunun derepressed şartlarda üretilen yaban tip diploid hücrelere göre kısmen azaldığı bulundu.

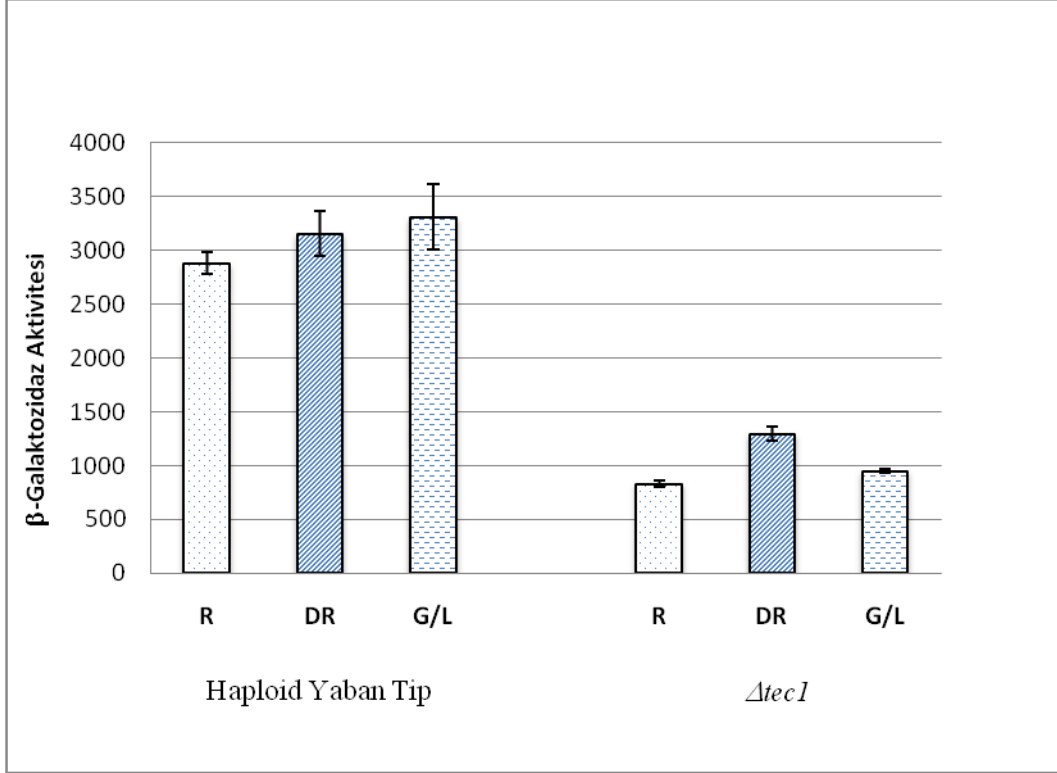
Haploid ve diploid *tup1* mutant suşları ile elde edilen sonuçlar bu transkripsiyon faktörünün haploid hücrelerde bazal transkripsiyonun sağlanması için mutlaka gerekli olduğunu göstermektedir. Haploid hücrelerde Ty1 transkripsiyonu glukoz sinyaline yanıt vermemekte ve yüksek bazal seviyede (yaklaşık 3000 ünite) transkripsiyon gerçekleşmektedir. Haploid hücrelerden farklı olarak, diploid yaban tip hücrelerde ise Ty1 transkripsiyonunun düşük glukoz veya gliserol laktat ortamında 2-3 kat artış gösterdiği görülmektedir (Çizelge 4.3.). Elde edilen sonuçlar diploid hücrelerde Ty1 transkripsiyonundaki bu artışın tümüyle Tup1p’den kaynaklandığını göstermektedir. Bundan dolayı $\Delta tup1/\Delta tup1$ mutantı diploid hücrelerde Ty1 transkripsiyonu düşük glukoz veya gliserol ortamında da bazal seviyede gerçekleşir.

4.1.3. Tec1p Transkripsiyon Faktörünün Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid ve Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri

Önceki araştırmalarda transkripsiyon faktörü Tec1p'nin Ty1 ve Ty1'e bağlı genlerin transkripsiyonunu arttırdığını gösterilmiştir. Ayrıca *tec1* mutant hücrelerinde *MAT* lokusu etkisinin bozulduğu ve *TEC1* geninin *a/a* diploid maya hücrelerinde bir etkisinin olmadığı, bu sebeple de *TEC1* ve *MAT* lokusu arasında bir etkileşim olduğu düşünölmektedir (Laloux ve ark. 1990). Transkripsiyon faktörleri Tec1p ve Ste12p birbirleriyle etkileşip vejetatif adhezyon, filament oluşumu, mating gibi farklı gelişimsel programları kontrol etmektedir (Dolan ve ark. 1989, Fields ve Herskowitz 1985, 1987, Gavrias ve ark. 1996, Liu ve ark. 1993, Madhani ve Fink 1997, Mösch ve Fink 1997, Mösch ve ark. 1999, Roberts ve Fink 1994). Haploid *S. cerevisiae* hücrelerinde Ste12p ve Tec1p transkripsiyon faktörleri Ty1 transkripsiyonu için gereklidir (Laloux ve ark. 1990, Morillon ve ark. 2000). Diploid hücrelerde ise Ty1 transkripsiyonu sadece Kss1 invazif-filament yolağının uyarılmasıyla aktive edilmektedir (Morillon ve ark. 2000). Bu bilgiler göz önüne alarak Ty1 transkripsiyonunun glukoz sinyaline yanıt olarak düzenlenmesinde Tec1p'nin görev alıp almadığı araştırıldı.

Ty1-lacZ gen füzyonunun transkripsiyon seviyeleri haploid *Δtec1* ve diploid *Δtec1/Δtec1* mutant hücrelerinde üç farklı karbon kaynağında belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4.'te verildi.

Çizelge 4.4. Tec1P Transkripsiyon Faktörünün Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri



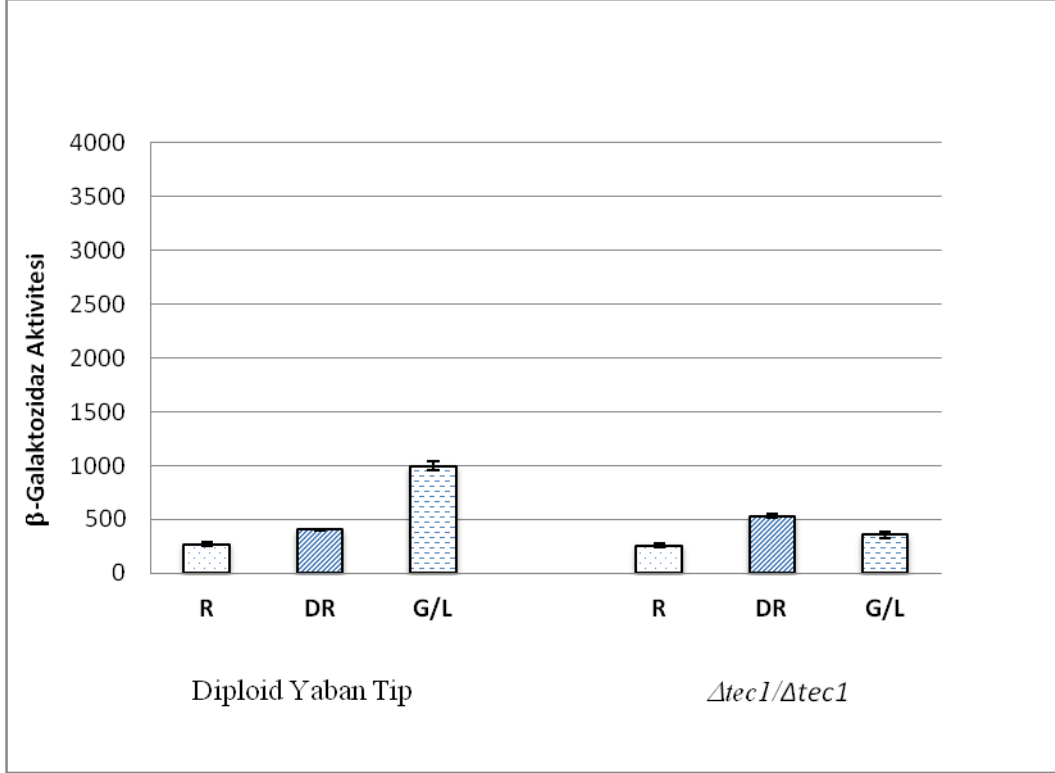
β-Galaktozidaz aktivitelemi dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST124'tür.

tec1 *S. cerevisiae*'nin YST265 suşudur ve YST124'e izogeniktir.

Haploid $\Delta tec1$ mutanıtı *S. cerevisiae* hücrelerinde beklendiği gibi Ty1 transkripsiyonunda ortalama 3-kat azalma olduğu görüldü. Buna ek olarak, $\Delta tec1$ mutanıtı hücrelerde de Ty1 transkripsiyonunun glukoz sinyalinden fazla etkilenmediği görüldü (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.5. Tec1p Transkripsiyon Faktörünün Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri



β-Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST125'tir.

tec1 *S. cerevisiae*'nin YST267 suşudur ve YST125'e izogeniktir.

Atec1/Atec1 mutantı diploid hücrelerde ise Çizelge 4.5'de görüldüğü gibi yüksek glukoz içeren repressed şartlarda transkripsiyon seviyesinin yaban tip diploid hücrelere göre değişmediği, maya hücrelerinin yüksek glukoz ortamından düşük glukoz ortamına aktarıldığı derepressed şartlarda ise *Atec1/Atec1* mutantı diploid hücrelerdeki Ty1 transkripsiyonunun yaban tip diploid hücrelerdeki Ty1 transkripsiyonuna göre bir miktar arttığı, zayıf karbon kaynağı içeren gliserol-laktat içeren ortamda büyüyen *tec1* mutantı diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde ise Ty1 transkripsiyonunun yaban tip diploid hücrelere kıyasla 2 kattan fazla azaldığı belirlendi.

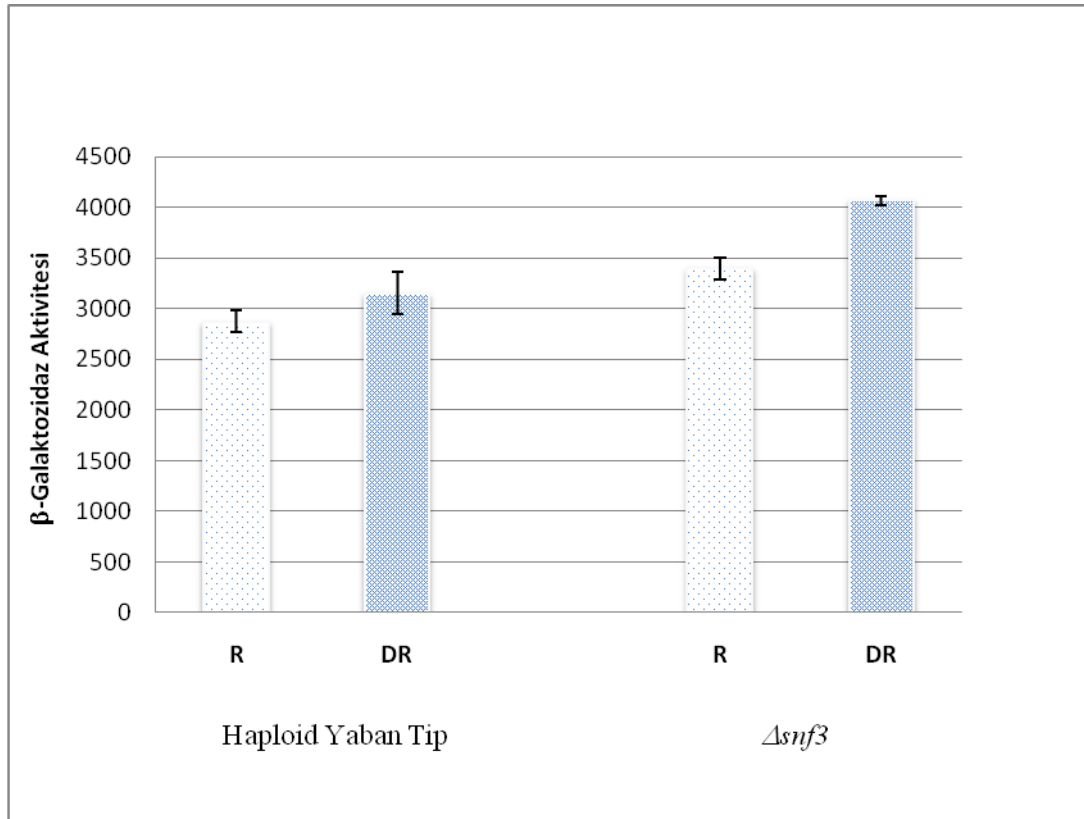
Bu sonuçlar; Tec1p'nin haploid *S. cerevisiae* hücrelerinde Ty1 transkripsiyonunu glukoz sinyaline yanıt olarak 3 kat aktive ettiğini, diploid hücrelerde ise glukoz

sinyaline yanıt olarak Ty1 transkripsiyonunun düzenlenmesinde görev aldığını göstermektedir.

4.1.4. Snf3p ve Snf4p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid ve Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri

Transkripsiyon faktörlerinin *S. cerevisiae* hücrelerinin üredikleri ortam şartlarına bağlı olarak düzenledikleri bilinmektedir (Schneper ve ark. 2004, De Virgilio ve Loewith 2006). Bu sebeple glukoz algılanmasında ve glukoz sinyalinin iletilmesinde görev alan faktörlerden düşük glukoz sensörü Snf3p ve Snf1 protein kinaz kompleksi altünitesi Snf4p'nin Ty1 transkripsiyonunun düzenlenmesinde görev alıp almadığı araştırıldı.

Çizelge 4. 6. Snf3p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.



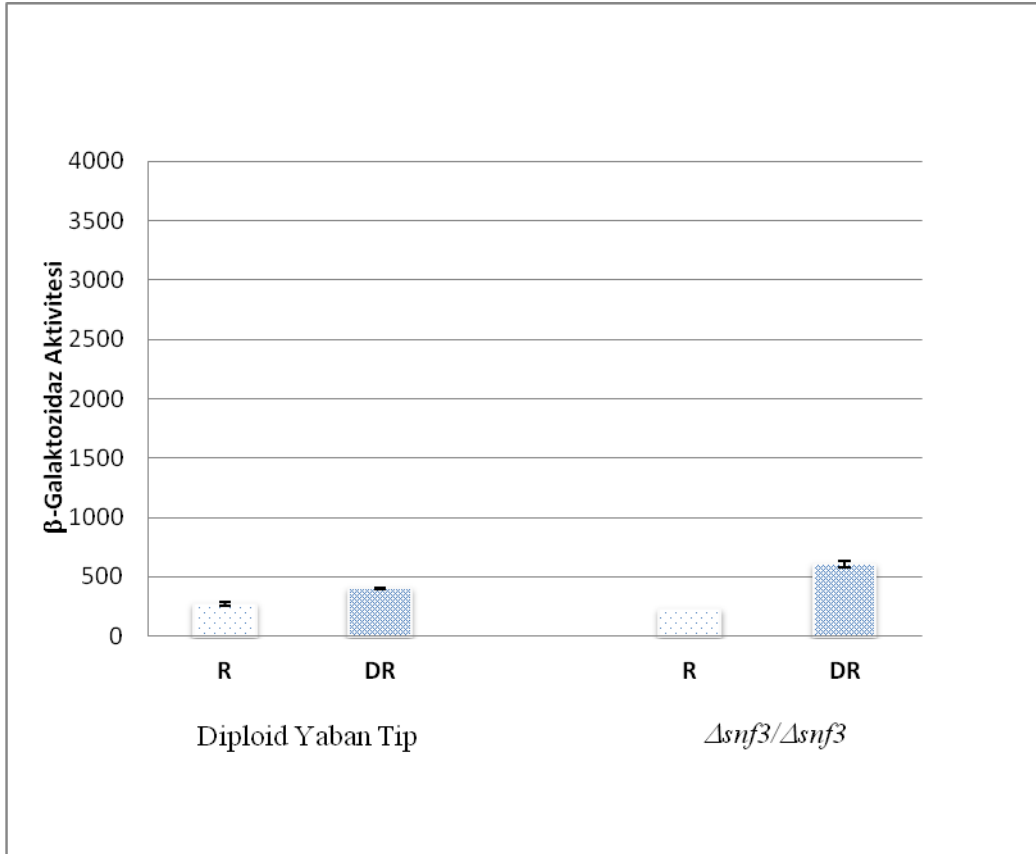
β -Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST124'tür.

snf3 *S. cerevisiae*'nin YST305 suşudur ve YST124'e izogeniktir.

Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi haploid *snf3* mutantı *S. cerevisiae* hücrelerinin repressed şartların olduğu yüksek glukoz (%2 glukoz) ortamından derepressed şartların olduğu düşük glukoz (%0,05 glukoz) ortamına aktarılmasıyla Ty1 transkripsiyonu yaban tip haploid hücrelere göre bir miktar artmıştır.

Çizelge 4.7. Snf3p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.



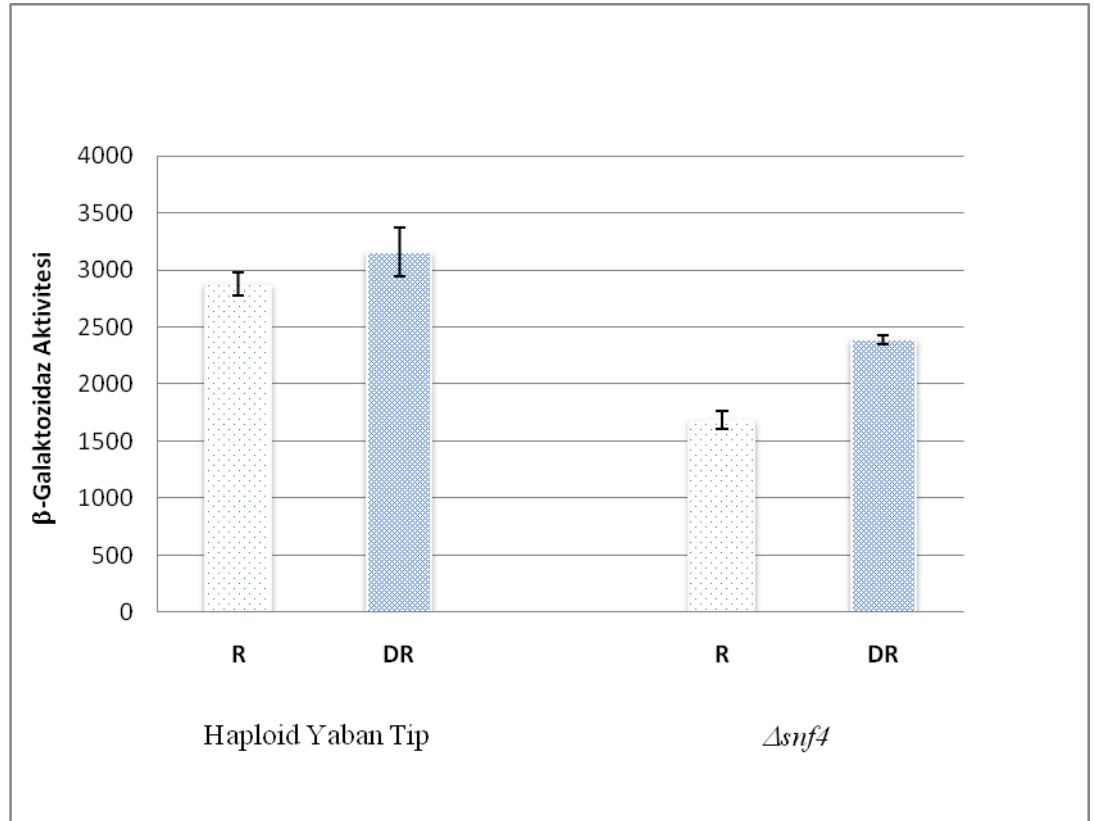
β -Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST125'tir.

snf3/snf3 S. cerevisiae'nin YST306 suşudur ve YST125'e izogeniktir.

Diğer taraftan yüksek glukoz şartlarında üreyen homozigot diploid *snf3* mutanlığı hücrelerdeki Ty1 transkripsiyonu yabancı tip hücrelerdeki Ty1 transkripsiyonuna göre bir miktar azalmıştır. Yüksek glukozdan düşük glukoz ortamına aktarılan diploid homozigot *snf3* mutanlığı hücrelerdeki Ty1 transkripsiyonu ise yabancı tip diploid hücrelere kıyasla bir miktar artmıştır (Çizelge 4.7.).

