

**KALSİYUM SİNYAL İLETİM YOLAĞININ
GLUKOZ METABOLİZMASINDA YER ALAN BAZI
GENLERİN TRANSKRİPSİYONUNA VE HÜCRE
DÖNGÜSÜNÜN KONTROLÜNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Osman Alp ÖZTOP



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

**KALSİYUM SİNYAL İLETİM YOLAĞININ GLUKOZ
METABOLİZMASINDA YER ALAN BAZI GENLERİN
TRANSKRİPSİYONUNA VE HÜCRE DÖNGÜSÜNÜN KONTROLÜNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Osman Alp ÖZTOP
0000-0003-1245-1872**

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

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**BURSA-2020
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ ONAYI

Osman Alp ÖZTOP tarafından hazırlanan “Kalsiyum Sinyal İletim Yolağının Glukoz Metabolizmasında Yer Alan Bazı Genlerin Transkripsiyonuna ve Hücre Döngüsünün Kontrolüne Etkilerinin İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/~~oy çokluğu~~ ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Sezai Türkel

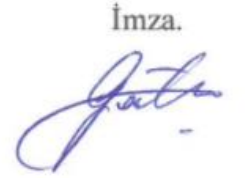
Başkan: Prof. Dr. Sezai TÜRKEK
0000-0001-7128-6948
B.U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza.


Üye: Dr. Öğr. Üyesi Burcu Erbaykent TEPEDELEN
0000-0002-9565-6349
B.U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza.


Üye: Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER
0000-0002-0290-1166
Bursa Teknik Üniversitesi,
Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi,
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

İmza.


Yukarıdaki sonucu onaylarım.


Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN Y.
Enstitü Müdürü

13/ 08 / 2020

Bilimsel Etik Bildirim Sayfası

B.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 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.

13/ 08 / 2020

Osman Alp ÖZTOP

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KALSIYUM SİNYAL İLETİM YOLAĞININ GLUKOZ METABOLİZMASINDA YER ALAN BAZI GENLERİN TRANSKRİPSİYONUNA VE HÜCRE DÖNGÜSÜNÜN KONTROLÜNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Osman Alp ÖZTOP

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sezai TÜRKEK

Kalsiyum önemli bir biyometal iyonu olup hücrelerde birçok metabolik olayın kontrol edilmesinde sinyal yollarının aktivatörü olarak işlev görür. Kalsiyumun hücresel etkileri Kalsiyum-kalmodülin yolağı ile gerçekleşir. Crz1 Kalsiyum sinyaline yanıt olarak çok sayıda genin aktivasyonunu sağlayan transkripsiyon faktörüdür. Glukoz *S. cerevisiae*'da hücre içine *HXT* genleri tarafından kodlanan afiniteleri ve fizyolojik işlevleri farklı Hexose Transporter Proteinleri (Hxt) tarafından kolaylaştırılmış difüzyonla hücre içine alınır. *HXT* genlerinin ekspresyonları hücre dışı glukoz konsantrasyonu gibi farklı metabolik ve çevresel sinyallere göre kontrol edilir. Bu çalışmada kalsiyum sinyalinin hücreye glukoz transportu için gerekli olan *HXT2*, *HXT4* ve trehaloz biyosententezinde işlevi olan *TPS1* genleri transkripsiyonuna etkileri incelendi. Elde edilen sonuçlar kalsiyum sinyalinin *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1* genleri transkripsiyonunu glukoz baskılamasının olduğu koşullarda aktive ettiğini gösterdi. Derepres koşullarda kalsiyum sinyalinin bu genlerde transkripsiyona önemli bir etkisinin olmadığı bulundu. Kalsiyuma bağlı olarak *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1* genleri transkripsiyonlarının aktivasyonunda protein kinazlar olan Hog1p ve Snf1p'nin kısmen işlevleri olduğu bulundu. Kalsiyumun üreme hızı ve hücre döngüsüne etkileri de incelendi. Kalsiyumun Snf1 kinaz aracılığı ile hücre döngüsünde G1-S aşamasına etki ettiği görüldü. Snf1 mutan hücrelerde kalsiyum sinyaline yanıt olarak hücre döngüsünün G1 aşamasında durdurulduğu bulundu. Bu sonuçlara ek olarak kalsiyum sinyalinin hog1 mutan hücrelerde aşırı glikojen birikimine yol açtığı da tespit edildi. *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1* genleri promotor bölgelerine bağlanan potansiyel transkripsiyon faktörleri veri tabanlarına kayıtlı çalışmalardan incelendi. Elde edilen sonuçlar *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1* geni transkripsiyonunun kalsiyuma bağlı aktivasyonunda birden çok transkripsiyon faktörünün işlevi olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Hücre Döngüsü, *HXT* Genleri, Kalsiyum sinyali, Üreme hızı, *Sacchomyces cerevisiae*.

2020, XIV + 59 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF CALCIUM SIGNALING PATHWAY ON THE CELL CYCLE REGULATION AND TRANSCRIPTION OF GENES THAT INVOLVES IN GLUCOSE METABOLISM

Osman Alp ÖZTOP

Bursa Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Calcium is an important biometal ion and acts as an activator of signaling pathways in controlling many metabolic events in cells. The effects of calcium signaling are exerted through the calcium/calmodulin pathway. Crz1 is the transcription activator that activates the transcription of numerous genes in response to calcium signaling in yeast. Glucose is an important carbon and energy source for yeast and transported into yeast cells by hexose transporters (Hxts) via facilitated diffusion mechanisms. Transcription of *HXT* genes is regulated by different metabolic signals including external glucose concentration. Glucose can be metabolized in the glycolytic pathway. Besides, it can be converted into reserve carbohydrates trehalose and glycogen in yeast. In this study, we have investigated the effects of calcium signaling on the expression of *HXT2*, *HXT4*, and *TPS1* genes that are required for glucose transport and trehalose biosynthesis, respectively. Our results indicated that calcium signaling activates transcription of *HXT2*, *HXT4*, and *TPS1* genes under glucose repressed conditions. Interestingly, calcium did not have any effects on the transcription of these genes under glucose derepressed growth conditions. Also, it appears that protein kinases Hog1p and Snf1p involves partially in the calcium-dependent activation of basal transcription in *HXT2*, *HXT4*, and *TPS1* genes. We have also investigated the effects of calcium signaling on the growth rate and cell cycle regulation in yeast. Our results show that calcium acts on the cell cycle via Snf1 kinase and affects the G1 to S transition stage since calcium stops cell cycle in G1 stage in snf1 mutant yeasts. Calcium also interferes with the growth rate in yeast. Furthermore, our results indicated that calcium ions activate the glycogen storage in hog1 kinase-deficient yeasts. In silico analyses of the promoter regions of *HXT2*, *HXT4* and *TPS1* genes indicated that transcription of these genes is activated by multiple regulatory factors whose activities depend on calcium signaling.

Keywords: Calcium signaling, Cell cycle, Growth rate, *HXT* Genes, *Saccharomyces cerevisiae*.

2020, XIV + 59 pages

TEŞEKKÜR

Başta, gerek lisans eğitimim gerek yüksek lisans eğitimim boyunca duruşu, bilimsel birikimi, yol göstericiliği, yardımları ve paylaşımlarıyla, bana mesleğimi öğreten, yetiştiren kendisine büyük minnet ve saygı duyduğum hocam, sayın bölüm başkanım ve danışmanım **Prof. Dr. Sezai Türkel**'e ve yüksek öğrenim hayatım boyunca sürekli yanımda olan, bana destek olan birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, değerli dostlarım **Ceyda Çolakoğlu**'na, **Eren Tanık**'a desteklerinden ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Ayrıca, tez çalışmamda önemli bir yeri olan *S. cerevisiae* suşlarının mikroskop görüntülerinin alınmasında teknik yardımları için **Dr. Öğr. Üyesi Rahşan S. Kaya** ve onun yüksek lisans öğrencilerine teşekkürler ederim. Beni yetiştiren, büyüten daima, destek olan onların evlatları olmaktan gurur duyduğum çok kıymetli babam **Fazıl Öztop**'a çok kıymetli annem **Mihriye Öztop**'a, her zaman kendime örnek aldığım çok kıymetli ağabeyim **D. Günhan Öztop**'a öncelikli olmak üzere ailemdeki her bireye sevgimi sunar ve sonsuz teşekkür ederim.

Osman Alp ÖZTOP
13/ 08 / 2020

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLERİN DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nın Hücresel Özellikleri ve Genom Yapısı	4
2.2. Kalsiyum Sinyal Yolağı ve Hücresel Önemi	6
2.3. Yüksek Afiniteli Kalsiyum Sistemi	8
2.4. <i>S. cerevisiae</i> 'da Glukoz Kullanımı ve Glukoz Sinyal Mekanizmaları	10
2.5. <i>S. cerevisiae</i> 'da Glukoz Transportu ve Depo karbonhidratların Biyosentezi.....	13
2.6. HXT2, HXT4 ve TPS1 Genleri ve Glukoz Metabolizmasındaki İşlevleri	15
2.7. Hücre Döngüsü ve Kontrol Mekanizmaları	18
2.8. Mayada Hücre Döngüsü ve Kontrol Mekanizmaları	20
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	22
3.1. Araştırmada Kullanılan <i>S. cerevisiae</i> Suşları ve Üreme Koşulları	22
3.2. Raportör Gen Vektörlerinin Yapısı ve Transformasyonu	23
3.3. Kalsiyum Sinyal Yolağının Aktivasyonu	25
3.4. Gen Füzyonlarından Transkripsiyon Aktivitesi Tayini.....	25
3.5. Kalsiyum Sinyalinin Mitotik İndekse Etkilerinin Tayini.....	26
3.6. Kalsiyum Sinyalinin Hücre Üremesine Etkileri.....	27
3.7. Kalsiyum Sinyalinin Glikojen Birikimine Etkilerinin İncelenmesi	28
3.8. HXT2, HXT4, ve TPS1 Genleri Promotorlarının Biyoinformatik Analizi.....	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. Kalsiyum Sinyalinin <i>HXT2</i> , <i>HXT4</i> ve <i>TPS1</i> Transkripsiyonuna Etkileri	30
4.2. Protein kinaz Snf1'in <i>HXT2</i> , <i>HXT4</i> ve <i>TPS1</i> 'de transkripsiyona etkileri	32
4.3. Kalsiyum Sinyalinin Hücre Bölünmesine ve Morfolojisine Etkileri	33
4.4. Kalsiyum Sinyalinin Hücre Üremesine Etkileri.....	36
4.5. Kalsiyum Sinyalinin Glikojen Biyosentezine EtkileriEtkileri	37
4.6. HXT2, HXT4, ve TPS1 Genleri PromotorlarıYapısının İn-Silico Analizi.....	38
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	44
KAYNAKLAR DİZİNİ	48
EKLER.....	55
Ek 1: Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması.....	56
Ek 2: β - Galaktozidaz Aktivitesi Hesaplanması	58

ÖZGEÇMİŞ	59
----------------	----



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
Ca ⁺⁺	Kalsiyum 2+ iyonu
Cu ⁺⁺	Bakır 2+ iyonu
Fe ⁺⁺	Demir 2+ iyonu
g	Gravity (santrifuj birimi)
α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta, delesyon
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
Σ	Sigma

Kısaltmalar

Açıklama

APC	Anafaz Teşvik Kompleksi
Arg	Arginin
Asp	Aspartik asit
ATP	Adenosintri fosfat
CaM	Kalmodülin
cAMP	Siklin adenoazinmonofosfat
CCH1	Calcium Channel Homolog
Cdk	Siklin Bağımlı Protein Kinaz
CDK	Cyclinedependentkinase
CNA1	Calcineurin A1
CNA2	CalciNeurin A2
CNB1	CalciNeurinsubunit B
DDSE	DNA sekansına bağlı baskılayıcı eleman
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DR	Glukoz baskısı altında olmayan, (Derepressed)
dsDNA	DoubleStrand DNA
G0	Gap0
G1	Gap1
G2	Gap2
GAL2	GalactoseMetabolism
GPD1	Gliserol 3-Fosfat Dehidrogenaz-1 geni
Gpd1p	Gliserol 3-Fosfat Dehidrogenaz-1 proteini/enzimi
GRAS	GenerallyRecognized as Safe
HACS	Yüksek Affinite Kalsiyum Akış Sistemi
HOG	High OsmolarityGlycerolresponse

Kısaltmalar	Açıklama
HXT1-17	HexoseTransporterfamily 1-17
HXT2	HexoseTransporter2
HXT4	HexoseTransporter4
IP3R	İnositoltrisofat reseptörü
Kbp	Kilo basepair
kDa	Kilodalton
L/ROC	Ligand/reseptör kontrollü kalsiyumkanalları
LACS	Düşük Affinite Kalsiyum Akış Sistemi
LacZ	Beta–Galactozidaz geni
Leu	Lösin
LiOAc	Lityum asetat kısa sembolü
M	Molar
MAP	Mitotic Activity Kinase
MAT	Matingtype, <i>S. cerevisiae</i> 'da eşleşme tipi
mg	Miligram
MIG1	MulticopyInhibitor of Gal Gene Expression
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MPF	M Fazı Teşvik Faktörü
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
OD	Optical Density
ONPG	OrtoNitroPhenylGalactoside
ORF	Open Reading Frame (Açık okuma Penceresi)
PEG	Polyetilen glikol
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PKA	Protein Kinaz A
Pol	Polimeraz
PRF	ProgrammedRibosomalFrameshift
R	Glukoz baskılaması (Repressed)
RGT1	RestoresGlucose Transport 1
RGT2	RestoresGlucose Transport 2
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reactiveoxygenspecies
RPM	Rotationperminute
rRNA	Ribozomal RNA
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAGA	Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferaz
SC- Ura	Urasil içermeyen sentetik tam üreme ortamı
ScCch1	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> Calcium Channel Homolog
ScMig1	<i>S. cerevisiae</i> Multicopy Inhibitor of Gal Gene Expression
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Ser	Serin
SGD	Saccharomyces Genome Database
SNF	Sucrosenon-fermenting
SNF1	Sucrosenon-fermenting 1 geni

Kısaltmalar	Açıklama
Snf1p	Sucrose non-fermenting 1 proteini/enzimi
SNF3	Sucrose non-fermenting 3 geni
SOC	Depo-kontrollü kalsiyum kanalları
SPF	S Fazı Teşvik Faktörü
ssRNA	Single Strand RNA
STIM	Stromal etkileşim molekülü
SUC2	Sucrose 2
TPS1	Trehalose-6-Phosphate Synthase
TPS2	Trehalose-6-Phosphate Synthase/phosphatase
tRNA	Taşıyıcı RNA
TRP	Geçici reseptör potansiyeli kanal proteinleri
Ty	TransposonYeast
URA,Ura	Urasil
VOC	Voltaja duyarlı kalsiyum kanalları
yAP	Yeast Aktivatör Protein
YE _p	Yeast Epizomal plazmit
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast extract Pepton Dextrose
YPK	Yeast Protein Kinas
YPK	Yeast Protein Kinase
Yvc1	Yeast Vacuolar Conductance

ŞEKİLLERİN DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Hücre içi kalsiyum dengesi.....	6
Şekil 2.2. Mantar hücrelerindeki kalsiyum- kalsinörün sinyal yolağı.....	8
Şekil 2.3. Kalsiyum sinyal ağının dört birimi.....	9
Şekil 2.4. Kalsiyum sinyali membran sensörleri.....	10
Şekil 2.5. Glukoz seviyesine göre gen ifadesinin düzenlenmesi.....	12
Şekil 2.6. <i>S. cerevisiae</i> 'deki heksoz taşıyıcı gen ailesi.....	14
Şekil 2.7. Mayada trehaloz biosentezinin şemesi.....	17
Şekil 2.8. Hücre döngüsü aşamaları şematik gösterimi.....	19
Şekil 2.9. <i>S. cerevisiae</i> 'de hücre döngüsü.....	21
Şekil 3.1. <i>S. cerevisiae</i> hücre döngüsü aşamalarının şematik gösterimi.....	27
Şekil 4.1. Kalsiyum stresinin yaban tip <i>S. cerevisiae</i> 'da hücre morfolojisine etkileri.....	35
Şekil 4.2. Kalsiyum stresinin <i>snf1Δ</i> mutantı <i>S. cerevisiae</i> 'da hücre morfolojisine etkileri.....	36
Şekil 4.3. Kalsiyum stresinin <i>S. cerevisiae</i> 'nın üremesine etkileri.....	37
Şekil 4.4. Normal ortamda üretilen <i>S. cerevisiae</i> 'da glikojen depolanma durumu.....	38
Şekil 4.5. Kalsiyum stresinin (200 mM) <i>S. cerevisiae</i> 'da glikojen depolanmasına etkileri.....	38
Şekil 4.6. <i>HXT2</i> geni transkripsiyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörleri...	40
Şekil 4.7. <i>HXT4</i> geni transkripsiyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörleri...	41
Şekil 4.8. <i>TPS1</i> geni 1 Kbp promotor bölgesinde Crz1p bağlanma sekanslarının incelenmesi.....	42
Şekil 4.9. <i>TPS1</i> geni transkripsiyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörleri...	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Maya hücresi hücre büyüklüğü ve bileşimi.....	5
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşları ve ilgili genotipler.....	22
Çizelge 3.2. Crz1 transkripsiyon faktörünün bazı bağlanma dizileri.....	29
Çizelge 4.1. Kalsiyum sinyalinin yaban tip maya suşunda repres şartlarda <i>HXT2</i> , <i>HXT4</i> ve <i>TPS1</i> 'de transkripsiyona etkiler.....	30
Çizelge 4.2. Kalsiyum sinyalinin yaban tip maya suşunda derepres şartlarda <i>HXT2</i> , <i>HXT4</i> ve <i>TPS1</i> 'de transkripsiyona etkiler.....	31
Çizelge 4.3. Kalsiyum sinyalinin yaban tip maya suşunda non-ferementatif şartlarda <i>HXT2</i> , <i>HXT4</i> ve <i>TPS1</i> 'de transkripsiyona etkileri.....	32
Çizelge 4.4. Snf1'in <i>HXT2</i> , <i>HXT4</i> ve <i>TPS1</i> 'de repres şartlarda transkripsiyona etkileri.....	33
Çizelge 4.5. Kalsiyumun mitotik indekse etkisi.....	34
Çizelge 4.6. Kalsiyumun hücre döngüsüne etkisi.....	34
Çizelge 4.7. Transkripsiyon faktörü Crz1p'nin YEASTRACT veri tabanına kayıtlı bağlanma sekansları ve ilgili genler.....	39
Çizelge 4.8. <i>TPS1</i> geni promotoruna Crz1p'nin bağlandığı konsensüs sekansını gösteren YEASTRACT kayıtları.....	42