Çizelge 4. 8. Snf4p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.



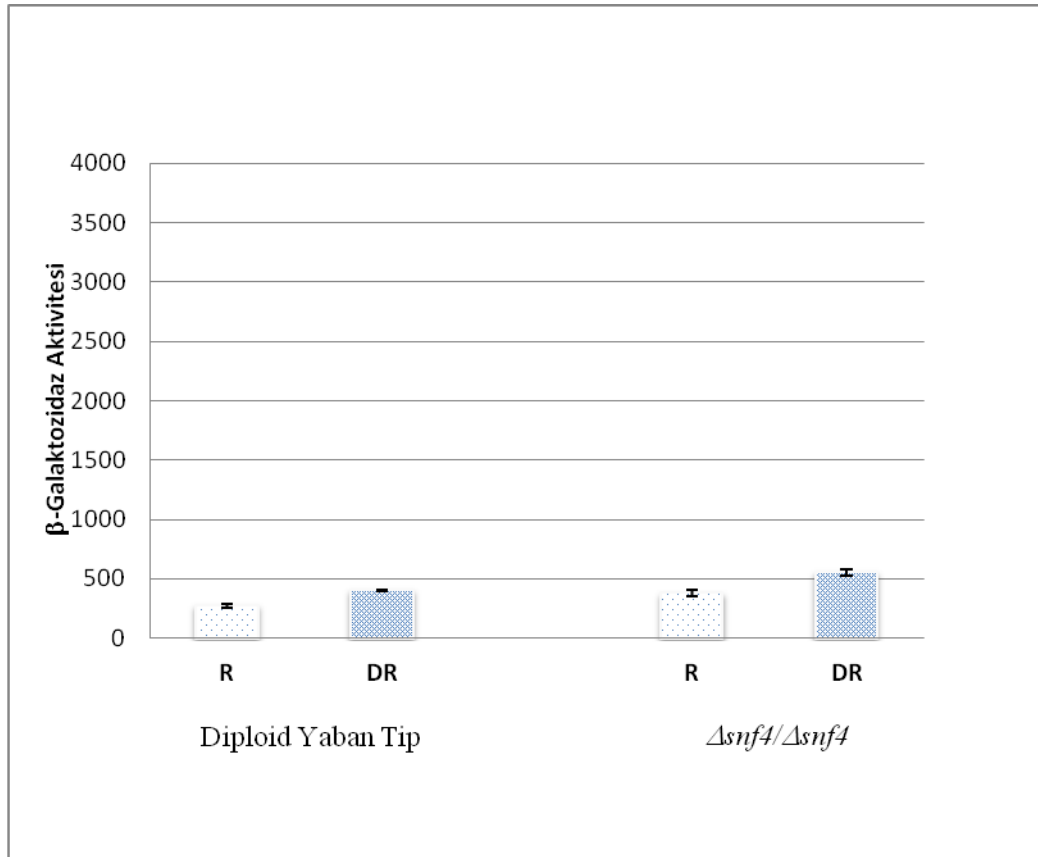
β-Galaktosidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yabancı Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST124'tür.

snf4 S. cerevisiae'nin YST222 suşudur ve YST124'e izogeniktir.

Haploid *snf4* mutanlığı *S. cerevisiae* hücrelerinde ise Çizelge 4.8’de görüldüğü gibi yüksek glukoz (%2 glukoz) ortamında üreyen *snf4* mutanlığı haploid hücrelerdeki Ty1 transkripsiyonu yaban tip haploid hücrelerdeki Ty1 transkripsiyonuna kıyasla 2 kat azalmıştır. Derepressed şartlarda üreyen haploid *snf4* mutanlığı *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonu ise yaban tip haploid maya hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonuna göre bir miktar azalmıştır.

Çizelge 4.9. *Snf4p*’nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.



β -Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST125'tir.

snf4/snf4 S. cerevisiae'nın YST310 suşudur ve YST125'e izogeniktir.

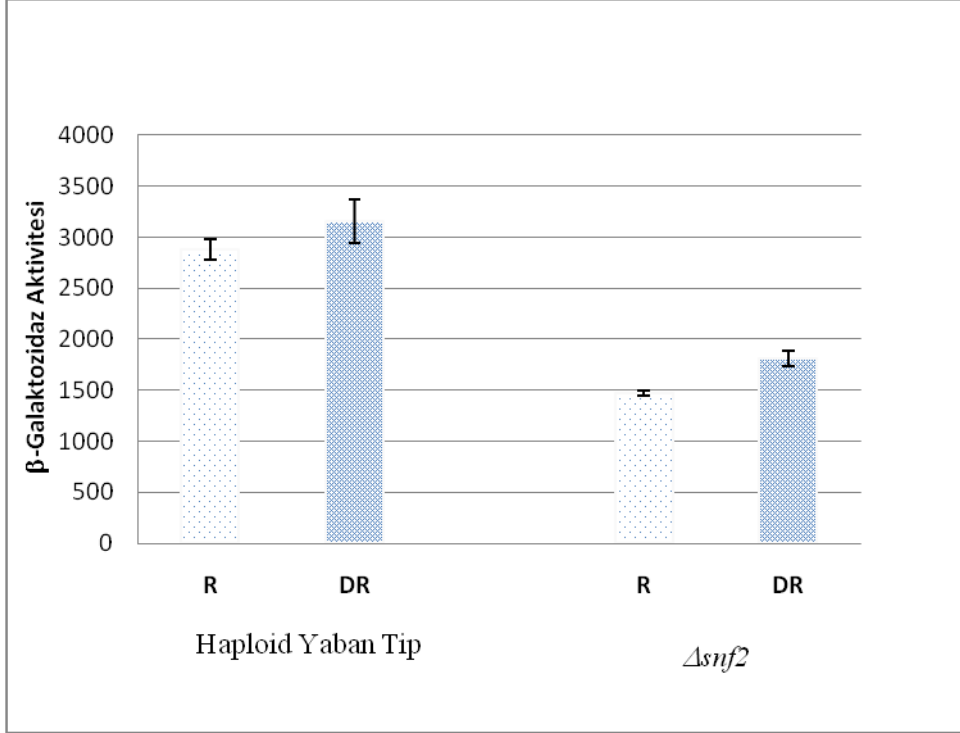
Ayrıca, hem repressed hem de derepressed şartlarda üreyen diploid *snf4* mutanını *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonu ise Çizelge 4.9'da görüldüğü gibi aynı şartlardaki yaban tip haploid ve diploid *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonuna göre bir miktar artmıştır.

Bu sonuçlara göre, Snf3p haploid ve diploid *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonunun glukoz sinyali ile kontrolünde kısmen görev almaktır. Ayrıca, *snf4p* Ty1 transkripsiyonunu glukoz sinyaline yanıt olarak haploid ve diploid hücrelerde birbirlerinden farklı olarak düzenlediğini belirlenmiştir.

4.1.5. Snf2p ve Ada2p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid ve Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri

Swi/Snf kompleksi alt ünitesi Snf2p'nin ve SAGA kompleksi alt ünitesi Ada2p'nin Ty1 transkripsiyonu için gerekli olduğu ve Ssn6-Tup1 kompleksinin Swi/Snf kompleksi ve SAGA kompleksi ile etkileşerek bazı *S. cerevisiae* genlerini kontrol ettiği daha önceki araştırmalarla kanıtlanmıştır (Proft ve Struhl 2002, Fleming ve Pennings 2007). Bu araştırmada Swi/Snf kompleksi alt ünitesi Snf2p'nin ve SAGA kompleksi alt ünitesi Ada2p'nin Ty1 transkripsiyonuna glukoz sinyaline yanıt olarak etkileri incelendi.

Çizelge 4. 10. Snf2p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri



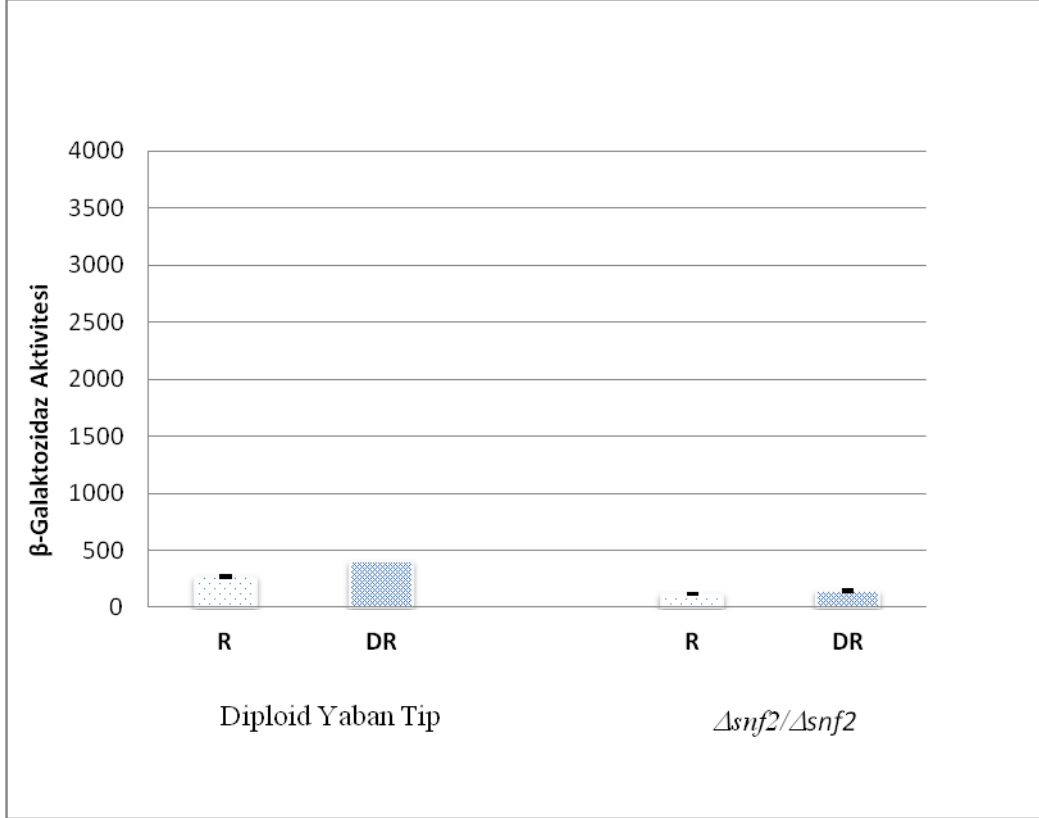
β-Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST124'tür.

snf2 *S. cerevisiae*'nin YST278 suşudur ve YST124'e izogeniktir.

Bu araştırma sonucunda Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi hem yüksek glukoz (%2 glukoz) hem de düşük glukoz ortam şartlarında üretilen haploid *snf2* mutanlığı *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonu yaban tip haploid hücrelerdeki Ty1 transkripsiyonuna oranla 2 kat azaldığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.11. Snf2p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri



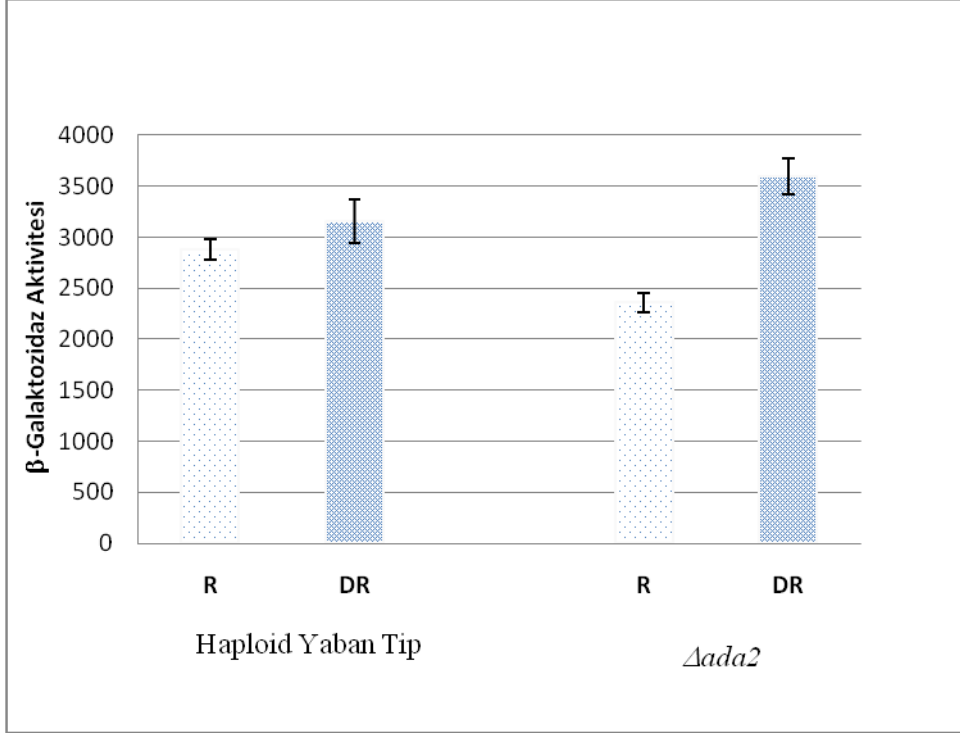
β -Galaktosidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST125'tir.

snf2/snf2 S. cerevisiae'nin YST296 suşudur ve YST125'e izogeniktir.

Yüksek glukoz ortamında üretilen ve yüksek glukoz ortamından düşük glukoz ortamına alınan diploid homozigot *snf2* mutanlığı *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonu Çizelge 4.11'de görüldüğü gibi yaban tip diploid *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonuna göre sırasıyla 2 ve 3 kat azalmıştır.

Çizelge 4. 12. Ada2p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri



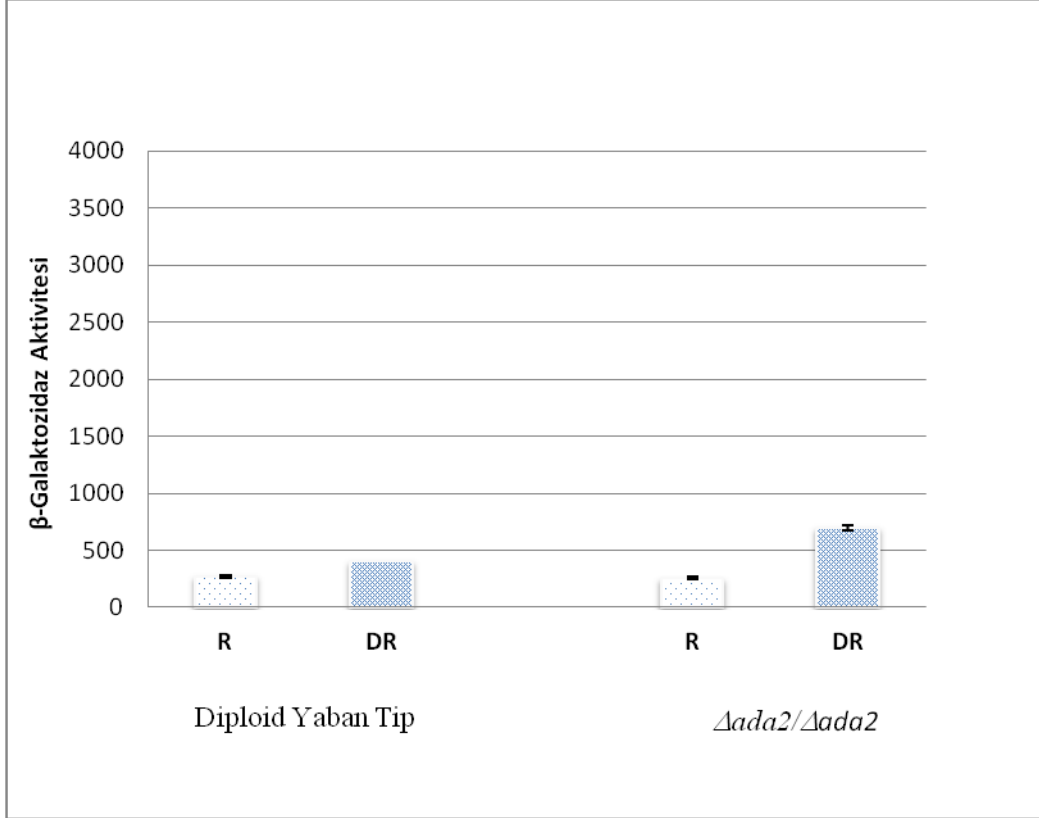
β-Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST124'tür.

ada2 *S. cerevisiae*'nin YST307 suşudur ve YST124'e izogeniktir.

Swi/Snf kompleksinin etkisinin incelenmesinden sonra SAGA kompleksinin de Ty1 transkripsiyonuna etkileri incelendi. Elde edilen sonuçlara göre yüksek glukoz ortamında üretilen haploid *ada2* mutanlığı hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonu Çizelge 4.12'de görüldüğü gibi yaban tip haploid maya hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonuna göre bir miktar azalmıştır. Bununla birlikte düşük glukoz (derepres) ortamında üretilen haploid *ada2* mutanlığı hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonu yaban tip haploid maya hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonuna göre ise bir miktar artmıştır. Bu artış ve azalmalar fizyolojik olarak önemli bulunmamaktadır.

Çizelge 4.13. Ada2p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri



β -Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST125'tir.

ada2/ada2 S. cerevisiae'nın YST308 suşudur ve YST125'e izogeniktir.

Benzer bir şekilde, Çizelge 4.13'te görüldüğü gibi diploid homozigot *ada2* mutanlığı *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonu yaban tip diploid *S. cerevisiae* hücrelerine göre bir miktar azalmıştır ve yüksek glukoz ortamından düşük glukoz ortamına aktarılan homozigot *ada2* mutanlığı diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde ise Ty1 transkripsiyonu yabani tip diploid *S. cerevisiae* hücrelerine yaklaşık 2 kat artmıştır.

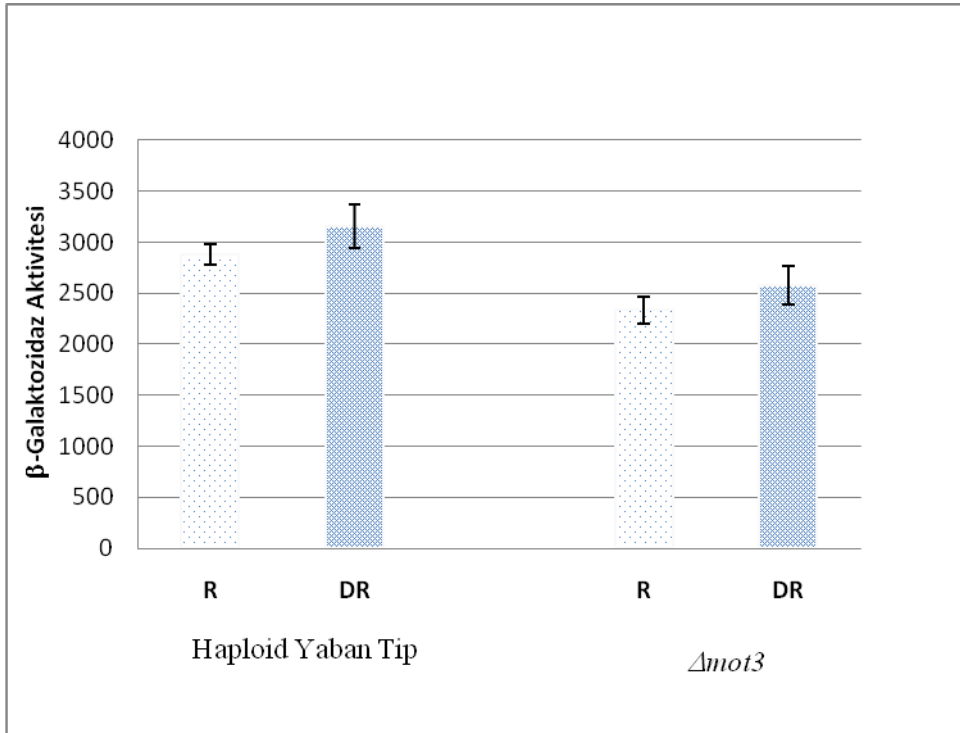
SAGA kompleksi alt birimi olan *ada2* mutanlığı ile yapılan bu araştırma sonuçlarına göre, SAGA kompleksinin Ty1 transkripsiyonunun glukoz sinyali ile kontrolünde kısmen yer aldığı görülmektedir. Bununla birlikte, Swi/Snf kompleksi altünitesi Snf2p glukoz baskılanması ile kontrol edilmemekle birlikte haploid ve diploid

S. cerevisiae hücrelerinde glukoz sinyaline yanıt olarak Ty1 transkripsiyonunun düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğu belirlendi.