1. GİRİŞ

Kalsiyum bütün ökaryotlarda önemli yapısal ve düzenleyici işlevleri olan bir elementtir. Kalsiyumun *S. cerevisiae*'da da birçok temel metabolik işlevleri bulunmaktadır ve önemli sinyal yollarının kontrolünde de işlevi vardır. Kalsiyum iyonlarının (Ca^{++}) apoptoz, otofaji ve hücre döngüsü başta olmak üzere ökaryotik hücrelerde çok sayıda hücresel işlevde yer aldığı da bilinmektedir (Cyert 2001). Kalsiyum mebrandan kalsiyum transporterleri olan Cch1p ile hücre içinde taşınır ve sitoplazmik konsantrasyonu da 50-200 nM seviyelerinde bulunur (Paidhungat ve Garrett 1997).

S. cerevisiae'da kalsiyumun başlıca depo organeli vakuol'dur. Ayrıca, golgi kompleksi, mitokondri ve endoplazmik retikulumda da önemli seviyede kalsiyum depolanmaktadır. Kalsiyumun bağlandığı önemli bir protein kinaz ise calmodulin olup sitoplazmik hedefleri metabolik duruma ve kalsiyum konsantrasyonuna göre değişir (Cyert 2001). Sitozolik kalsiyum konsantrasyonuna göre Calmodulin tarafından aktive faktörlerden birisi de protein fosfataz olan Calcineurindir (Stathopoulos ve Cyert 1997, Cyert ve ark. 1991, Cyert ve Thorner 1992). Bu fosfatazın da sitoplazmada defosforile ederek aktivitesini kontrol ettiği çok sayıda faktör bulunmaktadır. Bunlardan birisi de transkripsiyon faktörü Crz1p'dir (Cyert 2001). Crz1p transkripsiyon faktörünün *S. cerevisiae*'da kalsiyum konsantrasyonuna bağlı olarak çok sayıda genin transkripsiyonunu kontrol ettiği mikro-array analizi ile belirlenmiştir.

Basit ökaryotik model organizma olan ve ekmek mayası olarak da bilinen *S. cerevisiae* tomurcuklanarak bölünür ve bölünme sonunda birbirinin aynı iki hücre oluşur. *S. cerevisiae* hem haploid hem de diploid formu bulunan maya türüdür. *Saccharomyces cerevisiae*'da çok yüksek oranda glikoz taşınımı gerçekleştirilir. Glukoz taşınımı veya transportu için *S. cerevisiae* hücre membranında 20 kadar glukoz taşıyıcı protein bulunmaktadır (Boles ve Hollenberg 1997). Bu membran proteinlerinden Snf3 ve Rgt2'nin transport işlevi bulunmamakta olup membranda glukoz sensörü olarak işlev görmektedirler. Gal2 ise galaktoz permeazdır, hem galaktoz ve hem de glukoz transportu gerçekleştirir. Glukoz transporterler ise kinetik özellikleri birbirinden farklı olan toplam 17 farklı türde olup *HXT1-HXT17* olarak adlandırılmaktadır.

Glukoz taşınım kinetiği ve kontrol mekanizması çok karmaşık olsa da gelişen genomik ve proteomik teknikler sayesinde her bir glukoz transporter proteinin işlevleri ve bu transporterleri kodlayan genlerin yapısal özellikleri ve kontrol mekanizmaları da açıklanmıştır (Boles ve Hollenberg 1997). *S. cerevisiae*'da glukoz transportu ATP gerektirmeden kolaylaştırılmış diffüzyon ile yapılmaktadır (Reifenberger ve ark. 1995). Bu araştırmada kontrol mekanizması incelenecek olan *HXT2* ve *HXT4* genleri ise yapısal olarak birbirine çok benzeyen glukoz transporter kodlamaktadır. Bu genlerin promotor yapıları önemli seviyede benzerlik göstermektedir ve transkripsiyonları da glukoz sinyali ile kontrol edilmektedir (Özcan ve Johnston 1995, Özcan ve Johnston 1999). *HXT2* ve *HXT4* genleri yüksek afiniteli glukoz transporteri kodlamaktadır, düşük glukoz seviyesinde aktiftirler (Kruckeberg ve Bisson 1990, Theodoris ve ark. 1994).

S. cerevisiae'da glukoz transportu aynı zamanda trehaloz metabolizmasına da bağlıdır. Trehaloz mayada bir depo karbonhidartı olup trehaloz fosfat sentaz enzim kompleksi (TPS) aktivitesi ile sentezlenir (Bell ve ark. 1998). Trehaloz biyosentezi sırasında oluşan ara metabolit trehaloz-6 fosfat aynı zamanda hekzokinaza etki ederek glukoz taşınımını da kontrol eder (Blazquez ve ark. 1993, Eastmond ve ark. 2003). Trehaloz fosfat sentaz enzim kompleksinin en önemli altbirimi *TPS1* geni tarafından kodlanır (Thevelein ve Hohmann, 1995). *TPS1* geni delesyonunun mayada sentetik letal etkisi vardır. Bu mutantlarda kontrolsüz glukoz girişi dolayısıyla hücrede üreme durur (Thevelein ve Hohmann 1995).

Hücre döngüsü bir hücrenin geçirdiği bölünmenin ardından tekrar bir bölünme geçirebilmesi için gereken olayların gerçekleşmesi sürecidir. Bu süreçte hücre fizyolojik şartlar, hücre içeriği DNA sentezi ve segregasyonu ve organellerinin yeterliliği gibi durumları kontrol ederek bölünmeye hazırlanır ve sürecin sonunda iki yavru hücre meydana gelecek şekilde bölünür. Hücre döngüsü genel olarak bölünmeye hazırlık interfaz evresi (G1, S ve G2 fazları) ve bölünmenin gerçekleştiği mitotik evre (M fazı) olarak iki aşamaya ayrılabilir. Bu aşamalar ve hücre döngüsü sıkı bir kontrol altındadır ve mayalardan omurgalılara evrimsel olarak korunmuştur. Hücre döngüsü her aşamanın kendine özgü işleyişin kontrol edildiği kontrol noktalarına sahiptir ve bu kontrol

noktalarının amacı hataların kontrolü ve varsa hataların giderilmesi, bir sonraki aşamaya sorunsuz bir şekilde geçebilmek için zaman kazanılmasıdır. Hücrelerin gerekli fizyolojik şartların yeterli olmadığı durumlarda hücre döngüsüne girmedikleri latent olarak kabul edildikleri bir evre vardır ve bu evre G0 fazı olarak bilinmektedir.

S. cerevisiae'da hücre döngüsü de çeşitli metabolik ve çevresel sinyallere göre kontrol edilir. Hücre bölünme hızı aynı zamanda protein sentez hızına da bağlıdır. Hücrede hücre döngüsü aşamalarının protein sentez hızına da bağlı olduğu bilinmekte olup bu kavram "Critical Rate of Protein Synthesis" olarak açıklanmaktadır.

Bu tez araştırmasında kalsiyum sinyal yolağı aktivasyonunun *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1* genleri ifadesine etkileri, hücre döngüsü ve bazı depo karbonhidratların depolanmasına etkileri incelendi. Araştırmamızda model organizma olarak *S. cerevisiae*'nın yaban tip ve mutant suşları kullanıldı. Elde edilen sonuçlar kalsiyumun çok fonsiyonlu AMP ile aktive edilen protein kinaz olan ve insanda da homologu bulunan Snf1p aracılı olarak hücre döngüsüne etki ettiğini göstermektedir. Ayrıca kalsiyum sinyal yolağı aktivasyonunun *HXT2*, *HXT4* ve *TPS* genleri transkripsiyonunu da belirli hücresel koşullarda aktive ettiği bulundu.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Saccharomyces cerevisiae*'nın Hücresel Özellikleri ve Genom Yapısı

Saccharomyces cerevisiae hastalık yapıcı, alerjik, toksik etkisi, olmayan GRAS (Generally Regarded As Safe) bir maya türüdür. Normal laboratuvar koşullarında haploit hücrelerin ikilenme süresi yaklaşık 90 dk'dır. Laboratuvar ortamında tam besiyeri olarak kullanılan YPD besiyerinde yaban tip *S. cerevisiae* suşları maksimum 2×10^8 hücre/ml yoğunluğa ulaşır (Sherman 1998). Laboratuvar koşullarında üretimi hızlı kolay ve maliyet açısından da oldukça uygundur. Ayrıca, genom boyutunun küçük olması, yaşam döngüsünün kontrol edilebilir olması da önemli avantajlarındandır (Goffeau ve ark. 1996). Tomurcuklanarak bölünen *S. cerevisiae*'da vejetatif bölünme, bir yavru hücrenin ana hücreden büyümesi ile başlayan, ardından nükleer bölünme, hücre duvarı oluşumu ve son olarak hücre ayrılmasıyla gerçekleşir (Sherman 1998). Yüksek organizasyonlu ökaryotlardan farklı olarak *S. cerevisiae*'da mitoz bölünme sırasında nükleus zarı kaybolmaz. Bu tür mitoz bölünmeye de kapalı mitoz denir.

S. cerevisiae haploid ve diploid yaşam formlarına sahip basit ökaryotik bir canlıdır. Haploid ve diploid hücrelerin boyutları, üreme evresine ve suşlara göre değişir. Genelde diploid hücreler elipsoid ve haploid hücreler sferoid şeklindedir. *S. cerevisiae* hücrelerinin büyüklüğü ve hücre bileşimi de haploid forma veya diploid forma göre farklılık göstermektedir (Çizelge 2.1). Ayrıca haploid hücreler bir öncekine bitişik görünen tomurcuklara sahiptir; diploid hücreler ise karşı kutbunda görünen tomurcuklara sahiptir. Her ana maya hücresi genellikle 20-30'dan fazla tomurcuk oluşturmaz ve hücre yaşı hücre duvarında kalan bölünme yarası (bud scars) sayısına göre belirlenebilir.

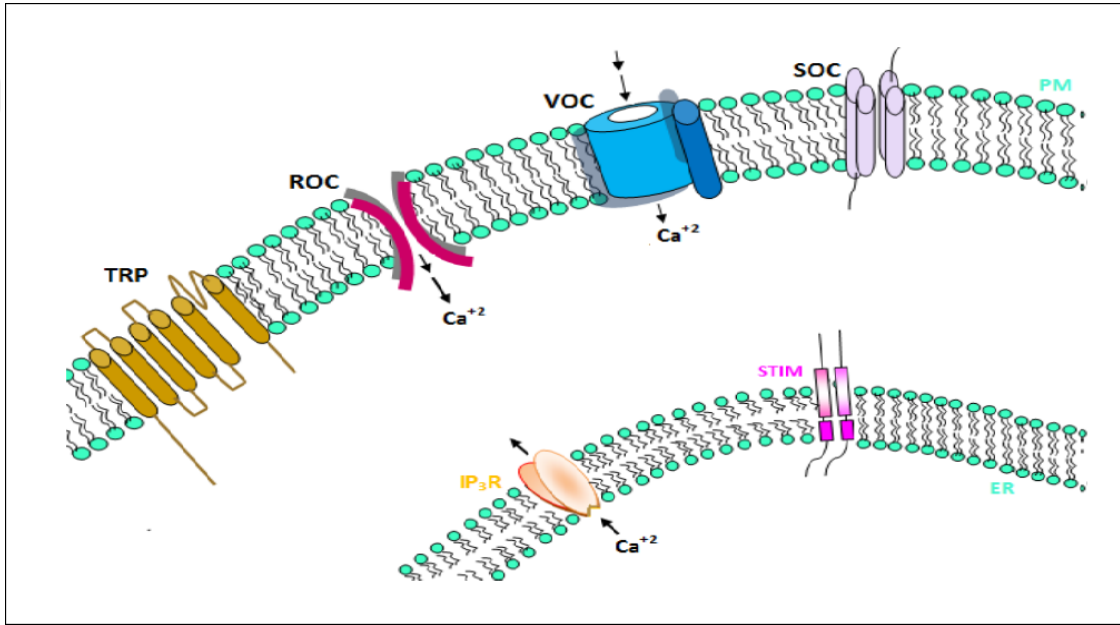
Çizelge2.1. Maya hücresi hücre büyüklüğü ve bileşimi (Sherman 1998).

Maya Hücrelerinin Büyüklüğü ve Bileşimi		
Karakteristik	Haploid hücre	Diploid hücre
Hacim (μm^3)	70	120
Kompozisyon(10^{-12}g)		
Yaş ağırlık	60	80
Kuru ağırlık	15	20
DNA	0,017	0,034
RNA	1,2	1,9
Protein	6	8

Saccharomyces cerevisiae 'nin, haploid genomunda 16 kromozom bulunmakta olup genom büyüklüğü 12,068 kilobazdır. Genomu tamamen sekanslanmıştır. Genomunda yaklaşık 6000 kodlama bölgesi olduğu rapor edilmektedir. Bütün maya genomlarında olduğu gibi *S. cerevisiae* genomu da çok kompakt (gen yoğun) yapıdadır. Genomun %72'sinde RNA kodlama bölgeleri bulunur. Genler arası mesafe çok azdır. Genlerin ortalama büyüklükleri 1.45 Kbç (veya ortalama 483 kodon) olup en küçük kodlama bölgesinin 40 kodon, en büyük kodlama bölgesinin ise 9910 kodon uzunluğunda olduğu bilinmektedir. *S. cerevisiae* genomunda en az 100 amino asit (veya 100 kodon) uzunlukta peptid kodlayan yaklaşık 6183 protein kodlayan gen (6183 ORF) bulunduğu biyoinformatik olarak hesap edilmiştir. Kodlama bölgeleri sayısında bazı suşlarda farklılıklar olduğu da bilinmektedir (Sherman 1998, Parapouli ve ark. 2019). *S. cerevisiae* 'nin bu genlerinde intron çok az sayıda olup toplam ORF'lerin sadece %3.4'ünde intron bulunmuştur. *S. cerevisiae* 'nin XII. kromozomu en büyük kromozomdur. XII. Kromozomun büyüklüğü 100-200 kopya arasında değişen rDNA tekrarları nedeni ile 2060-3060 kb arasında değişmektedir.

2.2. Kalsiyum Sinyal Yolağı ve Hücresel Önemi

Birçok hücresel fonksiyon, farklı sinyal yolları tarafından üretilen kalsiyum (Ca^{++}) sinyalleri ile düzenlenir (Berridge 2016). Hücre içi kalsiyum (Ca^{++}) iyonları gen transkripsiyonunu, hücre çoğalmasını, hücre göçü ve hücre ölümü gibi birçok hücresel fonksiyonu düzenleyen ikincil haberci olarak hareket eder (Cui ve ark.2016). Buna insan hücrelerinde temel hücresel fizyolojik koşulların düzenlenmesi, genlerin ekspresyonu, hücre hareketliliği, apoptoz ve otofaji de dahildir.



Şekil 2.1. Hücre içi kalsiyum dengesi. Hücre membranından kalsiyum taşıma kanalları ve ER membranındaki IP3R ile STIM (Stromal etkileşim molekülü) proteini ile hücre içi kalsiyum dengesi (Çiftçi 2017).

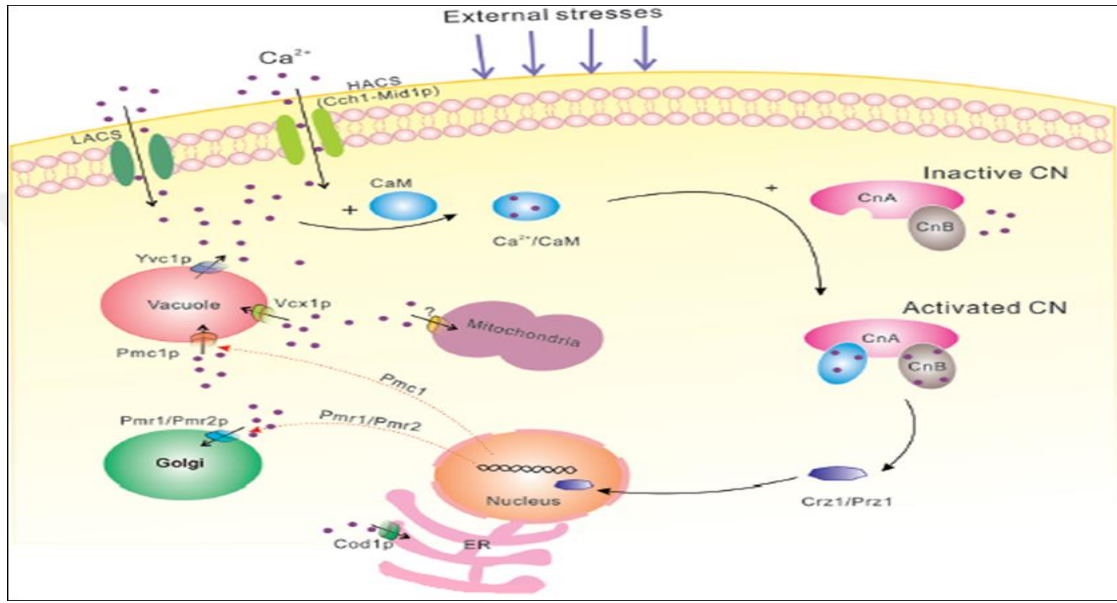
Kalsiyum hücreye dört farklı yol ile girer. Bunlar; plazma membranı üzerinde bulunan voltaja duyarlı kalsiyum (VOC) kanalları, ligand/reseptör kontrollü kalsiyum (L/ROC) kanalları, depo-kontrollü kalsiyum (SOC) kanalları ve geçici reseptör potansiyeli (TRP) kanal proteinleridir. Ayrıca Endoplazmik retikulum membranı üzerinde bulunan IP3R (İnositoltrisfosfat reseptörü) sitoplazmadaki kalsiyum miktarını artırabilir (Şekil 2.1).