4.1.6. Transkripsiyon faktörleri Mot3, Tye7 ve Gcn4'ün Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid ve Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri

Transkripsiyon faktörleri Mot3, Tye7 ve Gcn4'ün Ty1 transkripsiyonunda rol oynadıkları daha önceden bilinmektedir. Bu araştırmada Mot3, Tye7 ve Gcn4 faktörlerinin haploid ve diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde Ty1 transkripsiyonunun glukoz sinyal iletimine yanıt olarak düzenlenmesinde görev alıp almadıkları da incelendi.

Çizelge 4. 14. Mot3p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.



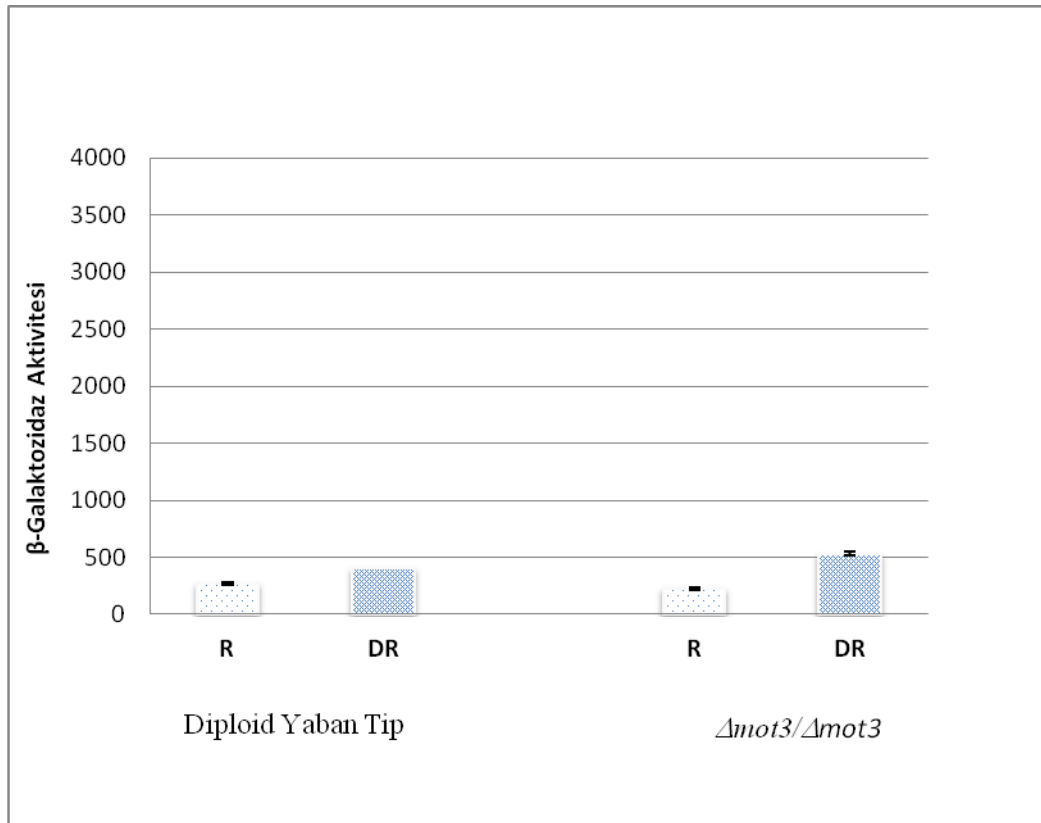
β-Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST124'tür.

mot3 S. cerevisiae'nın YST280 suşudur ve YST124'e izogeniktir.

Sonuç olarak Çizelge 4.14'te görüldüğü gibi yüksek glukoz (repressed) ve düşük glukoz içeren (derepressed) ortam şartlarında üretilen haploid *mot3* mutanlığı *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonunun aynı ortamlarda üretilen yabancı tip haploid maya hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonuna kıyasla bir miktar azaldığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.15. Mot3p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.



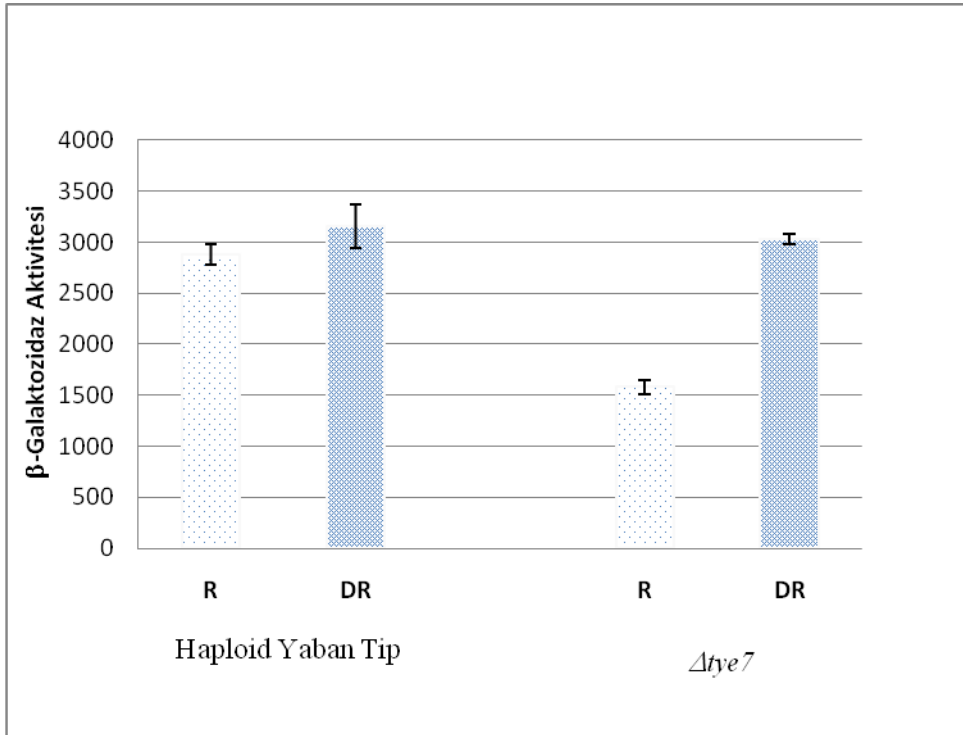
β-Galaktosidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yabancı Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST125'tir.

mot3/mot3 S. cerevisiae'nın YST281 suşudur ve YST125'e izogeniktir.

Diploid *mot3* mutanlığı *S. cerevisiae* hücrelerinde ise Çizelge 4.15.'te görüldüğü gibi repressed şartlarda Ty1 transkripsiyonunun yabancı tip diploid hücrelerdeki Ty1 transkripsiyonuna göre bir miktar azaldığı, derepressed şartlarda ise Ty1 transkripsiyonunun yabancı tip diploid hücrelerine göre kısmen arttığı belirlenmiştir.

Çizelge 4. 16. *Tye7p*'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri.



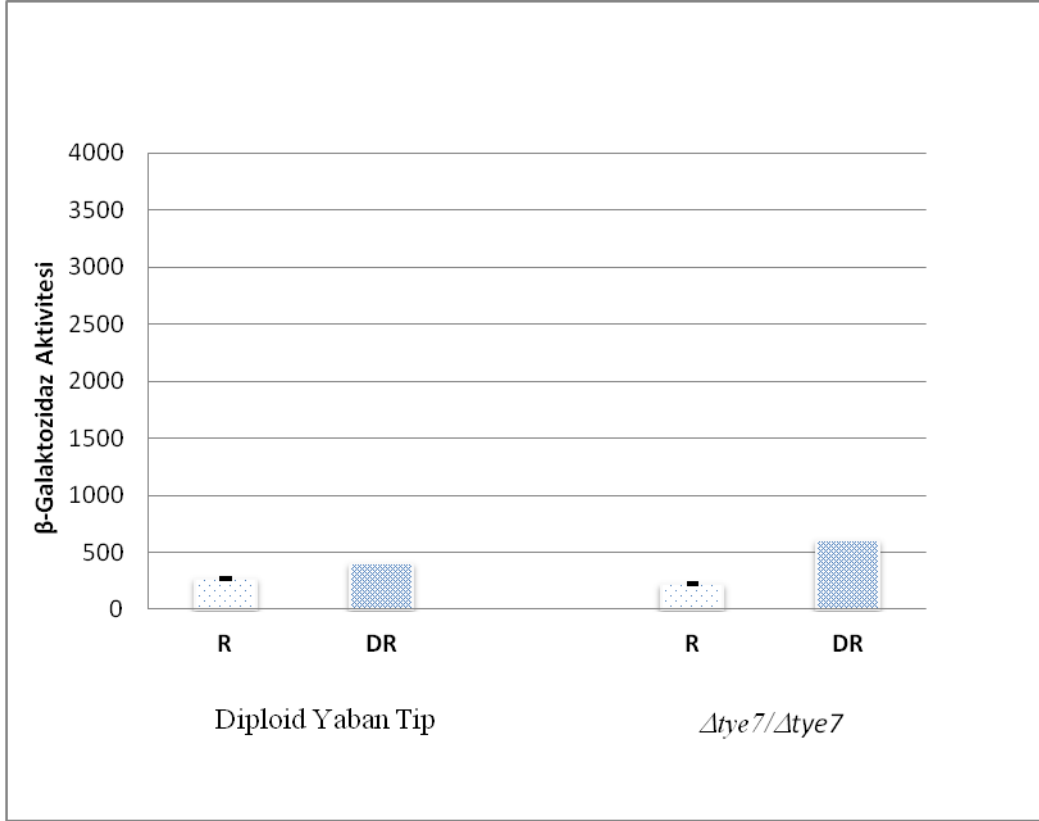
β-Galaktosidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yabancı Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST124'tür.

tye7 S. cerevisiae'nın YST289 suşudur ve YST124'e izogeniktir.

Haploid *tye7* mutanlığı *S. cerevisiae* hücrelerinde Çizelge 4.16'da görüldüğü gibi repressed şartlarda Ty1 transkripsiyonunun yabancı tip haploid hücrelerdekine kıyasla yaklaşık 2 kat azaldığı, derepressed şartlarda ise Ty1 transkripsiyon seviyesinin değişmediği belirlenmiştir.

Çizelge 4.17. Tye7p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri



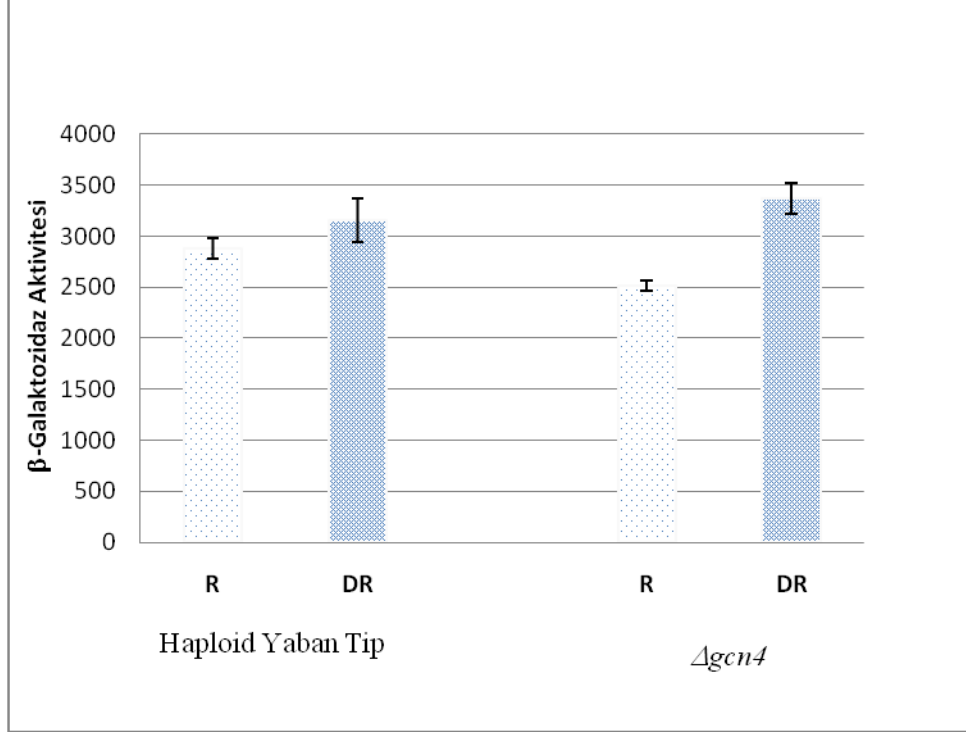
β -Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST125'tir.

tye7/tye7 S. cerevisiae'nın YST290 suşudur ve YST125'e izogeniktir.

Bununla birlikte, diploid homozigot *tye7* mutanlığı *S. cerevisiae* hücrelerinde ise Çizelge 4. 17'de görüldüğü gibi repressed şartlarda Ty1 transkripsiyonunun yaban tip diploid maya hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonuna göre bir miktar azaldığı fakat derepressed şartlarda Ty1 transkripsiyonunun kısmen arttığı belirlenmiştir.

Çizelge 4. 18. Gcn4p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri



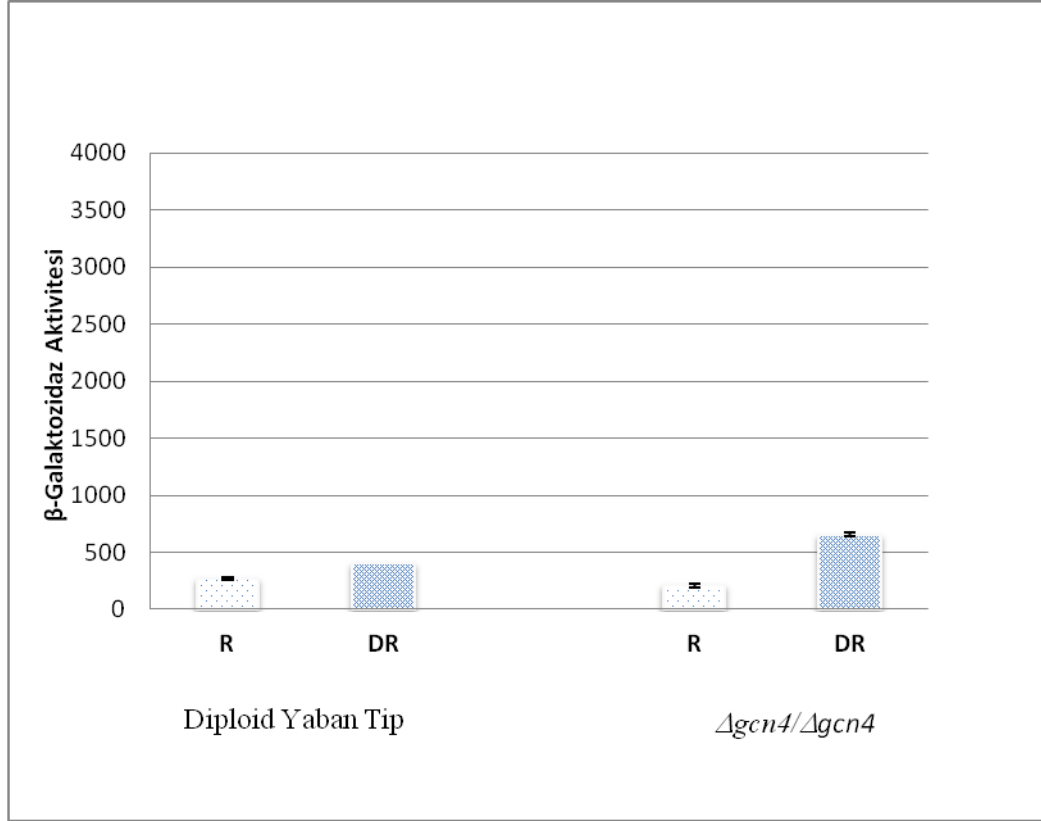
β-Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST124'tür.

gcn4 *S. cerevisiae*'nin YST261 suşudur ve YST124'e izogeniktir.

Ayrıca, haploid *gcn4* mutantı maya hücrelerinde Çizelge 4.18'de görüldüğü gibi Ty1 transkripsiyonununun hem repressed hem derepressed şartlarda yaban tip haploid hücrelerdeki Ty1 transkripsiyon seviyelerine göre fazla değişmediği belirlenmiştir.

Çizelge 4.19. Gcn4p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri



β-Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST125'tir.

gcn4/gcn4 S. cerevisiae'nin YST263 suşudur ve YST125'e izogeniktir.

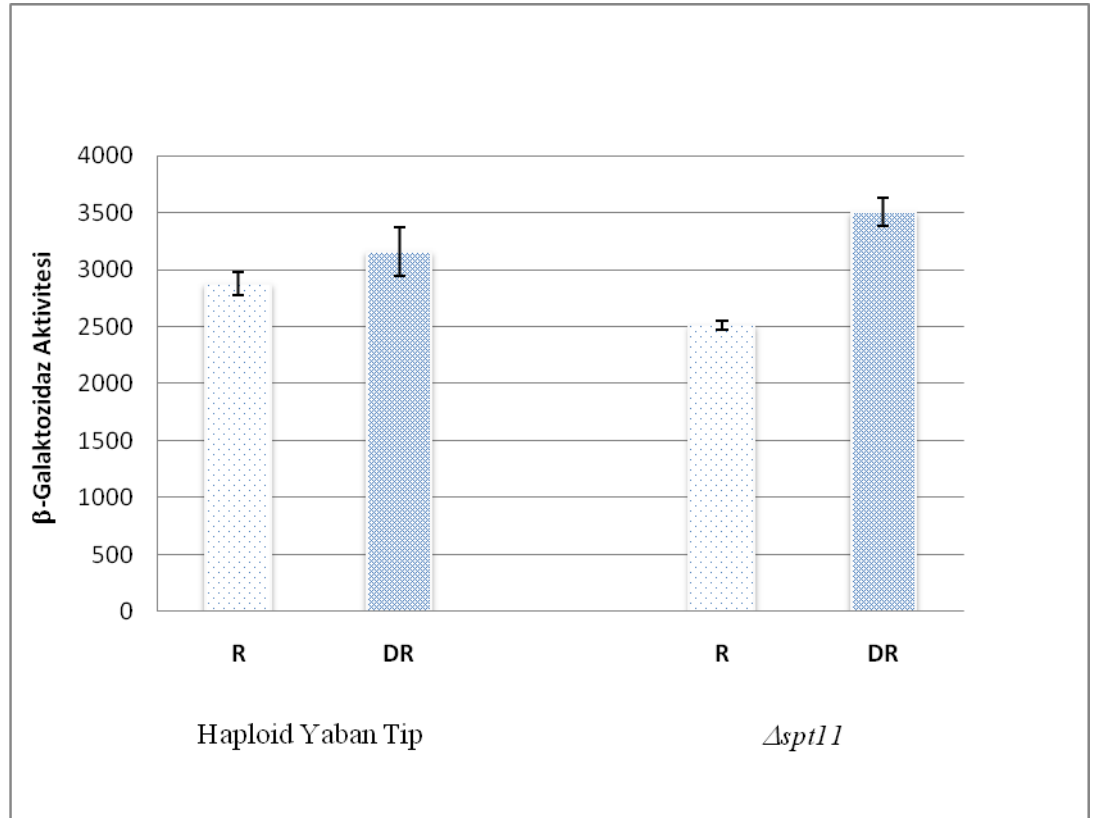
Diploid homozigot *gcn4* mutanlığı *S. cerevisiae* hücrelerinde ise Çizelge 4.19'da görüldüğü gibi Ty1 transkripsiyonunun repressed şartlarda yaban tip diploid hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonuna göre fazla değişmediği fakat derepressed şartlarda Ty1 transkripsiyonunun bir miktar arttığı gözlenmiştir.

Bu sonuçlara göre Mot3 ve Gcn4 transkripsiyon faktörlerinin Ty1 transkripsiyonunun glukoz sinyaline yanıt olarak düzenlenmesinde kısmi etkileri olduğu, Tye7p'nin ise daha etkin bir rol üstlendiği belirlendi.