Calmodulin (CaM), tanımlanmış bir konsensüs dizisi olmadan çok çeşitli hedef dizileri bağlayabilen, yüksek oranda korunmuş bir eukaryotik Ca^{++} sensör proteindir (Dürvanger ve Harmat 2019). Başka bir deyişle CaM kalsiyum sinyal için intra-membran reseptörü olan Ca^{++} bağlayıcı bir protein ailesinin üyesidir. CaM, çeşitli aşağı akım (downstream) hedef proteinlerle etkileşime girer ve işlevlerini Ca^{++} bağımlı bir şekilde düzenler (Lin 2018). CaM çok sayıda enzimin aktivitesinde rol oynayan, hücresel süreçlerde yer alan 148 amino asit uzunluğunda bir proteindir. CaM proteini prototipik çok yönlü Ca^{++} sensörü ile EF el motifi yüksek afiniteli Ca^{++} bağlanma biriminden oluşur (Zhang ve ark. 2012).

Mayadan insanlara kadar korunmuş olan Ca^{++} sinyal yolağının ortasında bulunan kalsinörin bir fosfatazdır (Connolly ve ark. 2018). Sitolitik Ca^{++} konsantrasyonundaki artışı kalmodulin ve kalmodulin bağımlı serin treonin fosfataz olan kalsinörin gibi birçok proteinin aktive olmasına yol açar (Liu ve ark. 2015). Serin/treonin fosfatazların iki ana ailesi arasında, kalsinörin düzenleyici rolü, bir Ca^{++} /kalmodulin (CaM) düzenlenmiş serin/treonin protein fosfataz (ayrıca protein fosfataz 2b PP2B olarak bilinir) ortaya çıkmaktadır. Kalsinörin Fe^{3+} ve Zn^{2+} den yapılmış binükleer merkezi olan bir metalloenzimdir (Juvvadi ve ark. 2015). Kalsinörin aktif bölgesi dinükleer metal merkezi ile sıkıca ilişkili katalitik alt birimi Kalsinörin A 60kDa ve Ca^{++} bağlanma bölgesi içeren alt birimi Kalsinörin B 19 kDa den oluşan heterodimerik bir proteindir (Rusnak ve Mertz 2000). *Saccharomyces cerevisiae*'de, kalsinörin katalitik alt birimi CNA1 ve CNA2 genleri tarafından kodlanırken, tek bir gen olan CNB1, düzenleyici alt birimi kodlar (Viladevall ve ark. 2004).

Mantar hücrelerindeki kalsiyum- kalsinörün sinyal yolağı eksternal strese karşı plazma zarı kalsiyum akış sistemi (HACS: Yüksek Afinititeli Ca^{++} akım sistemi ve LACS: Düşük afiniteli Ca^{++} akım sistemi) aktive edilir; bu da hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda artışa yol açar. Ayrıca başlıca kalsiyumun depolandığı organellerden kalsiyum salınmasıyla kalsiyum konsantrasyonda geçici bir artış gerçekleşebilir. Giderek artan kalsiyum konsantrasyonu CaM tarafından algılanır ve CaM kalsiyum iyonunu bağlar. Kalsiyum bağlanan CaM (Ca^{++} -kalmodulin) özellikle kalsinörin A alt birimine bağlanır

ve aynı anda kalsinörin B alt birimindeki yüksek afiniteli kalsiyum bağlanma domainini aktive eder. Aktif kalsinörin CRZ1 ve PRZ1 defosforilasyonu ve translokasyonunu sitoplazmadan çekirdeğe indükleyerek aşağı akım hedefleri üzerinde hareket eder. Bu da Kalsinörün–CRZ1 sinyali Ca^{++} -kalsinörin bağımlı hedef genlerin bir kümesinin aktivasyonunu indüklemiş olur. Daha sonra Ca^{++} organeller tarafından çekilmesi ile hücre içi Ca^{++} konsantrasyonu bazal seviyeye indirilir (Şekil 2.2) (Liu ve ark. 2015).

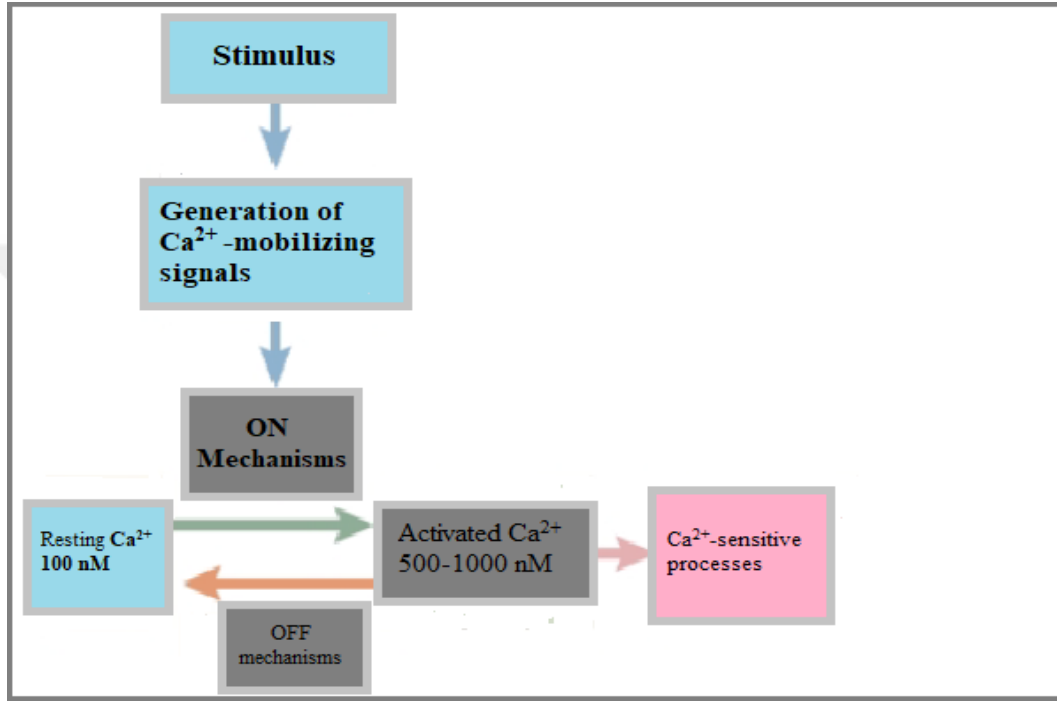


Şekil 2.2. Mantar hücrelerindeki kalsiyum- kalsinörün sinyal yolağı (Liu ve ark.2015).

2.3.Yüksek Afiniteli Kalsiyum Sistemi

S. cerevisiae'da diğer eukaryotlarda olduğu gibi sitozolik serbest kalsiyum konsantrasyonunu $[Ca^{++}]$ hücre plazma zarı boyunca ve hücre içi membran sistemleri boyunca geçişini aktif bir şekilde düşük seviyede tutar (Cunningham ve Fink 1994). Bazı sinyaller (katyonlar, pH, mavi ışık, mantar ilaçları, etanol vb.) hücre içi Ca^{++} konsantrasyonunu artırır. *S. cerevisiae*'da, Hipoozmolarite, ısı şoku, feromonlar, E.R stresini ile Cch1-Mid1 plazma membran kanalının uyarılması sitozolik serbest Ca^{++} konsantrasyonunun artmasına ve Crz1 gibi hedef proteinlerini defosforile eden kalsinörünün aktivasyonuna neden olur. Ca^{++} iyonları sitoplazmaya dış ortamdan ya da plazma zarı Ca^{++} kanal kompleksi Mid1/Cch1 veya endoplazmik retikulum, katyon kanalı yvc1 veya mitokondri yoluyla vakuol gibi hücre içi kalsiyum depolarından hücre içi Ca^{++}

konsantrasyonunu artırır (Thewes 2014, Bonilla ve Cunningham 2003). Hücre içi $[Ca^{++}]$ konsantrasyonu artışı çeşitli mekanizmalar ile etki ederek Ca^{++} mobilizasyonuna neden olan sinyalleri devreye sokar ve artan Ca^{++} seviyesi birçok hücrel yolu tetikleyerek Ca^{++} duyarlı süreçleri uyarır. Yanıt olarak da $[Ca^{++}]$ konsantrasyonu bazal seviyeye çekilir (Şekil 2.3).

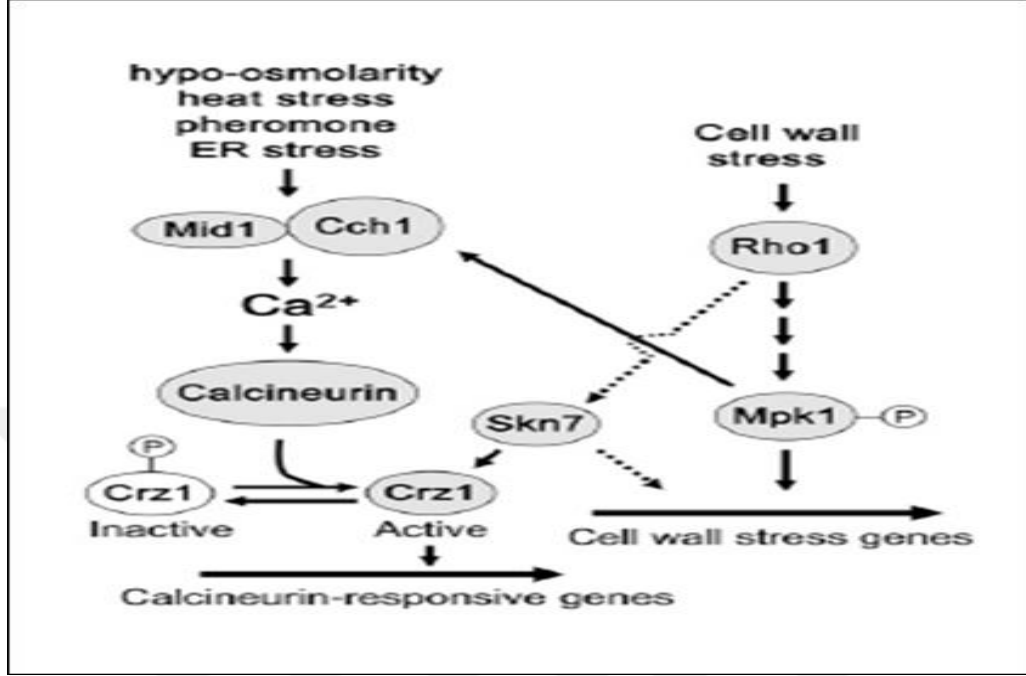


Şekil 2.3. Kalsiyum sinyal ağının dört birimi (Berridge ve ark. 2000).

Bu kalsiyum konsantrasyonunun hücrelerde Ca^{++} sitozol ve organellerde optimal seviyede tutmaya yarayan yüksek oranda düzenlenmiş metabolik yolak kalsiyum homeostaz sistemidir (Cui 2009).

Yüksek afiniteli kalsiyum sistemi (HACS) plazma membran Ca^{++} kanalları ScCch1, ScMid1 ve ScEcm7'den oluşur ve çevresel uyaranlara karşı Ca^{++} akışını oluşturmak üzere aktive edilir. Yüksek afinite kalsiyum sistemi (HAC), plazma zarı kalsiyum Cch1, Mid1 ve Ecm7'den oluşan kanal, çevresel uyaranlara yanıt olarak Ca^{++} akışına izin vermek için aktive edilir (Şekil 2.4.). Sitozolik Ca^{++} 'nın geçici artışı, hücrelerin vakuolar kalsiyum pompası geni PMC1 ve Er/Golgi kalsiyum pompası geni PMR1 de dahil olmak üzere kalsiyum duyarlı genlerin ekspresyonunu indükleyen kalsiyum/kalsinörin sinyal yolu

aktivasyonu ile streslere düzgün bir şekilde cevap vermesi için çok önemlidir (Xu ve ark. 2015).



Şekil 2.4. Kalsiyum Sinyali Membran Sensörleri. Birçok stres ile indüklenen Mid1-Cch1 Ca kanalının aktivasyon şeması (Levin 2011).

2.4. *S. cerevisiae*'da Glukoz Kullanımı ve Glukoz Sinyal Mekanizmaları

Saccharomyces cerevisiae tercihen fermente edilebilir bir karbon ve enerji kaynağı olarak glikozu kullanır. Glikoz, fruktoz veya mannoz gibi hızlı bir şekilde fermente edilebilir karbon kaynakları mevcut olduğunda, alternatif karbon kaynaklarının taşınması ve metabolizmasında ve solunum fonksiyonunda yer alan karmaşık bir düzenleyici ağ aktive edilir (Conrad ve ark. 2014). Bu uyarlamalar esas olarak AMP ile aktive edilmiş kinaz olan Snf1'e bağlıdır. İlk olarak tomurcuklanan mayada tanımlanan Snf1, ökaryotlarda yüksek oranda korunan ve memelilerde, bitkilerde ve mantarlarda enerji homeostazı için gerekli olan snf1/AMPK protein kinaz ailesinin üyesidir. AMPK'ler, enerji rezervlerinin tükendiği koşulları algılamada ve bunlara yanıt vermede merkezi bir rol oynar ve hem enerji üretimini hem de korunmasını teşvik eder (Conrad ve ark.2014).

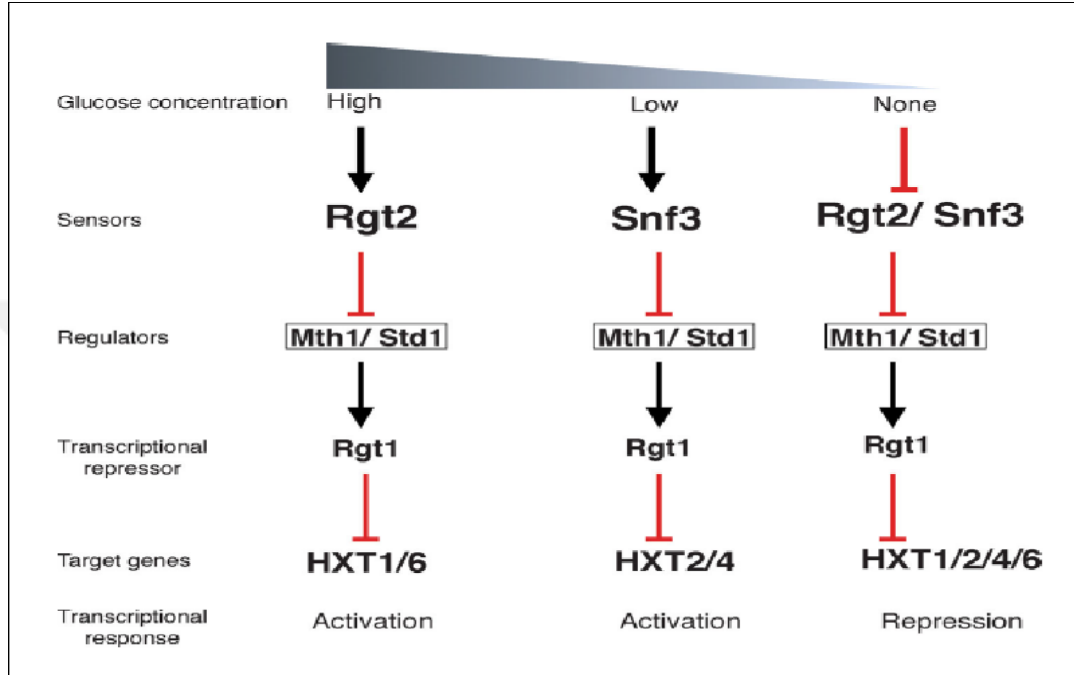
Glukozun çoğu ökaryot tarafından karbon kaynağı olarak kullanılması ve hücresel fonksiyonlar üzerine birçok etkisinin olduğu bilinmektedir. Glukoz glikolitik yolda metabolize edilen bir monosakkarit, karbon kaynağı olmasına ek olarak hücrede ikincil mesajcı gibi davranarak *S. cerevisiae*'da glukoz sinyal iletim yollarını aktive eder (Broach 2012). İlk adım glukoz sinyalinin üretilmesidir. Glukoz sinyalinin üretilmesine dair iki model önerilmektedir. Bunlardan ilki hücre içi glikoz veya metabolitlerinden oluşan sensör sistemi, diğeri ise mebranlara bağlı sensör sistemleridir (Lucero ve ark. 2002).

S. cerevisiae'da iyi bilinen üç adet glukoz algılama sistemi bulunmaktadır. Her sistem glukoz sinyalini farklı şekilde algılar ve iletir. Birinci mekanizma glukoz seviyesi yüksek olduğunda Snf1 protein kinaz aracılığıyla gen ekspresyonunun baskılanmasına neden olur. Diğer mekanizmada membranda bulunan sensör faktörler olan Snf3 ve Rgt2 tarafından ardışık sinyaller ile glikoz taşıyıcılarını kodlayan genleri indükler. Son mekanizma ise farklı bir membran sensörü olan ve Gpr1dir. Bu faktör G-proteini birleşerek ikincil mesaj olan cAMP aracılı olarak işlev görür (Kaniakve ark. 2004).

Glukoz algılanması ve sinyalizasyonu için yapılan deneysel çalışmalarda maya hücrelerinde heksoz taşıyıcıların kodlandığı (*HXT*) genlerinin olduğunu ve farklı glikoz seviyelerine göre indüklendiğini ortaya çıkarmıştır (Özcan ve ark. 1996). Heksoz taşıyıcıların transkripsiyonu 10 ila 300 kat indüklenir. *HXT*'nin glukoz indüksiyon analizi gen ekspresyonu üç tür düzenleme ortaya çıkarmıştır. Birincisi şeker konsantrasyonundan bağımsız olarak glukoz ile indüksiyon, ikincisi yüksek glukoz konsantrasyonunda baskılama ve üçüncüsü düşük glukoz konsantrasyonunda baskılamadır (Özcan ve Johnston 1995).