4.1.7. Spt11p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid ve Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri

H2A histon proteinini kodlayan ve bir Ty supresörü olan *SPT11*'in haploid ve diploid *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinde glukoz sinyaline yanıt olarak Ty1 transkripsiyonuna etkilerini ölçmek için Ty1-lacZ plazmiti, haploid ve diploid *spt11* mutanlığı *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerine ayrı ayrı transform edildi. Transformantlar yüksek glukoz içeren repressed veya düşük glukoz içeren derepressed ortamında üretildi.

Çizelge 4. 20. Spt11p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Haploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri



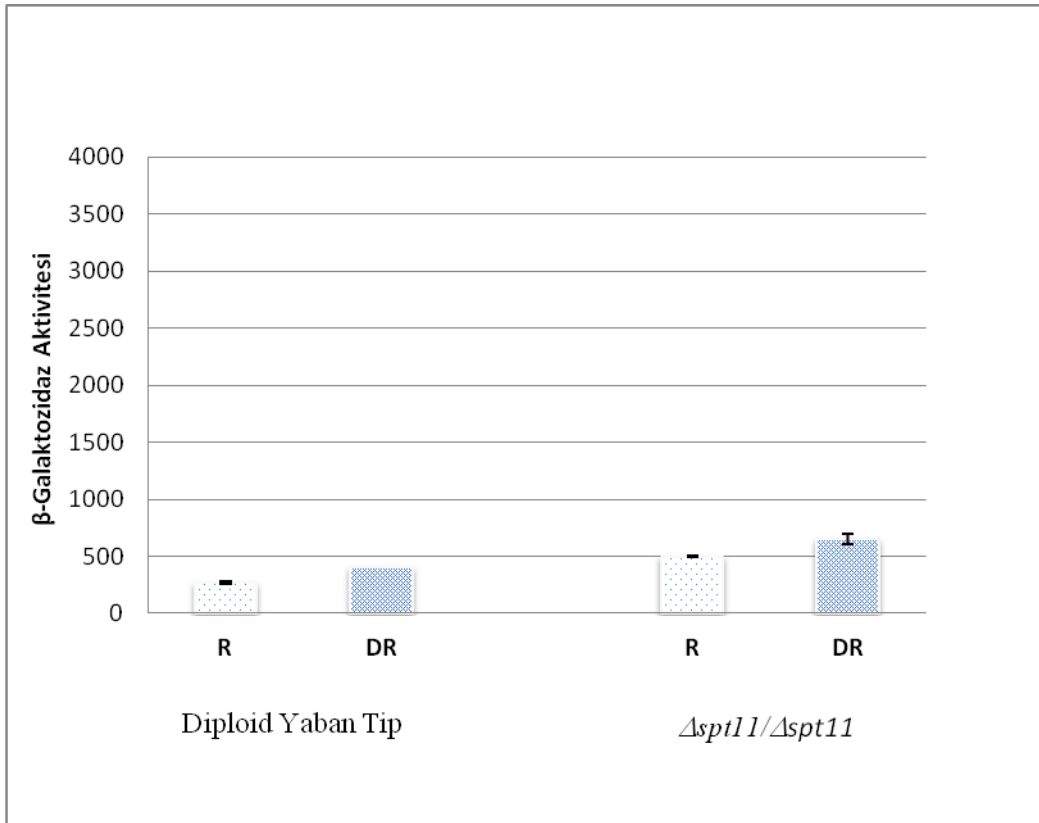
β-Galaktosidaz aktivitelemi dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST124'tür.

spt11 S. cerevisiae'nin YST282 suşudur ve YST124'e izogeniktir.

Sonuç olarak Çizelge 4.20.'de görüldüğü gibi; Yüksek glukoz (Repressed) ve düşük glukoz içeren (Derepressed) ortamlarda üretilen haploid *spt11* mutanlığı maya hücrelerinin, aynı şartlarda üretilen yabancı tip haploid maya hücrelerine göre Ty1 transkripsiyon seviyelerinin fazla değişmediği belirlenmiştir.

Çizelge 4.21. Spt11p'nin Glukoz Sinyaline Yanıt Olarak Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri



β-Galaktosidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yabancı Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST125'tir.

spt11/spt11 S. cerevisiae'nin YST284 suşudur ve YST125'e izogeniktir.

Yüksek glukoz (Repressed) ve düşük glukoz içeren (Derepressed) ortamlarda üretilen homozigot *spt11* mutanlığı diploid maya hücrelerinin, aynı şartlarda üretilen

yaban tip diploid maya hücrelerine göre Ty1 transkripsiyonunun kısmen arttığı belirlenmiştir.

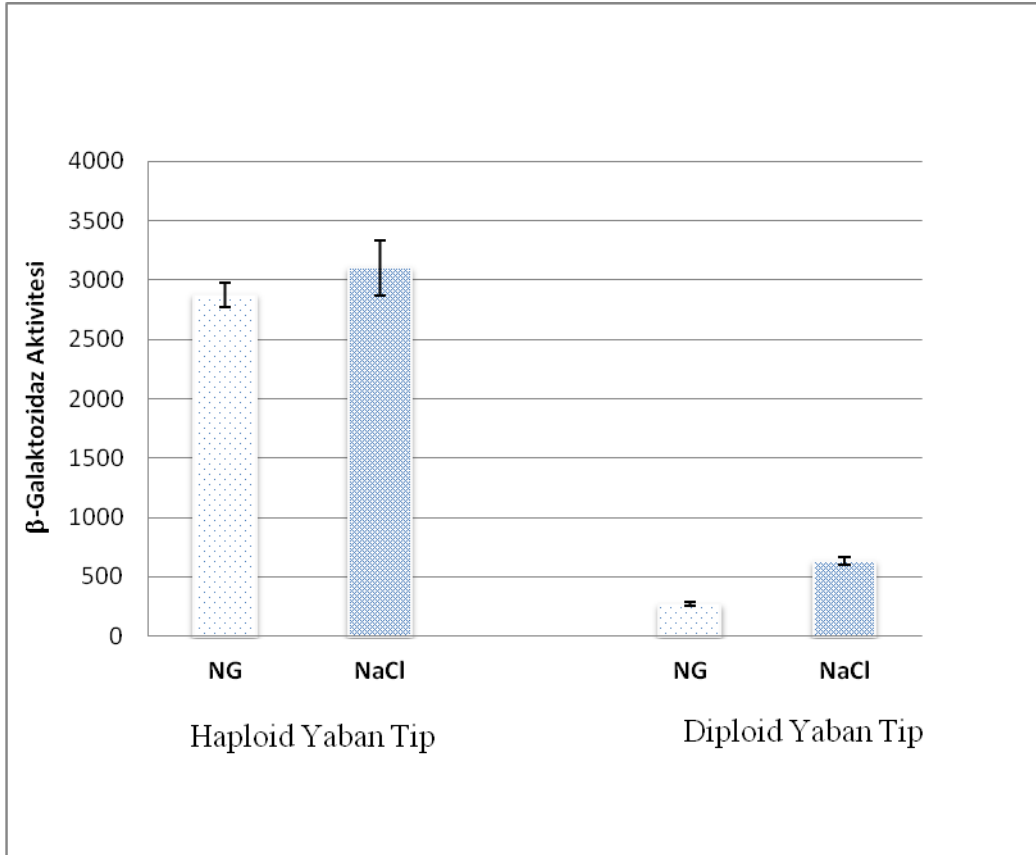
Bu sonuçlardan dolayı Spt11'in *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinde hücre tipine özel Ty1 transkripsiyonun glukozla kontrolünde kısmi bir etkisi olduğu düşünülmektedir.

4. 2. Ozmotik Stresin Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri

4.2.1. Ozmotik Stresin Haploid ve Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri

Ortam şartlarından etkilendiği bilinen transkripsiyon faktörlerinin ozmotik stres şartlarında Ty1 transkripsiyonunun düzenlenmesinde nasıl bir etkileri olduğu ve hangi faktörlerin ozmotik strese yanıt olarak Ty1 transkripsiyonunun düzenlenmesinde görev aldığı bilinmemektedir. Bu araştırmada öncelikle haploid ve diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde Ty1 transkripsiyonunun ozmotik stresten etkilenip etkilenmediğini araştırılmıştır.

Çizelge 4.22. Ozmotik Stresin haploid ve diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde Ty1 transkripsiyonuna etkileri



β -Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

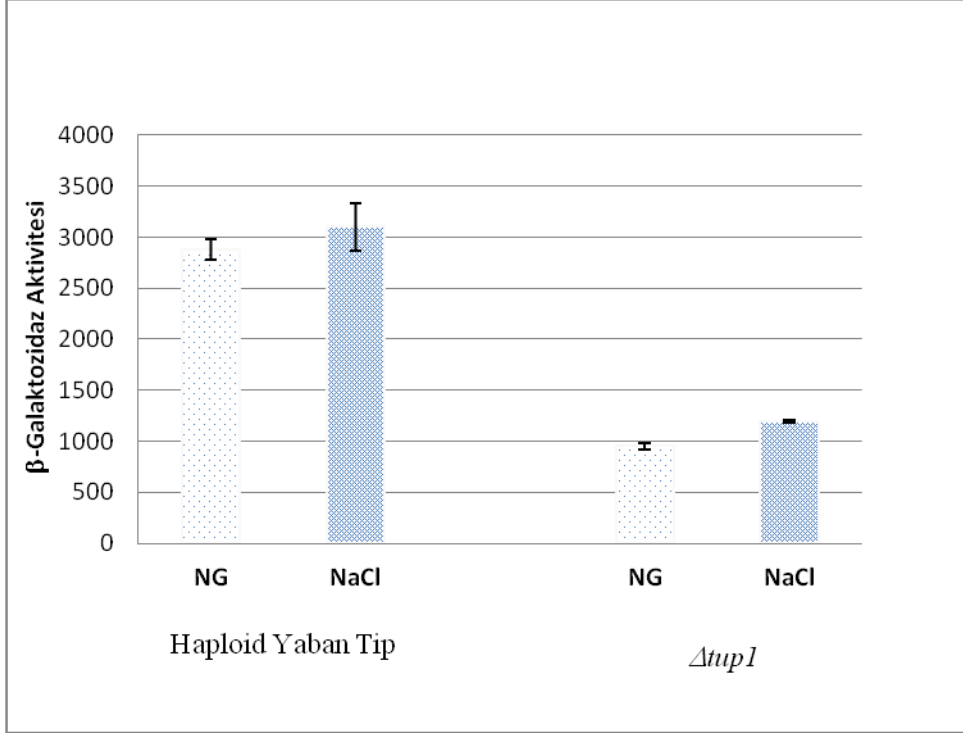
β -Galaktozidaz aktiviteleri *S. cerevisiae*'nın yaban tip haploid suşu olan YST124 (HYT) ve yaban tip diploid suşu olan YST125 (DYT) transformantlarında ölçülmüştür.

Sonuç olarak Çizelge 4.21'de görüldüğü gibi ozmotik stres (0,8 M NaCl) ortamında üretilen yaban tip *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonunun normal üreme (%2 glukoz) şartlarında üretilen haploid yaban tip *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonuyla aynı seviyelerde olduğu, yaban tip diploid hücrelerde ise ozmotik stres (0,8 M NaCl) ortamında üretilen yaban tip *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonunun normal üreme ortamında büyüyen yaban tip *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonuna göre 2 kat arttığı görülmüştür.

4.2.2. Tup1 Ko-represörünün Ozmotik Strese Yanıt Olarak Haploid ve Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri

Tup1p'nin hücrelerde Rap1p, Mcm1p ve diploid hücrelerde ise a1/ α 2 etkileştiği bilinmektedir. Tup1p ayrıca ozmotik stres ile aktive edilen Hog1p ile de etkileşmektedir. Bundan dolayı, Tup1p'nin ozmotik strese yanıt olarak Ty1 transkripsiyonundaki artışta işlevi olup olmadığı da incelendi. Bunun için, Ty1-lacZ gen füzyonunu içeren plazmit haploid ve diploid *tup1* mutantı hücrelerine transform edildi. Transformantlar logaritmik fazda 0,8M NaCl eklenerek ozmotik strese maruz bırakıldı.

Çizelge 4.23. Tup1p'nin Ozmotik Strese Yanıt Olarak Haploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri



β-Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

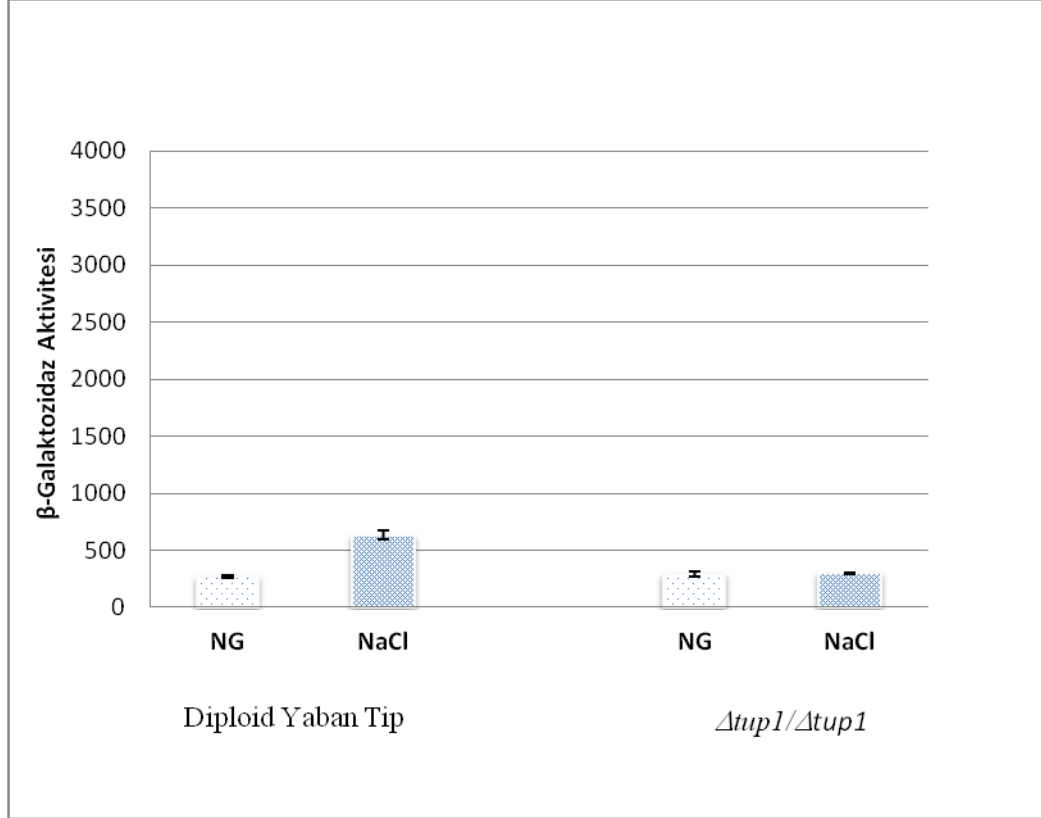
Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST124'tür.

tup1 *S. cerevisiae*'nın YST301 suşudur ve YST124'e izogeniktir.

-NG: Normal Üreme Ortamı

Haploid hücrelerde Ty1 transkripsiyonunda ozmotik strese yanıt olarak önemli bir artış görülmedi (Çizelge 4.23.). *Δtup1* mutantı haploid hücrelerde de ozmotik strese yanıt olarak Ty1 transkripsiyonunda önemli bir artış görülmedi.

Çizelge 4.24. Tup1p'nin Ozmotik Strese Yanıt Olarak Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri



β-Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST125'tir.

tup1/tup1 S. cerevisiae'nın YST302 suşudur ve YST125'e izogeniktir.

NG: Normal üreme koşulları

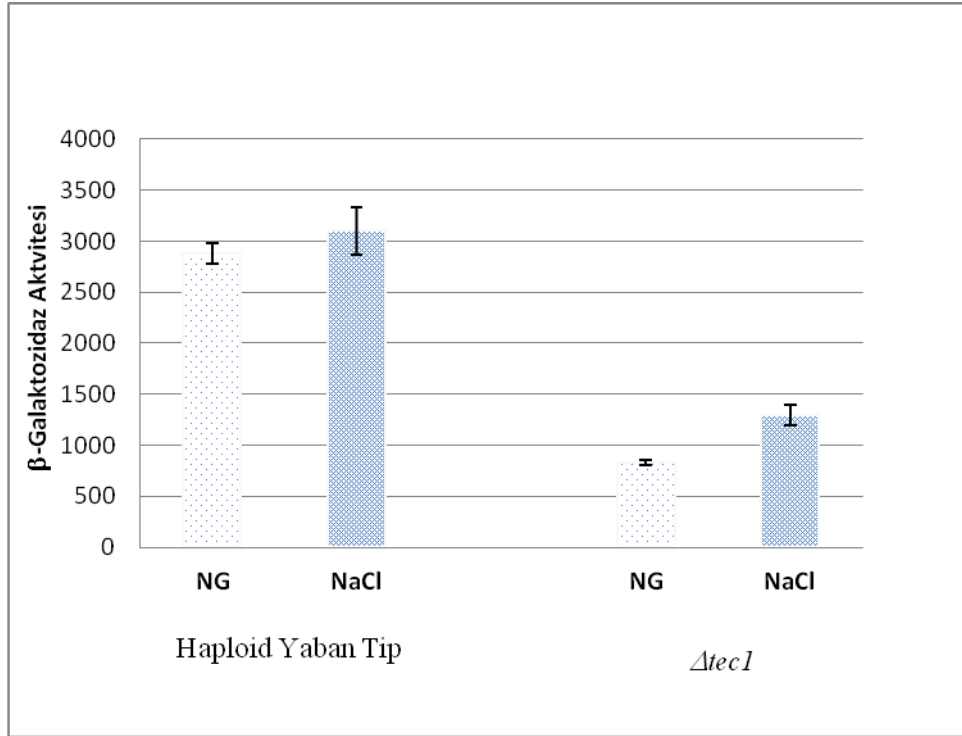
NaC: Ozmotik stres uygulanan koşullar

Haploid hücrelerden farklı olarak, diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde ozmotik stres uygulandığında Ty1 transkripsiyonunda en az 2-3 kat artış olduğu ve bu artışın da Tup1p'ye bağlı olduğu gösterildi (Çizelge 4.24.).

4.2.3. Tec1p Transkripsiyon Faktörünün Ozmotik Strese Yanıt Olarak Haploid ve Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri

Araştırmamızın bu aşamasında, transkripsiyon faktörü Tec1p'nin haploid ve diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde ozmotik strese yanıt olarak Ty1 transkripsiyonunu düzenleyip düzenlemediğini incelendi.

Çizelge 4.25. Tec1p'nin Ozmotik Strese Yanıt Olarak Haploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri



β-Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST124'tür.

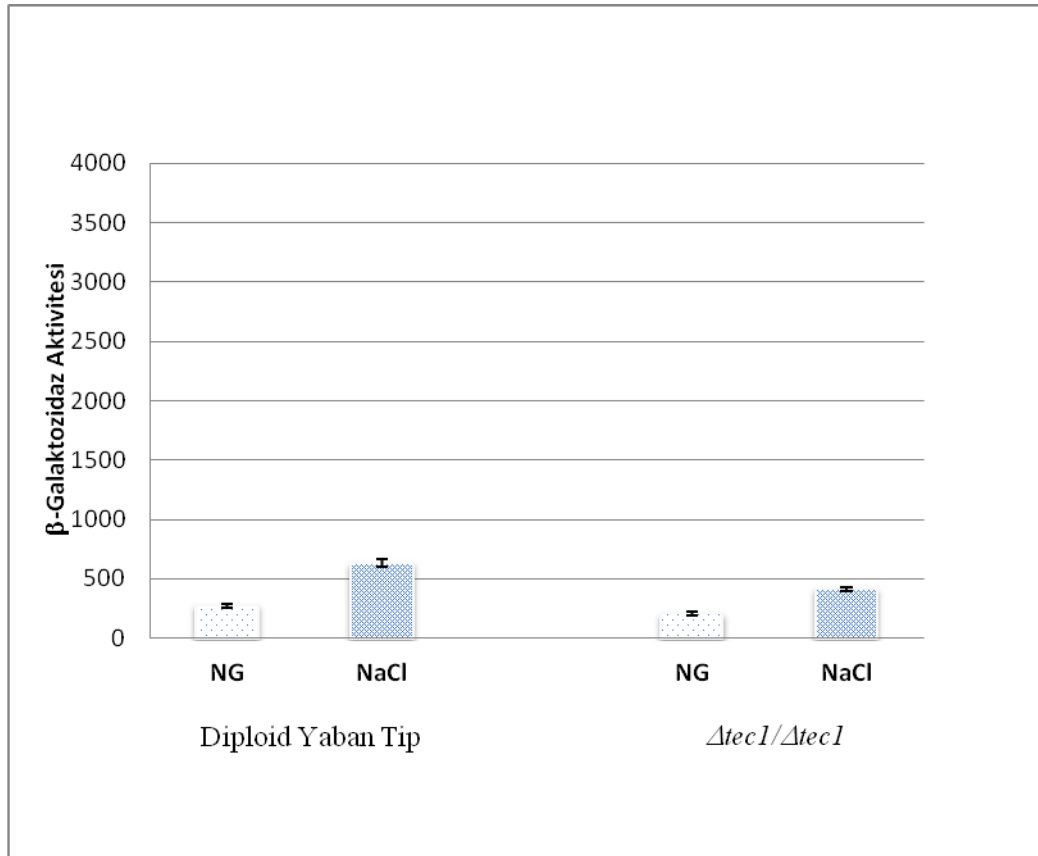
tec1 *S. cerevisiae*'nın YST265 suşudur ve YST124'e izogeniktir.

NG: Normal üreme koşulları

NaC: Ozmotik stres uygulanan koşullar

Sonuçlar, Çizelge 4.25’de verildi. Yüksek glukoz ve ozmotik stres şartlarında üretilen haploid *tec1* mutanlığı *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonu aynı şartlarda üretilen haploid yaban tip *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonuna göre 3 kat azaldığı bulundu.

Çizelge 4.26. *Tec1p*’nin Ozmotik Strese Yanıt Olarak Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri



β-Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST125’dir.

tec1/tec1 S. cerevisiae’nın YST267 suşudur ve YST125’e izogeniktir.

NG: Normal üreme koşulları

NaC: Ozmotik stres uygulanan koşullar

Şekil 4.26’da görüldüğü gibi normal üreme ortamında ve ozmotik stres şartlarında üretilen diploid *tec1* mutanlığı *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonu

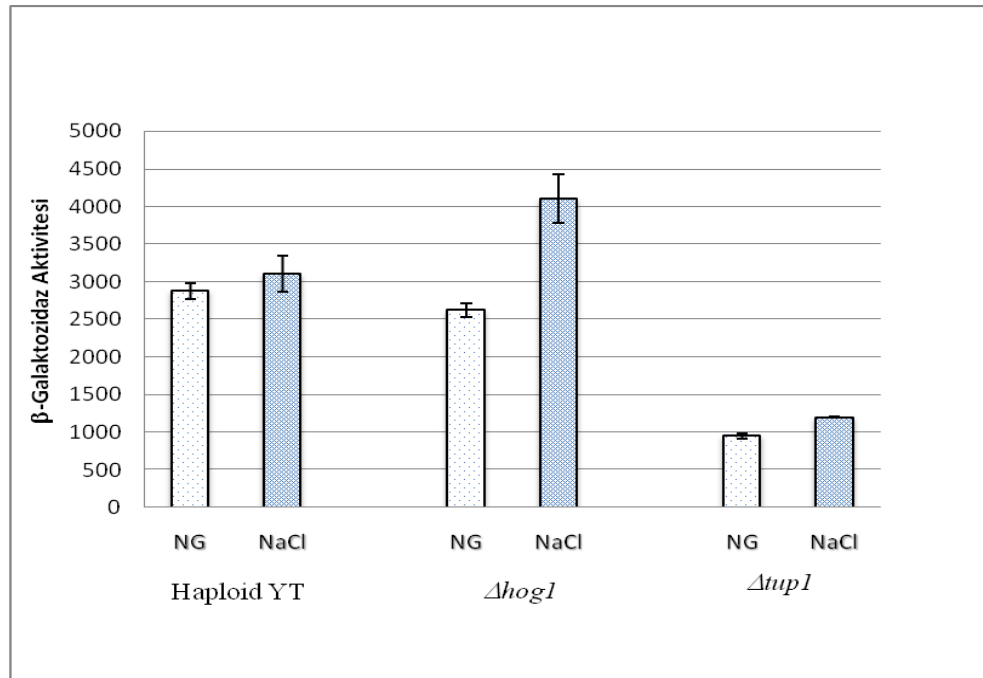
aynı şartlarda üretilen diploid hücrelerdeki Ty1 transkripsiyonuna göre bir miktar azalmıştır.

Bu sonuçlara göre, *tec1p* ozmotik strese yanıt olarak haploid hücrelerdeki Ty1 transkripsiyonunu aktive edip düzenlenmesinde önemli bir etkisi olmadığı belirlendi.

4.2.4. Hog1p'nin Ozmotik Strese Yanıt Olarak Haploid ve Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri

Hog1p mayanın hiperozmotik strese adapte olmasında önemli bir MAP kinaz proteindir. Yapılan çalışmalar sonucu, hiperozmotik stres sayesinde uyarılan bazı genlerin transkripsiyonlarının düzenlenmesinde Hog1p'nin, Ssn6-Tup1, SAGA ve Swi-Snf kompleksleri ile ortaklaşa görev aldıkları belirlenmiştir (Proft 2001). Bu araştırmada Hog1p'nin Ty1 transkripsiyonunun ozmotik strese yanıt olarak düzenlenmesinde görev alıp almadığını araştırılmıştır.

Çizelge 4.27. Hog1p'nin Ozmotik Strese Yanıt Olarak Haploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri



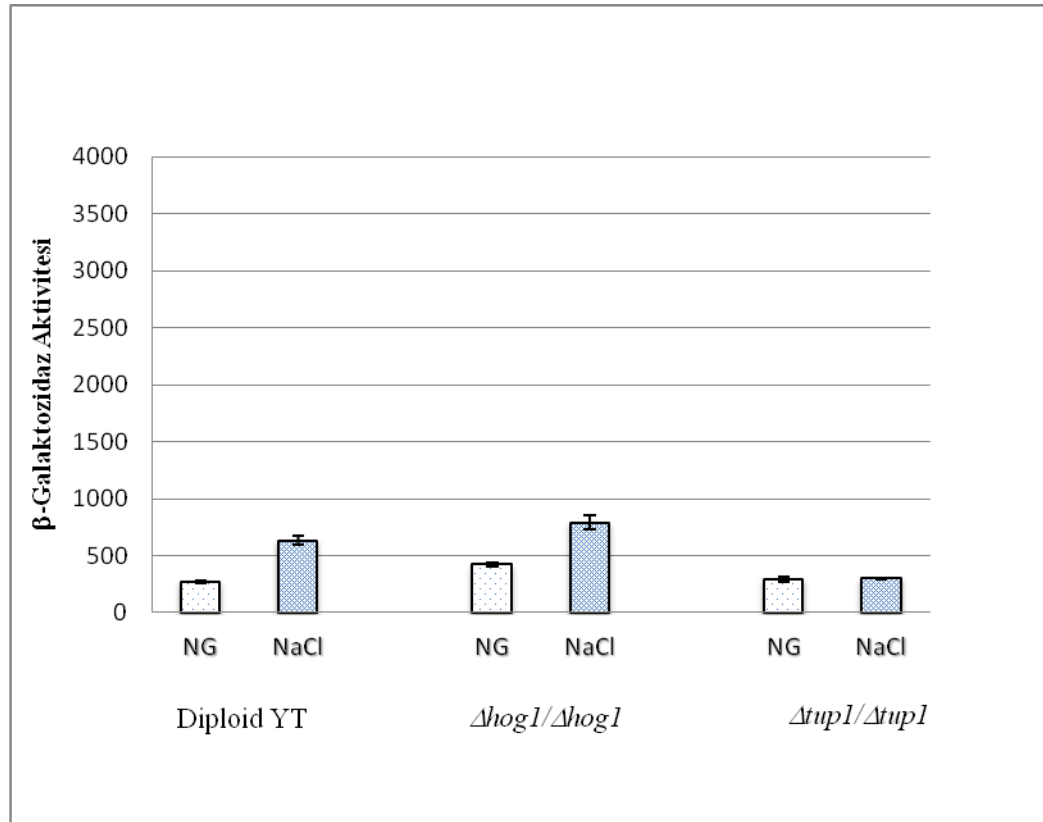
β -Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST124'tür.

hog1 S. cerevisiae'nin YST240 suşudur ve YST124'e izogeniktir.

Çizelge 4.27'de görüldüğü gibi, normal ortamda üretilen haploid *hog1* mutanlığı *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonunun yaban tip haploid maya hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonuna göre bir miktar azalırken, ozmotik stres (0,8 M NaCl) şartlarında üretilen haploid *hog1* mutanlığı *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonu aynı şartlarda üretilen yaban tip haploid hücrelerdeki Ty1 transkripsiyonuna göre önemli bir artış olmadığı belirlendi.

Çizelge 4.28. Hog1p'nin Ozmotik Strese Yanıt Olarak Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri



β -Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST125'tir.

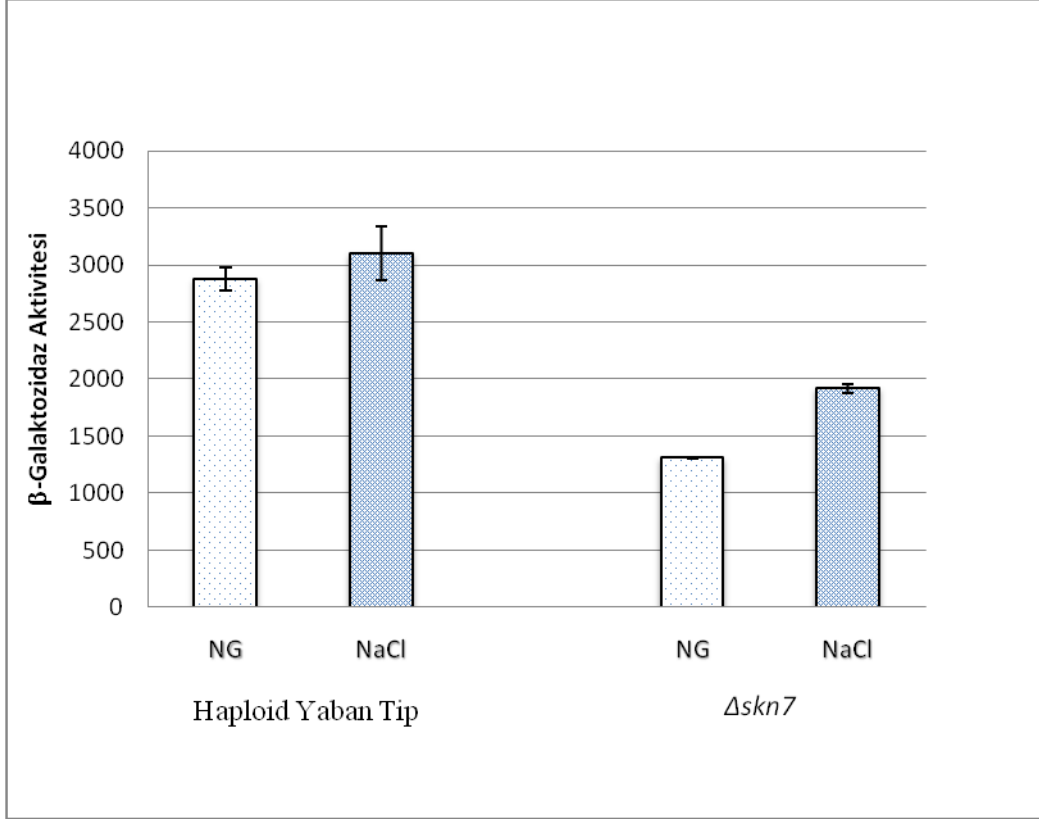
hog1/hog1 S. cerevisiae'nin YST309 suşudur ve YST125'e izogeniktir.

Diploid homozigot *hog1* mutanlığı *S. cerevisiae* hücrelerinde ise Çizelge 4.28'de görüldüğü gibi normal ortam şartlarında ve ozmotik stres şartlarında üretilen diploid homozigot *hog1* mutanlığı hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonu aynı şartlarda üretilen yaban tip diploid hücrelerdeki Ty1 transkripsiyonuna göre kısmen artmıştır.

4.2.5. Skn7p'nin Ozmotik Strese Yanıt Olarak Haploid ve Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri

Skn7p, ozmoregülasyonda görevlidir ve Ssn6-Tup1 kompleksi ile etkileşerek Tup1 proteininin hedef bölgelerle etkileşmesini sağlayan transkripsiyon faktörüdür. Ozmotik strese bağılı olarak gerçekleşen Ty1 transkripsiyonundaki artışta Skn7p'nin etkisi olup olmadığı da incelendi. Bunun için $\Delta skn7$ ve $\Delta skn7/\Delta skn7$ mutantlarına Ty1-lacZ gen füzyonunu içeren plazmit vektörü transformasyon ile aktarıldı. Transformantlar normal koşullarda logaritmik faza kadar üretildi ve ozmotik stres oluşturmak için 0,8 M NaCl ilave edildi.

Çizelge 4.29. Skn7p'nin Ozmotik Strese Yanıt Olarak Haploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri



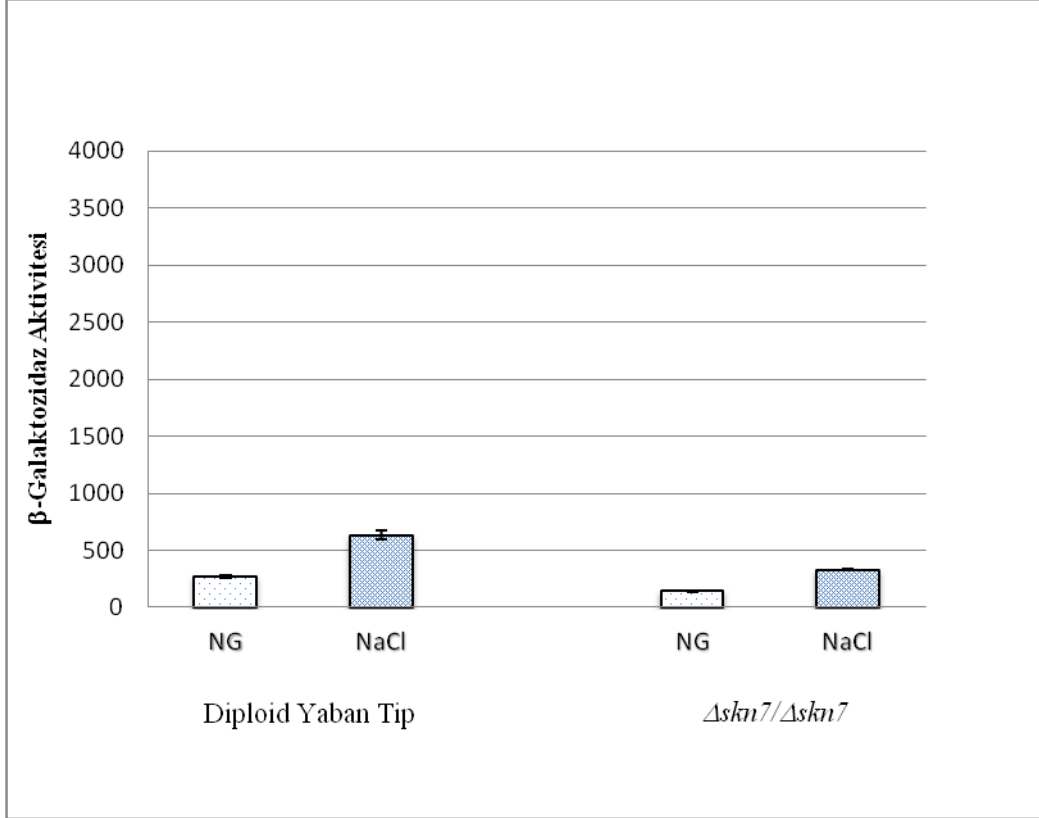
β-Galaktosidaz aktivitelemi dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST124'tür.

skn7 *S. cerevisiae*'nin YST303 suşudur ve YST124'e izogeniktir.

Çizelge 4.29'da görüldüğü gibi, yüksek glukoz içeren normal ortam şartlarında üretilen *skn7* mutanlığı haploid maya hücrelerinde Ty1 transkripsiyonun, aynı şartlarda üretilen yaban tip haploid hücrelere göre yaklaşık 2-3 kat azaldığı, Ozmotik stres şartlarında üretilen haploid *skn7* mutanlığı maya hücrelerinde ise Ty1 transkripsiyonunda yaklaşık %40 artış olduğu bulundu.

Çizelge 4.30. Skn7p'nin Ozmotik Strese Yanıt Olarak Diploid *S. cerevisiae* Hücrelerinde Ty1 Transkripsiyonuna Etkileri



β -Galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg protein başına hidroliz edilen nanomole ONPG olarak verilmiştir.

Yaban Tip Haploid *S. cerevisiae* suşu YST125'tir.

skn7/skn7 S. cerevisiae'nin YST304 suşudur ve YST125'e izogeniktir.

Bununla birlikte, Çizelge 4.30'da görüldüğü gibi, normal şartlarda (%2 glukoz) ve ozmotik stres şartlarında üretilen homozigot *skn7* mutantı diploid hücrelerde Ty1 transkripsiyonunun aynı şartlardaki yaban tip diploid hücrelere göre iki kat azaldığı; Ayrıca ozmotik stres şartlarında üretilen haploid *skn7* mutantı maya hücrelerinde ve homozigot *skn7* mutantı diploid maya hücrelerinde Ty1 transkripsiyonun yüksek glukoz ortamında üretilen haploid *skn7* mutantı ve homozigot *skn7* mutantı diploid maya hücrelerine göre kısmen arttığı ve bu artışın yaban tip hücrelerin ozmotik stres ortamına alınmasıyla gerçekleşen artışla aynı paralelde olması nedeniyle Skn7p'nin Ty1 transkripsiyonunun ozmotik stresle düzenlenmesinde önemli etkisi olmadığı

belirlenmiştir. Ayrıca, Skn7 transkripsiyon faktörünün bazal seviyede Ty1 transkripsiyonu için gerekli olduğu belirlendi.

5- TARTIŞMA VE SONUÇ

Bir mikroorganizma olarak *S. cerevisiae*, bulunduğu ortamdaki besinleri algılayabilmekte ve gen ifadesini düzenleyerek ortam değişimlerine yanıt verebilmektedir. Ortamdaki besinsel değişim algılandığı anda bu bilgi nukleusa taşınarak bazı genlerin aktivasyonuna ya da baskılanmasına neden olabilmektedir (Gagiano ve ark. 2002). Örneğin, fermente edilemeyen üreme ortamında üremekte olan *S. cerevisiae* kültürlerine yüksek oranda glukoz (%2) eklendiğinde *S. cerevisiae* genomundaki genlerin yaklaşık %30'unda transkripsiyon seviyesinde artma veya azalma olduğu belirtilmektedir (Schneper ve ark. 2004). Araştırmamızda model retrovirüs benzeri element olarak kullanılan Ty1 retrotranspozonu herhangi bir transkripsiyon faktörü kodlamaz ve transkripsiyonu tamamen konak olarak bulunduğu *S. cerevisiae* tarafından kodlanan faktörlere bağlıdır. Bundan dolayı ortamdaki fizyolojik değişimlere bağlı olarak bazı genlerin aktive edilmesi ya da baskılanması Ty1 gen ifadesini etkileyebilmektedir.