S. cerevisiae'de glukoz sinyalizasyonuna katılan beş farklı sistem bulunmuştur. Ras/PKA, Gpr1/Gpa2, Sch9, Snf1 ve Rgt2/Snf3. Snf3p yüksek afiniteli glukoz taşıyıcısı, düşük glukoz konsantrasyonuna yanıt veren sensör olarak işlev görür, çünkü birkaç heksoz taşıyıcısının ekspresyonunun indüklenmesi için gereklidir. Snf3p'ye çarpıcı bir şekilde benzeyen ve yüksek glukoz seviyelerine yanıt olarak gen ekspresyonunun indüksiyonu için gerekli olan başka bir belirgin glukoz taşıyıcısı ise Rgt2'dir (Özcan ve ark. 1996).

Glukozun gen ekspresyonu üzerinde baskılama etkisi olduğu bilinmektedir. Son veriler, glukoz baskısının glukoz alımını ve metabolizmasını gerektirdiğini göstermektedir. Yüksek glukoz konsantrasyonlarının yokluğunda glukoz baskılanmış genlerin (*GAL1* ve *SUC2* gibi) derepresyonu, protein kinaz Snf1'i gerektirir (Özcan 2002).



Şekil 2.5. Glukoz seviyesine göre gen ifadesinin düzenlenmesi (Kayıkcı ve Nielsen 2015).

Glukoz baskılanması mikroorganizmalarda yaygın olarak görülür. Bu sayede alternatif karbon kaynaklarının metabolizması için gerekli olan çok sayıda genin ekspresyonu düzenlenmiş olur. *S. cerevisiae* glukoz baskılanması sükröz, maltoz ve galaktoz metabolizması için ve nonfermente gliserol, etanol ve asetat gibi karbon kaynaklarının yanı sıra glikoneojenik, solunum enzimleri ve mitokondriyel gelişimi düzenler (Trumbly 1992). Glukozun baskılama etkisi, birbiriyle bağlantılı düzenleyici etkileşimler ve sinyal yolları ile hücrel makinelere iletilir. Bu koordinatif moleküler faaliyetler esas olarak transkripsiyonel düzeyde etkilerini gösterirler, ancak post-transkripsiyonel ve post-translasyonel seviyelerde de etkilidir (Kayıkcı ve Nielsen 2015).

Glukoz tarafından baskılanan bir gen sınıfı, solunumda yer alan proteinleri (Krebs döngüsü ve elektron taşıma zinciri proteinleri), glukoneogenezi ve glioksilat döngüsü

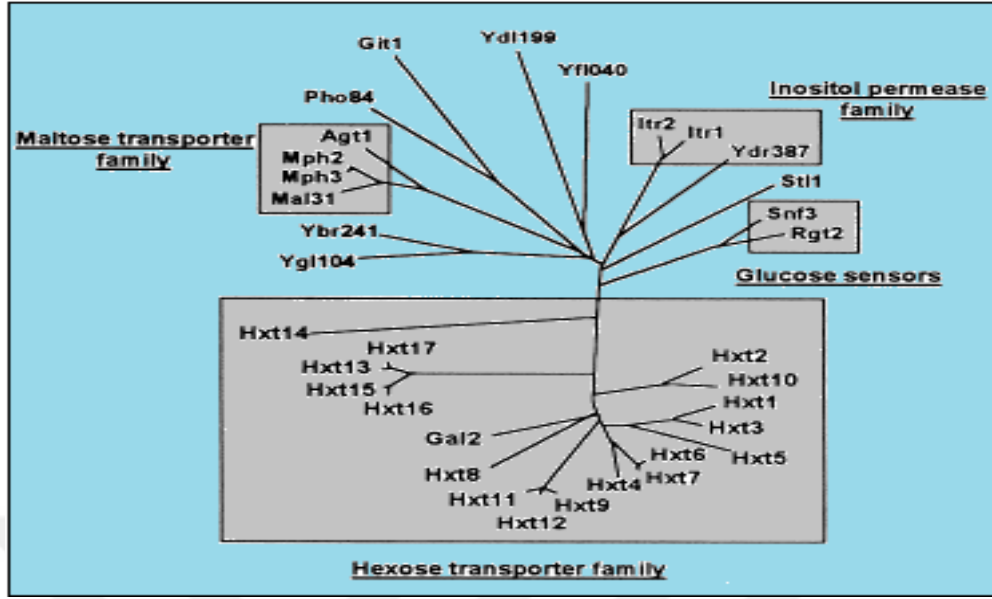
genlerini kodlar. Bir başka önemli sınıf, özellikle *GAL*, *SUC* ve *MAL* genleri ve etanol, laktat ve gliserol kullanımında yer alan genler gibi alternatif karbon kaynaklarının alım ve metabolizasyon adımlarında yer alan proteinleri kodlar. Ayrıca, yüksek afiniteli glukoz taşıyıcıları da yüksek glukoz seviyeleri ile baskılanır (Rolland 2002).

2.5. *S. cerevisiae*'da Glukoz Transportu ve Depo karbonhidratların Biyosentezi

Glukoz hücrelerde önemli bir enerji kaynağıdır. Ayrıca hücreler lipid ve protein sentezi için substrat olarak kullanır. NADPH üzerinden pentoz fosfat yan yolu, glikoliz ve sitrik asit döngüsü aracılığıyla ATP formunda enerji sağlar. Trigliseridler için gliserol sentezinde kullanılır, aminoasit üretiminde de ara ürünler sağlar (Zhao ve Keating 2007).

Önemli bir besin olmasının yanı sıra, glukoz hücre büyümesi, metabolizması ve gelişiminin çeşitli yönlerini düzenlemek için bir “büyüme hormonu” görevi görebilir (Özcan ve Johnston 1999). Bunların yanı sıra çoğu ökaryotik canlıda glukoz gen ifadesini düzenleyen ikincil bir mesaj olarak görev yapmaktadır. Örneğin *S. cerevisiae* glukoz, glukoz baskılması ve glukoz indüksiyon olarak bilinen iki farklı yol aracılığıyla gen ekspresyonu düzenler (Özcan 2002). Dolayısıyla glukozun hücreye alınımı önemli bir fizyolojik yoldur. Mebranlar arası hareketi özel taşıyıcılar gerektirir (Yan 2017).

S. cerevisiae'da *HXT1-HXT17*, *GAL2*, *SNF3* ve *RGT2* olmak üzere yirmi farklı heksoz taşınımı ile ilgili gen karakterize edilmiştir. *HXT* ile ilgili tüm genler çok yüksek derecede (yaklaşık olarak % 46,9 ile %99,7 aralığında) dizi benzerliğine sahiptir. Bunlardan *HXT1-HXT17* genleri, monosakkaritler glukoz, früktoz ve mannoz için önerilen taşıyıcıları kodlar (Türkel ve Bısson 1999). *S. cerevisiae*'da *HXT* genlerine ek olarak *GAL2* ve maltoz taşıyıcıları *AGT1* bazı *S. cerevisiae* suşlarında glukoz alımı için en önemli olanlarıdır (Elbing 2004).



Şekil 2.6. *S. cerevisiae*’deki heksoz taşıyıcı gen ailesi (Wieczorke ve ark.1999).

Trehaloz alfa, alfa-1,1 bağlantısı ile bağlanmış iki glukoz molekülünden oluşan indirgenemezliğe sahip bir tür disakkarittir. Beyaz, kokusuz toz ve görelî tatlılığı sükrozun %45’i kadardır (Wang ve ark. 2013). Bakteri varyetelerinden, mantarlarda, bazı bitkilerde ve bazı hayvanlarda önemli fizyolojik işlevleri bulunmaktadır (Hounsa ve ark. 1998).

Trehaloz, mantarların hem vejetatif hem de üreme yapılarında yaygın bir disakkarittir. Özellikle mayada, parçalandığında bir karbon ve enerji kaynağı olarak hizmet eden bir depo karbonhidrat olarak kabul edilir ve ayrıca maltoz kullanımı sırasında bir glikoliz düzenleyicisi olarak işlev görebilir (Gadd 1987). Ayrıca mayada, trehaloz bir depo bileşiği olsa da farklı abiyotik stres türlerine adaptif tepki için kullanılabilir. Ayrıca trehaloz 6-fosfatta, trehaloz biyosentezi ara maddesinin glikoliz sırasında glukoz metabolik akısının bir düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir (Avonce ve ark. 2006). Bu sebeple trehaloz, bir enerji kaynağı olarak ve mikroorganizmalarda ve omurgasızlarda stres cevabında merkezi bir role de sahiptir.

Bakteri, mantar, arkea ve böceklerde ozmotik koruyucu olarak önemli bir rolü bulunmaktadır (Voogd ve ark. 2016). Doğrudan kanıtı mantarlar için azdır, ancak çalışmalar, yüksek bir karbonhidrat içeriğinin ekmek mayasının otolize direncini artırabileceğini göstermiştir. Dehidrasyona karşı koruyucu olarak trehalozun rolü, maya dışındaki biyolojik sistemlerde daha fazla dikkat çekmiştir. Trehaloz döngüsü hayatta kalmak için dehidrasyon sırasında trehaloz sentezi ve/veya rehidrasyon sırasında bozulması ile ilişkilidir (Gadd 1987). Trehalozun bu tür önemli streslerde canlılığın devamı için depo edildiği ve stres şartları ortadan kalktığında hızlıca hidrolize edildiği bilinmektedir. Bu stres koşulları yüksek şeker, tuz, sıcaklık, kuruma vs`dir.