Haploid a ve haploid α hücrelerine kıyasla diploid a/α hücrelerinde Ty transkripsiyon düzeyleri 5 ila 20 kat arasında azalmaktadır (Elder ve ark. 1981, Errede ve ark. 1980). Haploid ve diploidlerdeki Ty transkripsiyonu arasındaki bu 5 ila 20 katlık farkın nedeni tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Ancak Ty1 elementi promotor bölgesinde Blok II bölgesine bağlanan $a1/\alpha2$ heterodimer protein kompleksinin *MATa1*, *STE12* gibi haploid spesifik genlerin yanında Ty virüsü ve Ty virüsü tarafından düzenlen genlerin ifadesini baskıladığı bilinmektedir (Elder ve ark. 1981, Errede ve ark. 1980, Fields ve Herskowitz 1987, Goutte ve Johnson 1988, Klar ve ark. 1981, Nasmyth ve ark. 1981, Taguchi ve ark. 1984). Ssn6-Tup1 kompleksinin haploid hücrelerde $\alpha2$ -Mcm1 heterodimeri ile diploid hücrelerde ise $a1$ - $\alpha2$ heterodimeri ile etkileştiğinin bilinmesi nedeniyle haploid ve diploid *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonu arasındaki farklılığa neden olabilecek faktörlerden biri olma ihtimali düşünülerek yapılan araştırmalar sonucunda da Tup1p'nin haploid *S. cerevisiae* hücrelerinde Ty1 transkripsiyonunu 3 kat arttırdığını fakat diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde Ty1 transkripsiyonu seviyesini değiştirmedeğini; Bununla birlikte, repressed, derepressed ve ozmotik stres ortam şartlarında Ty1 transkripsiyon düzeyleri arasında bir korelasyonun

olması nedeniyle hem haploid hem diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde Ty1 transkripsiyonunun düzenlenmesinde görev aldığı belirlenmiştir.

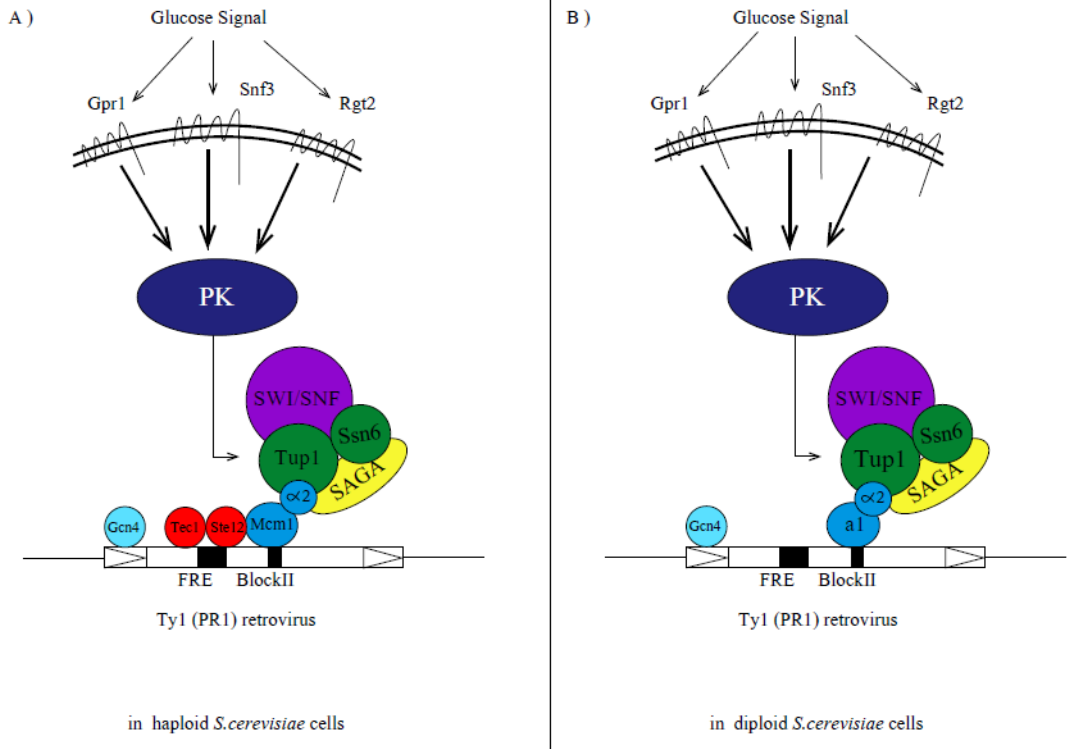
Bu araştırma sonucunda, Tec1p'nin de haploid *S. cerevisiae* hücrelerinde yüksek glukoz, düşük glukoz, gliserol-laktat ve ozmotik stres ortamlarında Tup1p ile doğru orantılı bir şekilde Ty1 transkripsiyonunu 3 kat arttırdığı, diploid *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty1 transkripsiyonunu ise glukoz sinyaline göre düzenlediği belirlenmiştir. Haploid hücrelerde Tup1p ve Tec1p arasındaki bu bağlantı, Mcm1p ve Ste12p arasında daha önce kanıtlanmış olan bağlantıyla açıklanabilir. Bazı hücre tipine özel promotorlarda Mcm1p'nin Ste12p ile etkileştiği bilinmektedir (Dolan ve Fields 1991, Errede ve Ammerer 1989, Mueller ve Nordheim 1991, Primig ve ark. 1991). Bu da haploid *S. cerevisiae* hücrelerinde Tup1p ile etkileşen Mcm1p'nin Ste12p aracılığı ile de Tec1p ile etkileşebileceğini göstermektedir. Diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde ise a1- α 2 heterodimer proteini *MATa1*, *STE12*, Ty ve Ty tarafından kontrol edilen genleri baskıladığı için diploidlerde Ste12p ve Mcm1p arasında bir etkileşim olmadığı düşünülmektedir (Elder ve ark. 1981, Errede ve ark. 1980, Fields ve Herskowitz 1987, Goutte ve Johnson 1988, Klar ve ark. 1981, Nasmyth ve ark. 1981, Taguchi ve ark. 1984). Diğer taraftan, ozmotik strese yanıt olarak Tup1p aracılığıyla düzenlenen Ty1 transkripsiyonunda görev alan diğer faktörler bilinmemektedir. Daha önceki araştırmacılar tarafından Ssn6-Tup1 kompleksi ile bağlantıları kanıtlanmış olsa da, bu tez araştırmasında Hog1p ve Skn7p'nin bu düzenlenmede önemli bir rol almadığı gösterildi (Proft ve Struhl, 2002, Hanlon ve ark. 2011). Skn7p ozmotik stres aracılığıyla Ty1 transkripsiyonun düzenlenmesinde rol oynamasa da bazal seviyede Ty1 transkripsiyonunu 2 kat arttırdığı ve Ty1 transkripsiyonu için gerekli olduğu belirlenmiştir.

Açıklığa kavuşması gereken diğer bir konu da glukoz ve ozmotik stres sinyallerinin Ssn6-Tup1 kompleksine nasıl ulaştığıdır. Snf1p maya hücrelerinin glukoz içermeyen ortamlara adaptasyonunu sağlayan ve alternatif karbon kaynaklarının kullanımında görev alan bir protein kinaz kompleksidir (Gancedo, 1998, Carlson, 1999). Snf1p ve Snf4p arasındaki etkileşimin glukoz tarafından bozulduğu bilinmektedir (Jiang and Carlson, 1996). Bu çalışmada, Snf1 protein kinaz alt birimlerinden birisi olan Snf4p'nin *S. cerevisiae*'da hücre tipine özel olarak Ty1 transkripsiyonunun düzenlenmesinde görev aldığını göstermiştir. Snf1 protein kinaz ve

Ssn6-Tup1 kompleksi arasındaki etkileşim glukoz baskılamasında görevli transkripsiyon faktörü olan Mig1 aracılığıyla olduğu daha önce gösterilmiştir (Treitel ve Carlson, 1995, Tzamarias ve Struhl, 1995). Bunun yanı sıra, düşük glukoz sensörü Snf3p'nin de hücre tipine özel Ty1 transkripsiyonunda kısmen görev aldığı belirlenmiştir. Ayrıca, transkripsiyon faktörleri Mot3p ve Gcn4p'nin Ty1 transkripsiyonunun glukoz sinyaline yanıt olarak düzenlenmesinde kısmi etkileri olduğu, Tye7p'nin ise daha etkin bir rol üstlendiği belirlenmiştir.

Tez araştırmalarımız sırasında Ty1 transkripsiyonuna etkisini araştırdığımız bir sinyal iletim yolağı da azot sinyalidir. Bu kapsamda yaptığımız araştırmalar sonucunda, zengin azot kaynağı olan glutamin ve zayıf azot kaynağı olarak bilinen prolin içeren ortamlarda üretilen yaban tip *S. cerevisiae* hücrelerindeki Ty1 transkripsiyon seviyelerinde normal üreme şartlarına kıyasla önemli bir değişim gözlenmemiştir. Bu nedenle de, azot sinyali ile ilgili araştırma sonuçlarına bulgular kısmında yer verilmemiştir. Ayrıca, tez araştırmalarımız sırasında kullanılan *S. cerevisiae* mutant suşları, tekli mutant suşlardır. Bazı faktörlerin Ty1 transkripsiyonuna etkilerini incelemek için ikili ve hatta üçlü delesyonlu mutant suşların kullanılması da gerekli olabilir. Bu tür durumlarda da sentetik letal fenotip oluşabilmektedir. İkili ve üçlü mutant suşların elde edilmesindeki teknik zorluklar ve sentetik letal fenotip olasılığı nedenleriyle araştırmalarımızda ikili ve üçlü mutant suşlar kullanılmamıştır.

Gen ifadelerinin kromatin modifiye edici ve kromatin düzenleyici faktörler tarafından kolaylaştırıldığı ve Ty1 gen ifadesinin SAGA kromatin modifiye edici kompleks ve Swi/Snf yeniden düzenleyici faktörler tarafından düzenlendiği; Ayrıca Tup1p'nin Swi/Snf ve SAGA komplekslerinin bir araya gelmesinde rol oynadığı bilinmektedir (Proft ve Struhl, 2002). Bu tez araştırması sonucunda, bu komplekslerin Tup1p ile etkileşerek glukoz sinyaline yanıt olarak Ty1 transkripsiyonunun kontrolünde görev aldığı belirlenmiştir. Ty1 transkripsiyonunun glukoz yanıt olarak düzenlenmesinde Snf2p'nin Ada2p den daha önemli rolü olduğu, fakat her iki faktörün de Ty1'in hücre tipine bağlı olarak düzenlenmesinde bir rolü olmadığı belirlenmiştir. H2A histon proteinini kodlayan ve bir Ty supresörü olan Spt11p'nin ise haploid ve diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde Ty1 transkripsiyonunun glukoz sinyaline yanıt olarak düzenlenmesinde önemli bir etkisi olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 5. 1. Glukoz sinyalinin haploid ve diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde Tup1-Ssn6 kompleksine bağlı olarak Ty1 transkripsiyonunu aktive etme modeli.

Bu tez araştırmasında yapılan araştırmaların sonucu olarak, Tup1p'nin haploid *S. cerevisiae* hücrelerinde Ty1 transkripsiyonunu üç kata kadar aktive ettiği, diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde ise Ty1 transkripsiyonunun bazal seviyelerini etkilemediği fakat Ty1 transkripsiyonunun glukoz sinyali ve ozmotik strese yanıt olarak düzenlenmesinde önemli rolü olduğu belirlenmiştir. Şekil 5.1'de görüldüğü gibi glukoz sinyali sensör proteinleri tarafından algılanarak bir protein kinaz kompleksine iletilmekte ve bu sinyal daha sonra Tup1p'ye iletilmektedir. Ty1 transkripsiyonun glukoz sinyali ve ozmotik strese yanıt olarak düzenlenmesi ve aktivasyonunda Swi/Snf kompleksi ile SAGA kompleksi de rol almaktadır. Haploid hücrelerde Tup1p'nin Ty1 retrovirüsünün promotor bölgesindeki Blok II bölgesine bağlanan Mcm1- α 2 heterodimeri ile birlikte kompleks oluşturarak aktivasyonu sağladığı düşünülmektedir. Bu komplekse ayrıca Haploid *S.cerevisiae* hücrelerinde Tec1p ve Ste12p'nin de bağlandığı ve Ty1 transkripsiyonunun aktivasyonunda görev aldığı düşünülmektedir. Diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde ise Tup1p Blok II bölgesinde a1- α 2 heterodimeri ile etkileşerek haploid

hücrelere özel genlerin, Ty ve Ty ile bağlantılı genlerin ayrıca *STE12* geninin ifadesini baskılamaktadır. Böylece Ty1 transkripsiyonu hücre tipine özel olarak düzenlenmektedir. Ozmotik stres sinyalinin de Tup1p'ye hangi faktörler aracılığıyla aktarıldığı açıklığa kavuşmamıştır. Bununla birlikte, Hog1p'nin ozmotik strese yanıt olarak Ty1 transkripsiyonunun düzenlenmesinde kısmen görev aldığı düşünülmektedir. Tup1p *S. cerevisiae*'da çok sayıda protein ile etkileşmektedir (Keleher ve ark. 1992, Tzamarias ve Struhl 1995). Tup1p ile etkileşen faktörlere Tup1 taşıyıcı (Tup1 recruiter) faktörler denilmektedir. Ty1 transkripsiyonu çok sayıda transkripsiyon faktörü ile kontrol edildiğinden Tup1p, Ty1 promotorundaki Rap1p gibi diğer faktörler ile de etkileşebilmektedir (Buck ve Lieb 2006, Johnson 1995, Komachi 1994, Smith ve Johnson 2000, Gavin ve ark. 2000).

Ty1 transkripsiyonunun kontrol bölgesinin önemli bir bölümü TATA kutusunun 3' yönünde ve transkribe edilen bölgededir. Ty1 çok fazla transkribe edilen bir retrotranspozondur. Transkribe edilen Ty1 bölgesine bağlı olan faktörler her RNA pol II geçişinde bağlandıkları bölgeden kısmen de olsa ayrılmaları gerekir. Bundan dolayı Ty1 promotoru çok dinamik yapılıdır. Transkribe edilen bölgede bulunan transkripsiyon faktörleri de transkripsiyon başlangıcına etki edebilmek için katlanmış bir kromatin yapısı oluşturması gerekir. DNA-looping denilen bu olay sonunda da transkripsiyon başlama hızı değişir ve birim zamanda yapılabilen transkript miktarı da farklılık gösterir. Bundan dolayı araştırmamızda özellikle diploid hücrelerde Ty1 transkripsiyonunu kontrol eden faktörlerin delesyonu sonucu Ty1 transkripsiyonunda artış veya azalma görülmektedir. Ty1'in genomdaki kopya sayısının sabit olması çok sayıda transkripsiyon faktörü tarafından kontrol edilerek fizyolojik değişikliklerden çok fazla etkilenmemesi ile sonuçlandığı düşünülmektedir. Özellikle haploid *S. cerevisiae* hücrelerinde Ty1 transkripsiyonunun glukoz sinyalinden fazla etkilenmemesi de bu öneriyi doğrular niteliktedir. Ayrıca, diploid *S. cerevisiae* hücrelerinde glukoz sinyali ve ozmotik strese yanıt olarak Ty1 transkripsiyonunun daha fazla etkilenmesi ve bunun da Tup1p'ye bağlı olması daha önce rapor edilmemiş önemli bir sonuçtur.

6. KAYNAKLAR

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. 1987. Current protocols in molecular biology. *Green Publ. Assoc. And Wiley Interscience*, New York. USA. p.1.6.1-1.6.6.

Ashrafi, K., Lin, S.S., Manchester, J.K., Gordon, J.I. 2000. Sip2p and its partner Snf1p kinase affect aging in *S. cerevisiae*. *Genes Dev*, 14: 1872–1885.

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, U S A* 88(21):9443-7

Balasubramanian, R., Pray-Grant, M.G., Selleck, W., Grant, P.A., Tan, S. 2002. Role of the Ada2 and Ada3 transcriptional coactivators in histone acetylation. *J.Biol.Chem.*, 277: 7989-7995.

Balciunas, D., Ronne, H. 1995. Three subunits of the RNA polymerase II mediator complex are involved in glucose repression. *Nucleic Acids Res.*, 23: 4421-4425.

Baur, M., Esch, R.K., Errede, B. 1997. Cooperative binding interactions required for function of the Ty1 sterile responsive element. *Mol. Cell. Biol.* 17: 4330-4337.

Bayram, Ö. 2003. Ortam Şartlarının Ty2 Retrotranspozonu Transkripsiyonuna ve Frameshift Oranına Etkilerinin Analizi. *Yüksek Lisans Tezi*, UÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

Becker, P.B., Horz, W. 2002. ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem*, 71: 247-273.

Bender, A., Sprague, G.F. Jr. 1987. MAT alpha 1 protein, a yeast transcription activator, binds synergistically with a second protein to a set of cell-type-specific genes. *Cell*, 50(5): 681-91.

Bhaumik, S.R., Green, M.R. 2001. SAGA is essential in vivo target of the yeast acidic activator Gal4p. *Genes Dev.*, 15: 1935-1945.

Bhaumik, S.R., Green, M.R. 2002. Differential requirement of SAGA components for recruitment of TATA- box-binding protein to promoters in vivo. *Mol. Cell. Biol.*, 22: 7365-7371.

Bhaumik, S.R., Raha, T. Aiello, D. P., Green, M.R. 2004. In vivo target of a transcriptional activator revealed by fluorescence resonance energy transfer. *Genes Dev.*, 18: 333-343.

Boeke, J.D., Garfinkel, D.J., Styles, C.A., Fink, G. 1985. Ty elements transpose through an RNA intermediate. *Cell*, 40: 491-500.

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

Boeke, J.D., Stoye, J.P. 1997. Retrotransposons, endogenous retroviruses, and the evolution of retroelements. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, pp: 343-436.

Boles, E., Hollenberg, C.P. 1997. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.*, 21: 85-111.

Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputa, E., Li, J., Hieter, P., Boeke, J.D. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, 14: 115-132.

Bradshaw, V.A., Mcentee, K. 1989. DNA damage activates transcription and transposition of yeast Ty retrotransposons. *Mol. Gen. Genet.*, 213: 465-474.

Buck, M.J., Lieb, J.D. 2006. A chromatin mediated mechanism for specification of conditional transcription factor targets. *Nat Genet.*, 38: 1446-1451.

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

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

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

Celenza, J.L., Carlson, M. 1989. Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol Cell Biol*, 9(11): 5034-44

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

Ciriacy, M., Freidel, K., Lohning, C. 1991. Characterization of transacting mutations affecting Ty and Ty-mediated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 20: 441-448.

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

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

Clark, D.J., Blanchone, V.W., Haywood, L.J., Dildine, S.L., Sandmeyer, S.B. 1988. A yeast Sigma composite element, Ty3, has properties of a retrotransposon. *J. Biol. Chem.*, 263: 1413-1423.

Company, M., Errede, B. 1987. Cell type dependent gene activation by yeast transposon Ty1 involves multiple regulatory determinants. *Mol. Cell. Biol.* 8: 5299-5309.

Company, M., Errede, B. 1988. A Ty1 cell-type-specific regulatory sequence is a recognition element for a constitutive binding factor. *Mol. Cell. Biol.*, 8: 5299-5309.

Company, M., Adler, C., Errede, B. 1988. Identification of a Ty1 regulatory sequence responsive to *STE7* and *STE12*. *Mol. Cell. Biol.* 8: 2542-2554.

Conlan, R.S., Gounalaki, N., Hatzis, P., Tzamarias, D. 1999. The Tup1-Cyc8 Protein Complex Can Shift from a Transcriptional Co-repressor to a Transcriptional Co-activator. *The Journal Of Biol Chemistry*, 274: 205-210.

Conte, D.J., Curcio, J.M. 2000. Fus3 controls Ty1 transcriptional dormancy through the invasive growth MAPK pathway. *Mol. Microbiol.*, 35: 415-427.

Cullen, P.J., Sprague, G.F. Jr. 2000. Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 13619–13624.

Curcio, M. J., Hedge, A.M., Boeke, J.D., Garfinkel, D.J. 1990. Ty RNA levels determine the spectrum of retrotransposition events that activate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, 220: 213–221.

- Deckert, J., Struhl, K. 2002.** Targeted recruitment of Rpd3 histone deacetylase represses transcription by inhibiting recruitment of Swi/Snf, SAGA, and TATA binding protein, *Mol Cell Biol.*, 22: 6458-6470.
- Derisi, J.L., Iver, V.R., Brown, P.O. 1997.** Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 278: 680-686.
- DeVit, M. J., Waddle, J.A., Johnston, M. 1997.** Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol. Biol. Cell*, 8: 1603–1618.
- Devit, M.J., Johnston, M. 1999.** The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol.*, 9: 1231–1241.
- Devine, S.E., Boeke, J.D. 1996.** Integration of the yeast retrotransposon Ty1 is targeted to regions upstream of genes transcribed by RNA polymerase III. *Genes Dev.* 10: 620-633.
- De Virgilio, C., Loewith, R. 2006.** The TOR signalling network from yeast to man. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 38: 1476-1481.
- Dinman, J.D., Ruiz-Echevarria, M.J., Peltz, S.W. 1998.** Translating old drugs into new treatments: ribosomal frameshifting as a target for antiviral agents. *Trends Biotech.*, 16: 190-196.
- Dolan, J.W., Kirkman, C., Fields, S. 1989.** The yeast STE12 protein binds to the DNA sequence mediating pheromone induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5703-5707.
- Dolan, J.W., Fields, S. 1991.** Cell-type-specific transcription in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, 1088: 155-169.
- Dranginis, A.M. 1990.** Binding of yeast $\alpha 1$ and $\alpha 2$ as a heterodimer to the operator of a haploid specific gene. *Nature*, 347: 682–685.
- Durrin, L.K., Mann, R.K., Grunstein, M. 1992.** Nucleosome loss activates CUP1 and HIS3 promoters to fully induced levels in the yeast *S. cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 12: 1621-1629.
- Edmondson, D. G., Smith, M.M., Roth, S.Y. 1996.** Repression domain of the yeast global repressor TUP1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes Dev.*, 10: 1247-1259.
- Eisenmann, D.M., Arndt, K.M., Ricupero, S.L., Rooney, J.W., Winston, F. 1992.** SPT3 interacts with TFIID to allow normal transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*6: 1319-1331

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

Elder, R.T., John, St. T.P, Stinchcomb, D.T., Davis, R.W. 1981. Studies on the transposable element of yeast. I. RNA homologous to Ty1. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 45: 581-584.

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

Errede, B., Cardillo, T.S., Sherman, F., Dubois, E., Deschamps, J., Wiame, J.M. 1980. Mating signals control expression of mutations resulting from insertion of a transposable repetitive element adjacent to diverse yeast genes. *Cell*, 22: 427-436.

Errede, B., Company, M., Swanstorm, R. 1986. An anomalous Ty1 structure attributed to an error in reverse transcription. *Mol. Cell. Biol.*, 6: 1334-1338.

Errede, B., Ammerer, G. 1989. STE12, a protein involved in cell-type-specific transcription and signal transduction in yeast, is part of protein-DNA complexes. *Genes Dev.* 3: 1349-1361.

Errede, B., Gartner, A., Zhou, Z., Nasmyth, K., Ammerer, G. 1993. MAP kinase-related FUS3 from *S. cerevisiae* is activated by STE7 in vitro. *Nature*, 362(6417):261-4.

Farabaugh, P.J., Liao, X.B., Belcourt, M., Zhao, H., Kapakos, S, J., Clare, J. 1989. Enhancer and silencer like sites within the transcribed portion of a Ty2 transposable element of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 9: 4824-4834.

Farabaugh, P.J. 1995. Post-transcriptional regulation of transposition by Ty retrotransposons of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 270: 10361-10364.

Farabaugh, P.J. 1996. Programmed translational frameshifting. *Microbiol. Rev.* , 60: 103-134.

Feldmann, H. 2005. Yeast Molecular Biology: A short compendium on basic features and novel aspects, University of Munich.

Ferrando, A., Kron, S.J., Rios, G., Fink, G.R., Serrano, R. 1995. Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene *HAL3*. *Mol. Cell. Biol.*, 15: 5470-5481.

Fields, S., Herskowitz, I. 1985. The yeast *STE12* product is required for expression of two sets of cell-type specific genes. *Cell*, 42: 923-930.

Fields, S., Herskowitz, I. 1987. Regulation by the yeast mating type locus of *STE12*, a gene required for cell-typespecific expression. *Mol. Cell. Biol.*, 7: 3818-3821.

Fleming, A. B., Pennings, S. 2001. Antagonistic remodelling by Swi-Snf and Tup1-Ssn6 of an extensive chromatin region forms the background for *FLO1* gene regulation. *The EMBO Journal*, 20: 5219-5231.

Fleming, A.B., Pennings, S. 2007. Tup1-Ssn6 and Swi-Snf remodelling activities influence long-range chromatin organization upstream of the yeast *SUC2* gene. *Nucleic Acids Research*. 35: 5520-5531

Flick, K.M., Spielewoy, N., Kalashnikova, T.I., Guaderrama, M., Zhu, Q., Chang, H.C., Wittenberg, I.C. 2003. Grr1-dependent inactivation of Mth1 mediates glucose-induced dissociation of Rgt1 from *HXT* gene promoters. *Mol. Biol. Cell*. 8, 3230-3241.

Friesen, H. , Hepworth, S.R., Segall, J. 1997. An Ssn6-Tup1-dependent negative regulatory element controls sporulation-specific expression of *DIT1* and *DIT2* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol*. 17: 123-134.

Fujimori, K., Anamart, S., Nakagawa, Y., Sugioka, S. Ohta, D. et al. 1997. Isolation and characterization of mutations affecting expression of the delta9- fatty acid desaturase gene, *OLE1*, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 413: 226-230.

Gabriel, A., Boeke, J.D. 1993. Retrotransposon reverse transcription, in Skalka AM. Goff SP (eds): Reverse Transcriptase, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*: pp 275-328.

Gagiano, M., Bauer, F.F., Pretorius, I.S. 2002. The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 2: 433–470

Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eiesen, M.B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P.O. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell*. 11: 4241-4257.

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

Garcia Gimeno, M. A., Struhl, K. 2000. Aca1 and Aca2, ATF/CREB activators in *Saccharomyces cerevisiae*, are important for carbon-source utilization but not the response to stress. *Mol. Cell. Biol.* 20: 4340-4349.

Garfinkel, D. J., Boeke, D.J., Fink, G. R. 1985. Ty element transposition: reverse transcriptase and virus-like particles. *Cell*, 42: 507-517.

Garfinkel DJ, et al. 2003. Post-transcriptional cosuppression of Ty1 retrotransposition. *Genetics*, 165(1): 83-99

Gavin, I. M., Kladde, M. P., Simpson, R. T. 2000. Tup1p represses Mcm1p transcriptional activation and chromatin remodeling of an a-cell-specific gene. *EMBO J.*, 19: 5875-5883.

Gavrias, V., Andrianopoulos, A., Gimeno, C.J., Timberlake, W.E. 1996. *Saccharomyces cerevisiae* TEC1 is required for pseudohyphal growth. *Mol. Microbiol.* 19: 1255-1263.

Goutte, C., Johnson, A. D. 1988. Gal protein alters the DNA binding specificity of a2 repressor. *Cell* 52: 875-882.

Grant, P.A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S.M., Brownell, J.E., Candan, R., Ohba, R., Owen-Huges, T., Allis, C.D., Winston, F., Berger, S.L., Workman, J.L. 1997. Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/ Ada) complex. *Genes Dev.* 11: 1640-1650.

Gray, W.M., Fassler, J.S. 1993. Role of *Saccharomyces cerevisiae* Rap1 protein in Ty1 and Ty1-mediated transcription. *Gene Expr.* 3: 237-251.

Gray, W.M., Fassler, J.S. 1996. Isolation and analysis of the yeast *teal* gene, which encodes a zinc cluster Ty enhancer-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 16: 347-358.

Gromoller, A., Lehming, N. 2000. Srb7p is a physical and physiological target of Tup1p. *EMBO J.*, 19: 6845-6852.

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

Han, S.J., Lee, J.S., Kang, J.S., Kim, Y.J. 2001. Med9/Cse2 and Gal11 modules are required for transcriptional repression of distinct group of genes. *J. Biol. Chem.* 276: 37020-37026.

- Hanlon, S.E., Rizzo, J.M., Deirdre, C.T., Lieb, J.D., Buck, M.J. 2011.** The Stress Response Factors Yap6, Cin5, Phd1, and Skn7 Direct Targeting of the Conserved Co-Repressor Tup1-Ssn6 in *S.cerevisiae*. *PLoS One*, 6(4): e19060
- Hansen, L., Chalker, D., Sandmeyer, S. 1988.** Ty3, a retrotransposon associated with tRNA genes, has homology to animal retroviruses. *Mol. Cell. Biol.* 8: 5245-5256.
- Happel, A.M., Swanson, M.S., Winston, F. 1991.** The SNF2, SNF5 and SNF6 genes are required for Ty transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 128: 69-77.
- Herskowitz, I. 1986.** Specialized cell types in yeast: their use in addressing problems in cell biology, p. 625-656. In J. Hicks (ed.), *Yeast cell biology*. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Herskowitz, I. 1989.** A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast. *Nature* London, 342: 749-757.
- Hinnebusch, A.G., Natarajan, K. 2002.** Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryot. Cell*, 1: 22-32.
- Hohmann, S. 1997.** Shaping up: the response of yeast to osmotic stress. In Hohmann, S. and Mager, W. H. (eds), *Yeast Stress Responses*. R. G. Landes Co., Austin, TX, pp: 101-134.
- Honigberg, S.M., Lee, R.H. 1998.** Snf1 kinase connects nutritional pathways controlling meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 18: 4548-4555.
- Huang, L., Zhang, W., Roth, S. 1997.** Amino Termini of Histones H3 and H4 Are Required for $\alpha 1$ - $\alpha 2$ Repression in Yeast. *Mol. Cell. Biol.*, 17: 6555-6562.
- Hwang Shum, J.J., Hagen, D.C., Jarvis, E.E., Westby, C.A., Spuerag, G.F. Jr. 1991.** Relative contributions of *MCM1* and *STE12* to transcriptional activation of α and α specific genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, 227: 197-204.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A. 1983.** Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, 153: 163-168.
- Jacks, T., Power, M.D., Masiarz, F.R., Luciw, P.A., Barr, P.J., Varmus, H.E. 1988.** Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature*, 331(6153): 280-283.
- Janetzky, B., Lehle, L. 1992.** Ty4, a new retrotransposon from *Saccharomyces cerevisiae*, flanked by tau-elements. *J. Biol. Chem.* 267: 19798-19805.

Jensen, R., Sprague, Jr. G.F., Herskowitz, I. 1983. Regulation of yeast mating-type interconversion: feedback control of HO gene expression by the mating-type locus. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 80: 3035-3039.

Jerome J.F., Jaehning J.A. 1986. mRNA transcription in nuclei isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 6(5): 1633-9

Ji, H., Moore, D.P., Blomberg, M.A., Braiterman, L.T., Voytas, D.F., Natsoulis, G., Boeke, J.D. 1993. Hotspots for unselected Ty1 transposition events on yeast chromosome III are near tRNA genes and LTR sequences. *Cell*, 73: 1007-1018.

Jiang, R., Carlson, M. 1996. Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev.*, 10: 3105–3115.

Johnson, A.D. 1995. Molecular mechanisms of cell-type determination in budding yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 5, 552-558.

Johnson, A. D., Herskowitz, I. 1985. A repressor (AL4Ta2 product) and its operator control expression of a set of cell type specific genes in yeast. *Cell*, 42: 237-247.

Johnson, M. 2014. Protein quantitation. <http://www.labome.com/method/Protein-Quantitation.html> (Erişim tarihi: 12.06.2014)

Kapitanov, V.V., Jurka, J. 2003. Molecular paleontology of transposable elements in the *Drasophila melanogaster* genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6569-6574.

Keleher, C.A., Goutte, C., Johnson, A.D. 1988. The yeast cell-typespecific repressor alpha 2 acts cooperatively with a non-cell-type-specific protein. *Cell*, 53: 927–936.

Keleher, C.A., Redd, J.J., Schultz, J., Carlson, M., Johnson, A.D. 1992. Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell*, 68: 709-719.

Kent, N.A., Karabetsov, N., Polifis, P.K., Mellor, J. 2001. In vivo chromatin remodeling by yeast ISWI homologs Isw1p and Isw2. *Genes Dev.*, 15: 619-626.

Ketela, T., Brown, J.L. Stewart, R.C., Bussey, H. 1998. Yeast Skn7p activity is modulated by the Sln1p-Ypd1p osmosensor and contributes to regulation of the HOG pathway. *Mol. Gen. Genet.*, 259: 372-378.

Kim, J.M., Vanguri, S., Boeke, J.D., Gabriel, A., Voytas, D.F. 1998. Transposable elements and genome organization: A comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *Genome Res.*, 8: 464-478.

Kim, J.H., Brachet, V., Moriya, H., Johnston, M. 2006. Integration of transcriptional and posttranslational regulation in a glucose signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 5, 167-173.

- Kim, J.H., Johnston, M. 2006.** Two glucose-sensing pathways converge on Rgt1 to regulate expression of glucose transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 281: 26144-26149.
- Kingsman, A.J., Gimlich, R.L., Clarke, L., Chinault, A.C., Carbon, J. 1981.** Sequence variation in dispersed repetitive sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology*, 145: 619-632.
- Klar, A.J.S., Strathern, J.N., Broach, J.R., Hicks, J.R. 1981.** Regulation of transcription in expressed and unexpressed mating type cassettes of yeast. *Nature*, London, 289: 239-244.
- Komachi, K., Redd, J., Johnson, A.D. 1994.** The WD repeats of Tup1 interact with the homeo domain protein alpha 2. *Genes Dev.*, 8: 2857-2867.
- Koranda, M., Schleiffer, A., Endler, L., Ammerer, G. 2000.** Forkhead-like transcription factors recruit Ndd1 to the chromatin of G₂/M-specific promoters. *Nature*, 406: 94-98.
- Krems, B., Charizanis, C., Entian, N., K.D. 1996.** The response regulator -like protein Pos9/Skn7 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in oxidative stress resistance. *Curr. Genet.*, 29: 327-334.
- Kuchin, S. Yeghiayan, P., Carlson, M. 1995.** Cyclin-dependent protein kinase and cyclin homologs SSN3 and SSN8 contribute to transcriptional control in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 92: 4006-4010.
- Kuchin, S., Carlson, M. 1998.** Functional relationships of Srb10-Srb11 kinase, carboxy-terminal domain kinase CTDK-1, and transcriptional corepressor Ssn6-Tup1. *Mol. Cell. Biol.*, 18: 1163-1171.
- Kuchin, S., Vyas, V.K., Carlson, M. 2002.** Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate *FLO11*, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, 22: 3994-4000.
- Kumar, R.D.M., Reynolds, A. Shevchenko, A., Shevchenko, S., Goldstone, D., Dalton, S. 2000.** Forkhead transcription factors, Fkh1p and Fkh2p, collaborate with Mcm1p to control transcription required for M-phase. *Curr. Biol.*, 10: 896-906.
- Kurjan, J. 1992.** Pheromone Response in yeast. *Ann. Rev. Biochem.*, 61: 1097-1129.
- Laloux, I., Dubois, E., Dewerchin, M., Jacobs, E. 1990.** TEC1, a gene involved in the activation of Ty1 and Ty1- mediated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and molecular analysis. *Mol. Cell. Biol.* 10:3541-3550.
- Lander, E.S. et al. 2001.** Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822): 860-921.

- Laprade, L. Rose, D. Winston, F. 2007.** Characterization of new Spt3 and TATA-binding protein mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: Spt3 TBP allele-specific interactions and bypass of Spt8. *Genetics*, 177: 2007-2017.
- Li, S., Ault, A., Malone, C.L., Raitt, D., Dean, S., Johnston, L.H., Deschenes, R.J., Fassler, J.S. 1998.** The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *EMBO J.* 17: 6952-6962.
- Liu, H., Styles, C.A., Fink, G.R. 1993.** Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science*, 262: 1741-1744.
- Lowry, O.H., Rosenbrogh, N.J., Farr, A.L., Randal, R.J. 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Madhani, H.D., Fink, G.R. 1997.** Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science*, 275: 1314-1317.
- Madison, J. M., Dudley, A.M., Winston, F. 1998.** Identification and analysis of Mot3, a zinc finger protein that binds to the retrotransposon Ty long terminal repeat (δ) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 18: 1879-1890.
- Maede, T., Wurgler-Murphy, S., Saito, H. 1994.** A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 369:242-245.
- Marchler, G. Schüller, C. Adam, G., Ruis, H. 1993.** A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* 12: 1997-2003.
- Marquez, J.A. ,Pascual-Ahuir, A. Porft, M., Serrano, R. 1998.** The Ssn6-Tup1 repressor complex of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in the osmotic induction of HOG-dependent and independent genes. *EMBO J.*, 17: 2543-2553.
- Martens, J.A., Winston, F. 2002.** Evidence that Swi/Snf directly represses transcription in *S. cerevisiae*. *Cold Spring Harbor Lab. Press. Genes and Development*, 16: 2231-2236.
- Martinez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A. Ruis, H., Estruch, F. 1996.** The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.*, 15: 2227-2235.
- Mccartney, R.R., Schmidt, M.C. 2001.** Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J. Biol. Chem.*, 276: 36460–36466.
- Mcclanahan, T., Mcentee, K. 1984.** Specific transcripts are elevated in *Saccharomyces cerevisiae* in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.*, 4: 2356-2363.

- Mcclintock, B. 1951.** Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harbor. Quant. Biol.*, 16: 13-47.
- Mcclintock, B. 1956.** Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor. Quant. Biol.*, 21,197-216.
- Mcinerney, C.J., Partridge, J.F., Mikesell, G.E., Creemer, D.P., Breeden, L.L. 1997.** A novel Mcm1-dependent element in the SWI4, CLN3, CDC6, and CDC47 promoters activates M/G1-specific transcription. *Genes Dev.*, 11:1277-1288.
- Melamed, D. Pnueli, L., Arava, Y. 2008.** Yeast translational response to high salinity: Global analysis reveals regulation at multiple levels. *RNA*, 14: 1337-1351.
- Mizuno, T., Nakazawa, P. Remgsamrarn, P., Kunoh, T., Oshima, Y. et al. 1998.** The Tup1-Ssn6 general repressor is involved in repression of IME1 encoding a transcriptional activator of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 33: 239-247.
- Morgan, B.A., Bouquin, N., Merrill, G.F., Johnston, L.H. 1995.** A yeast transcription factor bypassing the requirement for SBF and DSCI/MBF in budding yeast has homology to bacterial signal transduction proteins. *EMBO J.*, 14: 5679-5689.
- Morgan, B. A., Banks, G.R., Toone, W.M., Raitt, D., Kuge, S., Johnston, L.H. 1997.** The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 16: 1035-1044.
- Morillon, A., Springer, M., Lesage, P. 2000.** Activation of the Kss1 invasive-filamentous growth pathway induces Ty1 transcription and retrotransposition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 20: 5766-5776.
- Morillon, A., Benard, L., Springer, M., Lesage, P. 2002.** Differential effect of chromatin and Gcn4 on the 50-fold range of expression among individual Yeast Ty1 retrotransposons. *Mol. Cell. Biol.*, 22: 2078-2088.
- Moriy, H., Johnston, M. 2004.** Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 1572-1577.
- Mösch, H.U., Fink, G.R. 1997.** Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 145: 671-684.
- Mösch, H.U., Kübler, E., Krappmann, S., Fink, G.R., Braus, G.H. 1999.** Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 10: 1325-1335.
- Mueller, C.G.F., Nordheim, A. 1991.** A protein domain conserved between yeast MCM1 and human SRF directs ternary complex formation. *EMBO J.* 10: 4219-4229.

Mukai, Y., Harashima, S., Oshima, Y. 1991. AAR1/TUP1 protein, with a structure similar to that of the beta subunit of G proteins, is required for a1-aplha2 and aplha2 repression in cell type control of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11: 3773-3779.

Nadal-Ribelles, M., Conde, N., Flores, O., Gonzalez-Vallinas, J., Eyraes, E. Orozco, M., De Nadal, E. , Posas, F. 2012. Hog1 bypasses stress-mediated down-regulation of transcription by RNA polymerase II redistribution and chromatin remodeling. *Genome Biology*, 13: R106.

Nasmyth, K.A., Tatchell, K., Hall, B.D., Astell, C., Smith, M. 1981. A position effect in the control of transcription at yeast mating type loci. *Nature*, London, 289: 244-250.

Nasmyth, K., Shore, D. 1987. Transcriptional regulation in the yeast life cycle. *Science* 237: 1162-1170.

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

Nonet, M., Sweetser, D., Young, R.A. 1987. Functional redundancy and structural polymorphism in the large subunit of RNA polymerase II. *Cell*, 50: 909-915.

Ostling, J., Ronne, H. 1998. Negative control of the Mig1p repressor by Snf1p-dependent phosphorylation in the absence of glucose. *Eur J Biochem*, 252:162–168.

O’rourke, S. M., Herskowitz, I. 2004. Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis. *Mol. Biol. Cell.* 15: 532-542.

Özcan, S., Johnston, M. 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., Leong, T., Johnston, M. 1996. Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription. *Mol. Cell Biol.*, 16: 6419-6426.

Özcan, S., Dover, J., Johnston, M. 1998. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 17: 2566-2573.

Özcan, S., Johnston, M. 1999. Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63: 554-569.

Papamichos-Chronakis, M., Conlan, R.S., Gounalaki, N., Copf, T., Tzamarias, D. 2000. Hrs1/Med3: a Cyc8-Tup1 corepressor target in the RNA polymerase II holoenzyme. *J. Biol. Chem.*, 275: 8397-8403.

Pascuala-Ahuir, A., Posas, F., Serrano, R., Proft, M. 2001. Multiple levels of control regulate the yeast cAMP-response-element-binding protein repressor Sko1p in response to stress. *J. Biol. Chem.*, 276: 37373-37378.

Peterson, P.A. 1970. Controlling elements and mutable loci in maize: their relationship to bacterial episomes. *Genetics*, 41-33.

Peterson, C.L., Laniel, M.A. 2004. Histones and histone modifications. *Curr. Biol.* 14(14): R546-R551. doi:10.1016/j.cub.2004.07.007. PMID:15268870.

Pic, A., Lim, F.L., Ross, S.J., Johnson, A.L., Sultan, R.A., West, A.G., Johnson, L.H., Sharrocks, A.D., Morgan, B.A. 2000. The forkhead protein Fkh2 is a component of the yeast cell cycle transcription factor SFF. *EMBO J.* 19: 3750-3761.

Pokholok, D.K., Zeitlinger, J., Hannett, N.M., Reynolds, D.B., Young, R.A. 2006. Activated signal transduction kinases frequently occupy target genes. *Science*, 313: 533-536.

Polish, J.A., Kim, J.H., Johnston, M. 2005. How the Rgt1 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by glucose. *Genetics*, 169: 583-594.

Pollard, K.J., Peterson, C.L. 1997. Role for ADA/GCN5 products in antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression. *Mol. Cell Biol.*, 17: 6212-6222.

Posas, F., Wurgler-Murphy, M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T. C., Saito, H. 1996. Yeast Hog1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the Sln1-Ypd1-Ssk1 "two component" osmosensor. *Cell*, 86: 865-875.

Posas, F., Saito, H. 1998. Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J.*, 17: 1385-1394.

Primig, M., Winkler, H., Ammerer, G. 1991. The DNA binding and oligomerization domain of MCM1 is sufficient for its interaction with other regulatory proteins. *EMBO J.* 10: 4209-4218.

Proft, M., Serrano, R. 1999. Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulation *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol. Cell. Biol.* 19: 537-546.

Proft, M., Pascual-Ahuir, A., de Nadal, E., Arino, J., Serrano, R., Posas, F. 2001. Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J.* 20: 1123-1133.

Proft, M., Mas, G., de Nadal, E., Vendrell, A., Noriega, N., Struhl, K., Posas, F. 2006. The stress-activated Hog1 kinase is a selective transcriptional elongation factor for genes responding to osmotic shock. *J. Biol. Chem.* 275: 8290-8300.

Proft, M., Struhl, K. 2002. Hog1 Kinase the Sko1-Cyc8-Tup1 Repressor Complex into an Activator that Recruits SAGA and SWI/SNF in Response to Osmotic Stress. *Molecular Cell*, 9: 1307-1317.

Redd, M. J., Arnaud, M.B., Johnson, A.D. 1997. A complex composed of Tup1 and Ssn6 represses transcription *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 272: 11193-11197.

Rep, M., Reiser, V., Gartner, U., Thevelein, J.M., Hohmann, S., Ammerer, G., Ruis, H. 1999. Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 5474-5485.

Roberts, R. L., Fink, G. R. 1994. Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev.*, 8: 2974-2985.

Roeder, G.S., Farabaugh, P.J., Chaleff, D.T., Fink, G.R. 1980. The origins of gene instability in yeast. *Science*, 209: 1375-1380.

Rolfe, M., Spanos, A., Banks, G. 1986. Induction of yeast Ty element transcription by ultraviolet. *Nature*, 319: 339-340.

Rolland, F., Winderickx, J., Thevelein, J. M. 2002. Glucose-sensing and signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res*, 2: 183-201.

Rose, M.D., Winston, F., Hieter, P. 1990. Methods in Yeast Genetics. A laboratory Course Manual. *Cold Spring Harbor Lab. Press.*, New York. USA. p: 119-195.

Roth, J. F. 2000. The yeast Ty virus-like particles. *Yeast*, 16: 785-795.

Rothstein, R.J., Sherman, F. 1980. Dependence on matingtype for the overproduction of iso-2-cytochrome c in the yeastmutant CYC7-H2. *Genetics*, 94: 891-898.

Sacerdot, C., Mercier, G., Todeschini, A., Dutreix, M., Springer, M., Lesage, P. 2005. Impact of ionizing radiation on the life cycle of *Saccharomyces cerevisiae* Ty1 retrotransposon. *Yeast*, 22: 441-455.

***Saccharomyces* Genome Database (SGD). 2014.** www.yeastgenome.org

Sanmiguel, P., Tikhonov, A., Jin, Y.K. 1996. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science*, 274: 765-768.

Santangelo, G.M. 2006. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70(1):253-82

Scherer, S., Davis, R.W. 1980. Recombination of dispersed repeated DNA sequences in yeast. *Science*, 209: 1380-1384.

Schmitt, A.P., Mcentee, K. 1996. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 93: 5777-5782.

Schneper, L., Düvel, K., Broach, J.R. 2004. Sense and sensibility: nutritional response and signal integration in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.*, 7: 624-630.

Shukla, A., Bajwa, P., Bhaumik, S.R. 2006. SAGA-associated Sgf73p facilitates formation of the preinitiation complex assembly at the promoters either in a HAT-dependent or independent manner in vivo, *Nucleic Acids Res.* 34: 6225-6232.

Serrano, R., Marquez, J.A., Rios, G. 1997. Crucial factors in salt stress tolerance. In Hohmann, S. and Mager, W. H. (eds), *Yeast Stress Responses*. R. G. Landes Co. , Austin, TX, pp: 147-169.

Servant, G., Pinson, B., Tchalikian-Cosson, A., Couplier, F., Lemoine, S., Pannetier, C., Bridier-Nahmias, A., Todeschini, A.L., Fayol, H., Daignan-Fornier, B., Lesage, P. 2012. Tye7 regulates yeast Ty1 retrotransposon sense and antisense transcription in response to adenylic nucleotides stress. *Nucleic Acid Research*, 40: 5271-5282.

Shukla, A., Bajwa, P., Bhaumik, S.R. 2006. SAGA-associated Sgf73p facilitates formation of the preinitiation complex assembly at the promoters either in a HAT-dependent or independent manner in vivo, *Nucleic Acids Res.*, 34: 6225-6232.

Smith, R.L., Johnson, A.D. 2000. A sequence resembling a peroxisomal targeting sequence directs the interaction between the tetratricopeptide repeats of Ssn6 and the homeodomain of alpha 2. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 97: 3901-3906

- Smith, F.C., Davies, S.P., Wilson, W.A., Carling, D., Hardie, D.G. 1999.** The SNF1 kinase complex from *Saccharomyces cerevisiae* phosphorylates the transcriptional repressor protein Mig1p in vitro at four sites within or near regulatory domain 1. *FEBS Lett*, 453: 219–223.
- Smith, D. L., Desai, A. B., Johnson, A.D. 1995.** DNA bending by the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ homeodomain proteins from yeast. *Nucleic Acids Res.*, 23: 1239–1243.
- Song, O.-K., Dolan, J.W., Yuan, Y.O., Fields, S. 1991.** Pheromone-dependent phosphorylation of the yeast STE12 protein correlates with transcriptional activation. *Genes Dev.*, 5: 741-750.
- Song, W., Treich, I., Qian, N., Kuchin, S., Carlson, M. 1996.** SSN genes that affect transcriptional repression in *Saccharomyces cerevisiae* encode SIN4, ROX3, and SRB proteins associated with RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.*, 16: 115-120.
- Spielewoy, N., Flick, K., Kalashnikova, T.I., Walker, J.R., Wittenberg, C. 2004.** Regulation and recognition of SCFGrr1 targets in the glucose and amino acid signaling pathways. *Mol. Cell Biol.*, 24: 8994-9005.
- Sprague, Jr., G.F. 1990.** Combinatorial associations of regulatory proteins and the control of cell type in yeast. *Adv. Genet*, 27: 33-62.
- Staleva, L.S., Venkov, P. 2001.** Activation of Ty transposition by mutagens. *Mutat. Res.*, 474: 93-103.
- Sterner, D.E., Grant, P.A., Roberts, S.M., Duggan, L.J., Belotserkovskaya, R. L., Pacella, A., Winston, F., Workman, J.L., Berger, S.L. 1999.** Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA-binding protein to promoters in vivo, *Mol. Cell. Biol.*, 19: 86-98.
- Sutton, P.R., Liebman, S.W. 1992.** Rearrangements occurring adjacent to a single Ty1 yeast retrotransposon in the presence and absence of full-length Ty1 transcription. *Genetics*, 131: 833-850.
- Taguchi, A.K.W., Ciriacy, M., Young, E.T. 1984.** Carbon source dependence of transposable element-associated gene activation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 4: 61-68.
- Tedin, K., Witte, A. 1995.** Evaluation of the E. coli ribosomal rrnB P1 promoter and phage-derived lysis genes for the use in a biological containment system: A concept study. *Journal of Biotechnology*, 39(2): 137-148.
- Teunissen, A.W., Van Den Berg, J.A., Steensma, H.Y. 1995.** Transcriptional regulation of flocculation genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11: 435-446.

Todeschini, A. –L., Morillon, A. Springer, M., Lesage, P. 2005. Severe adenine starvation activates Ty1 transcription and retrotransposition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 25: 7459-7472.

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

Treitel, M. A., Kuchin, S., Carlson, M. 1998. Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol* 18: 6273–6280.

Trumbly, R. J. 1986. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* mutants constitutive for invertase synthesis. *J. Bacteriol.*, 166: 1123-1127.

Trumbly, R. J. 1992. Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 6: 15-21.

Türkel, S., Liao, X.B., Farabaugh, P.J. 1997. *GCR1*-dependent transcriptional activation of yeast retrotransposon Ty2-917. *Yeast*, 13: 917-930.

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

Turner, B.M. 2005. Reading signals on the nucleosome with a new Nomenclature for modified histones. *Nat. Struct. Mol. Biol.*12(2): 110-112. doi: 10. 1038/nsmb0205-110. PMID: 1570-2071.

Tzamarias, D., Struhl, K. 1995. Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex. *Nature*, London, 369: 758-761.

Tzamarias, D., Struhl, K. 1995. Distinct TPR motifs of Cyc8 are involved in recruiting the Cyc8-Tup1 corepressor complex to differentially regulated promoters. *Genes Dev.*, 9: 821-831.

Uemura, H., Jigami, Y. 1992. Role of GCR2 in transcriptional activation of yeast glycolytic genes. *Mol Cell Biol*, 12(9):3834-42

Varanasi, U.S., Klis, M., Mikesell, P.B., Trumbly, R.J. 1996. The Cyc8 (Ssn6)-Tup1 corepressor complex is composed of one Cyc8 and four Tup1 subunits. *Mol. Cell. Biol.*, 16: 6707-6714.

Voytas, D. F., Boeke, J.D. 1992. Yeast retrotransposon revealed. *Nature*, 358:717

Voytas, D.F., Boeke, J. D. 1993. Yeast retrotransposons and tRNA. *Trends Genet.*, 9: 421-427.

Wahi, M., Johnson, A. D. 1995. Identification of genes required for a2 repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 140: 79-90.

Wang, Y., Pierce, M., Schneper, L., Guldal, C.G., Zhang, X. 2004. Ras and Gpa2 mediate one branch of a redundant glucose signaling pathway in yeast. *PLoS Biol*, 2: E 128.

Watson, A. D., Edmondson, D.G. Bone, J.R. Mukai, Y., Yu, Y., Du, W. Stillman, D.J. Roth, S.Y. 2000. Ssn6-Tup1 interacts with class I histone deacetylases required for repression. *Genes Dev.*, 14: 2737-2744.

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

Wilson, W.A., Hawley, S.A., Hardie, D.G. 1996. Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr. Biol.*, 6: 1426–1434.

Winston, F. 1992. Analysis of SPT genes; A genetic approach toward analysis TFIID, histones, and other transcription factors of yeast in *Transcriptional Regulation* (McKnight, S. L. and Yamamoto, K. R. eds.) *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp: 1271-1293.

Winston, F., Carlson, M. 1992. Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends Genet.*, 8: 387-391.

Woods, A., Munday, M.R., Scott, J., Yang, X., Carlson, M., Carling, D. 1994. Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo. *J. Biol. Chem.*, 269: 19509–19516.

Wu, J., Suka, N., Carlson, M., Grunstein, M. 2001. Tup1 utilizes histone H3/H2B-Specific HDA1 deacetylase to repress gene activity in yeast. *Molecular Cell*, 7: 117-126.

Yu, G., Fassler, J.S. 1993. SPT13 (*GAL11*) of *Saccharomyces cerevisiae* negatively regulates activity of the MCM1 transcription factor in Ty1 elements. *Mol. Cell. Biol.*, 13: 63-71.

Zaman, Z., Ansari, A. Z., Koh, S.S., Young, R.A., Ptashne, M. 2001. Interaction of a transcriptional repressor with the RNA polymerase II holoenzyme plays a crucial role in repression. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 98: 2550-2554.

Zhang, M., Rosenblum-Vos, L.S., Lowry, C.V., Boakye, K.A., Zitomer, R.S. 1991. A yeast protein with homology to the beta-subunit of Gproteins is involved control of heme-regulated and catabolite-repressed genes. *Gene*, 97: 153-161.

Zhizhou, Z., Varanasi, U., Trumbly, R.J. 2002. Functional dissection of the global repressor Tup1 in yeast: dominant role of the c-terminal repression domain. *Genetics*, 161(3): 957-969.

Zhou, Z., Elledge, S.J. 1992. Isolation of crt mutants constitutive for transcription of the DNA damage inducible gene RNR3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 131:851-866.

Zhu, G., Spellman, P.T., Volpe, T., Brown, P.O., Botstein, D., Davis, T. N., Futcher, B. 2000. Two yeast forkhead genes regulate the cell cycle and pseudohyphal growth. *Nature*, 406: 90-94.

Zitomer, R.S., Lowry, C.V. 1992. Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.*, 56: 1-11.

Zhu, Y., Dai, J., Fuerst, P.G., Voytas, D.F. 2003. Controlling integration specificity of a yeast retrotransposon. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 100: 5891-5895.

EKLER

Ek 1: Araştırmada Kullanılan Üreme Ortamları ve Çözeltilerin Hazırlanması

1: LB (Luria-Broth) Üreme Ortamı

10 gr Bacto tripton

5 gr Yeast Extract

10 gr NaCl

Toplam hacim 1 litre olacak şekilde saf suda çözüldü ve otoklavda 121°C’de 20 dakika steril edildi. LB petrileri için bu besiyeri 15gr/litre olacak şekilde agar-agar eklendi. LB-Ampicillin besiyeri hazırlamak için filtre sterilizasyonu ile hazırlanmış Ampicillinden 100 mg/litre olacak şekilde otoklavlanmış ampicillin ilave edildi.

2: YP (Yeast Extract, Peptone)

20 gr/litre Bacto pepton

10 gr/litre Yeast Extract

Olacak şekilde saf suda çözüldü ve otoklavda steril edildi. Petri hazırlamak için ortama 20 gr/litre olacak şekilde agar-agar ilave edildi.

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

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

4- β-galaktozidaz ölçüm tamponu (Z-Buffer)

60 mM Na₂HPO₄. 7 H₂O

40 mM NaH₂PO₄. H₂O

10 mM KCl

1 mM MgSO₄. 7H₂O

50 mM β -Merkepto etanol.

β -Galaktozidaz reaksiyonları için tampon çözelti olarak kullanıldı.

5- ONPG (O-Nitro phenyl β -D- Galactoside)

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

6- β -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)

S. cerevisiae hücrelerini süspanse etmek için kullanıldı.

7- 1M Sodyum karbonat

106 gram Na_2CO_3 toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü. Deneyler süresince oda sıcaklığında saklandı.

8- 0.1 M Lityum asetat

Lityum asetat 0.2 M stok olarak hazırlandı. 121 C'de 25 dakika otoklavda steril edildi.

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

50 gr PEG (4000) toplam hacim 100 ml olacak şekilde hazırlandı. 121 C'de 25 dakika otoklavda steril edildi.

10- 1x TE, pH:7.4

10 mM Tris.HCl, pH: 7.6

1 mM EDTA, pH: 8.0.

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

11- Lowry C- çözeltilisinin hazırlanması.

Lowry A çözeltilisi: %2 Na₂CO₃, 0.1 N NaOH.

Lowry B1 çözeltilisi: %1 CuSO₄.

Lowry B2 çözeltilisi: %2 Sodyum potasyum tartarat.

Lowry C çözeltilisi: 49 ml Lowry A,

0,5 ml Lowry B1,

0,5 ml Lowry B2 kullanılarak taze hazırlandı.

EK 2: β -Galaktozidaz Aktivitesinin Hesaplanması

β -Galaktozidaz aktiviteleri aşağıdaki eşitliğe göre hesap edildi.

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

Bu eşitlikte;

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

OD_{420} : β -galaktozidaz reaksiyonunda oluşan sarı rengin 420 nm'deki absorbansı

V: β -Galaktozidaz ölümünde kullanılan hücre lizatı hacmi (ml olarak verilmelidir).

t: β -galaktozidaz reaksiyon süresi (Dakika cinsinden verilmelidir)

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

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Elif Arik
Doğum Yeri ve Tarihi : 28.02.1981-Bursa
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Bursa Yabancı Dil Ağırlıklı Çelebi Mehmet Lisesi 1999

Lisans : Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı,
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl :

İletişim (e-posta) : arikelif@gmail.com

Yayımları :

Makaleler

Türkel, S., Arik, E. 2007. Glucose Signaling Regulates the Gene Expression in Retrotransposon Ty2-917 of *S. cerevisiae*, *Virus Genes*, 35: 713-717.

Türkel, S., Arik E., Guzelvardar, S. 2008. Impact of Hyperosmotic Stress and Nitrogen Starvation on the Growth and the β -galactosidase Biosynthesis in *Kluyveromyces lactis* and *Kluyveromyces marxianus*, *Turk J. Biol.*, 32: 175-180.

Türkel, S., Bayram, Ö., Arik, E. 2009. Glucose Signaling Pathway and the Growth Conditions Regulates the Gene Expression in the Retrotransposon Ty2. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 2009: 64(7-8):526-32.

Türkel, S., Arik, E. 2010. The Effects of Pho85 Signaling Pathway on the Invertase Biosynthesis and Glucose Uptake in *Saccharomyces cerevisiae*, *Turk J Biol.*, 34: 103-108

Basılı bildiriler

Arik, E., Türkel, S. 2008. Glucose and Nitrogen signaling controls the transcription of retrotransposon Ty2-917 in *Sacharomyces cerevisiae*. *International Congress on the Transposable Elements*. Saint Malo-France.

Turkel, S., Arik, E. 2008. Frameshift efficiency is regulated by nutrient signaling in Ty elements of *S. cerevisiae*. *International Congress on the Transposable Elements*, Saint Malo-France.

Turkel, S., Arik, E., Kayakent, N., Guzelvardar, S. 2007. Isolation of the yeast *Kluyveromyces lactis* and determination of Invertase and Lactase activities. *15. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Antalya-Türkiye.

Turkel, S., Arik, E. 2007. The effects of *Pho 85* and *Pcl 6* complex in *S. cerevisiae* to the transcription of *SUC2* gene. *15. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Antalya-Türkiye.

Türkel, S., Güzelvardar, S., Arik, E. 2006. The effect of chromatin factors on the transcriptions of *HXT2* and *HXT4* genes in *S. cerevisiae*. *18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*. Kuşadası-Türkiye.

Türkel, S., Arik, E., Güzelvardar S. 2006. Effects of growth rate of *S. cerevisiae* on the Transcription and the Frame Shifts in Retrotransposon Ty2. *18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Kuşadası-Türkiye.