Trehaloz sentezi trehaloz-6-fosfat sentaz (Tps1) geni ve trehaloz-6-fosfat fosfataz geni (Tps2) Tsl1 tarafından kodlanan düzenleyici alt birim ve Tps3 den oluşan bir kompleks tarafından gerçekleştirilir (Hounsa ve ark. 1998). Trehaloz biosentezi için bilinen en az beş yol bulunmaktadır. İlk keşfedilen yol 50 yıl önce keşfedilmiş olup yaygın bir dağılım gösterdiği bilinmektedir. Bu yol trehaloz-6-fosfat sentaz (TPS) ve trehaloz-fosfataz (TPP) ile katalize edilen iki enzimatik adımı içerir. TPS glukozun UDP-glukozdan glukoz-6 fosfat formuna dönüştürülmesini katalize eder. TPP`de Trehalose 6-phosphate (T6P) ve UDP`yi trehaloza ve inorganik fosfata defosforile eder (Avonce ve ark. 2006).

2.6. *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1* Genleri ve Glukoz Metabolizmasındaki İşlevleri

Mayada glukoz konsantrasyonuna yanıt olarak hücre metabolizmasının yeniden programlanması için büyük bir gen seti baskılanır ve/veya indüklenir. Bu esas olarak transkripsiyonel düzeyde kontrol edilir. Glukoz taşıyıcıların ana grubunun ifadesi, *HXT1-4* ve *HXT6* ve *HXT7* olup Snf3 / Rgt2-Rgt 1 (SRR) sinyal yolu ile kontrol edilir (Adamczyk ve ark. 2017). *HXT2*, yüksek afiniteli bir glukoz taşıyıcısıdır. *S. cerevisiae*`nin ana kolaylaştırılmış difüzyon süper ailesinin (MFS) bir üyesidir (Kasahara ve Kasahara 2003).

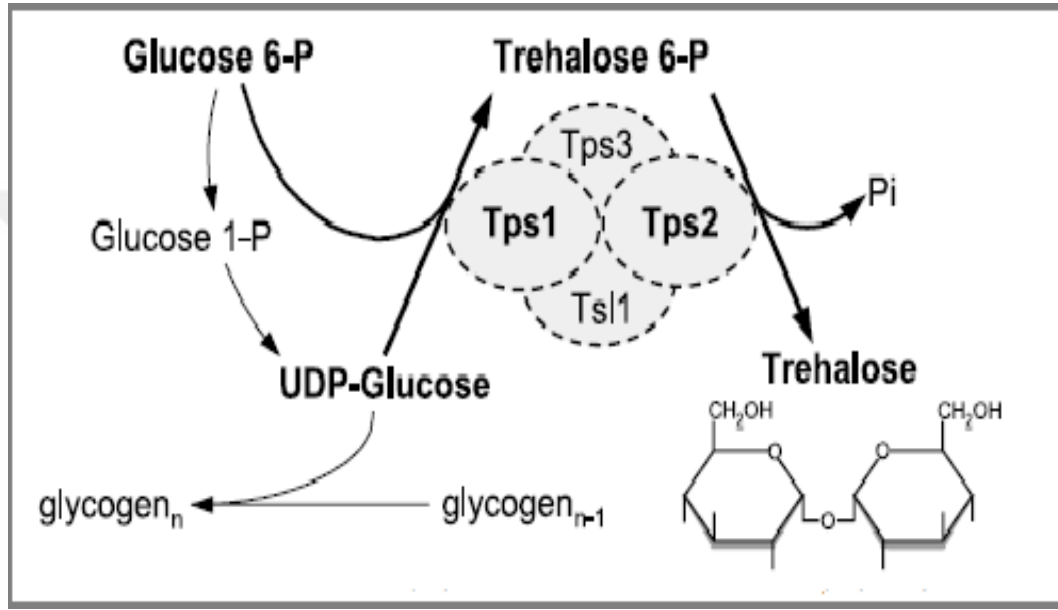
HXT2`nin DNA dizisinin analizi sonucu olarak 59.84 kDa boyutunda bir protein kodlayabilen 541 kodonluk açık okuma çerçevesine sahip olduğu ortaya konmuştur. Tahmin edilen protein prokaryotlardan eukaryotlara yüksek oranda sekans ve yapısal

homoloji göstermektedir. Bu protein transmembran etki alanları oluşturabilecek 12 hidrofobik bölgeye sahip olup bu transmembran etki alanlarının oldukça korunmuş bölgeler olduğu bilinmektedir (Kruckeberg ve Bisson 1990).

Saccharomyces cerevisiae'daki glukoz ve fruktoz alımına, hem yüksek (glukoz için $K_m = 1$ ila 2 mM, fruktoz için 5 ila 7 mM) hem de düşük (glukoz için $K_m = 15$ ila 20 mM ve fruktoz için 50 ila 100 mM) afinite taşıma sistemi aracılık eder. Düşük afiniteli alım, kolaylaştırılmış difüzyon ile ortaya çıkmaktadır. Yüksek afiniteli alım, düşük afiniteli (yüksek glukoz konsantrasyonu) ortamda yetiştirilen hücrelerde ifade edilmez. Yüksek glukoz konsantrasyonlarının varlığı ve mutant çalışmalar bu taşıma sisteminin glukoz katabolit baskı kontrolü altında olduğunu ortaya koymuştur (Bisson 1987). *HXT2* ekspresyon seviyesindeki regülasyonu sadece düşük glukoz seviyeleri ile indüklenir. Bu düzenleme, transkripsiyon faktörü Rgt1 tarafından yapılır. Rgt1 hem aktivatör ve hem de represör olarak işlev görür. Rgt1 fonksiyonu, yüksek glukozda üretilen hücrelerde inhibe edilir ve *HXT* genlerinin derepresyonuna yol açar. Rgt1'nin düşük glukoz seviyeleri ile inhibisyonu ve dolayısıyla *HXT2* ekspresyonunun indüksiyonu, belirgin bir yüksek afiniteli glukoz taşıyıcısını kodlayan Snf3p gerektirir. Snf3 düşük glukoz seviyeleri için bir sensördür (Özcan ve ark. 1996).

Öte yandan yüksek afiniteli (düşük-konsantrasyon) heksoz alımı *S. cerevisiae*'deki glukoz, fruktoz, mannoz gibi heksozların taşınımı yüksek glukoz (% 2 veya daha yüksek seviyeler) tarafından baskılanabilir. Maya hücrelerinde düşük (%0.05) heksoz konsantrasyonu veya fermante edilemez bir karbon kaynağı içeren ortamda yüksek afiniteli heksoz taşıyıcıları maksimum olarak ifade edilir (Wendell ve Bisson 1993). Dolayısıyla maya hücrelerinin büyüme ortamındaki heksoz konsantrasyonuna göre adaptif cevap verebilmesi yaşamsal faaliyetleri için elzemdir. Glukoz alımı kinetikleri incelendiğinde *HXT2* ve *HXT4*'ün yüksek affiniteli ($K_{m(\text{glukoz})}=10\text{mM}$) glukoz taşıyıcısı olduğu bilinmektedir (Reifenberger ve ark. 1997). *HXT2* ve *HXT4*, aynı zamanda yüksek glukoz seviyeleri ile aktive edilen bir represör olan Mig1p (multicopy inhibitor of gal gene expression) tarafından glukoz baskılamasına da tabidir (Özcan ve ark. 1996). *HXT2* ve *HXT4* gen ifadeleri histon modifiye edici faktör olan SAGA (Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferaz) kompleksi ile de kontrol edilir (Oevelen 2005).

Maya trehaloz-6-fosfat sentaz (Tps1), trehaloz sentezinde trehaloz-6-fosfat (T6P) oluşumunu katalize eder. Ayrıca, Tps1, hücrede karbon ve enerji dengesinin korunmasında işlevi vardır. *TPS1* geni delesyonlu bir mutantta glukoz ilavesine yanıt olarak ATP kaybı ve şeker fosfatlarının hiper birikimi sonucu üreme durur (Vicente ve ark. 2018).



Şekil 2.7. Mayada trehaloz biosentezinin şemesi. Trehaloz biosentezi ve UDP- glukoz kullanımıyla başlayan glikojen ve trehaloz biosentezi arasındaki ilişkide gösterilmektedir (Gancedo ve ark. 2004).

Mayalarda trehaloz sentezi üridin-difosfoglukoz (UDP-glukoz) ve glukoz 6-P'den başlayarak iki adımda gerçekleşir. Sentezi katalize eden enzimler, trehaloz 6 –P sentaz (Tps1) ve trehaloz 6-P fosfataz (Tps2), diğer iki proteinin (Tsl1 ve Tps3) katıldığı bir kompleksin parçasıdır. Bu son proteinler kompleksin stabilitesinde rol oynar (Şekil 2.7).

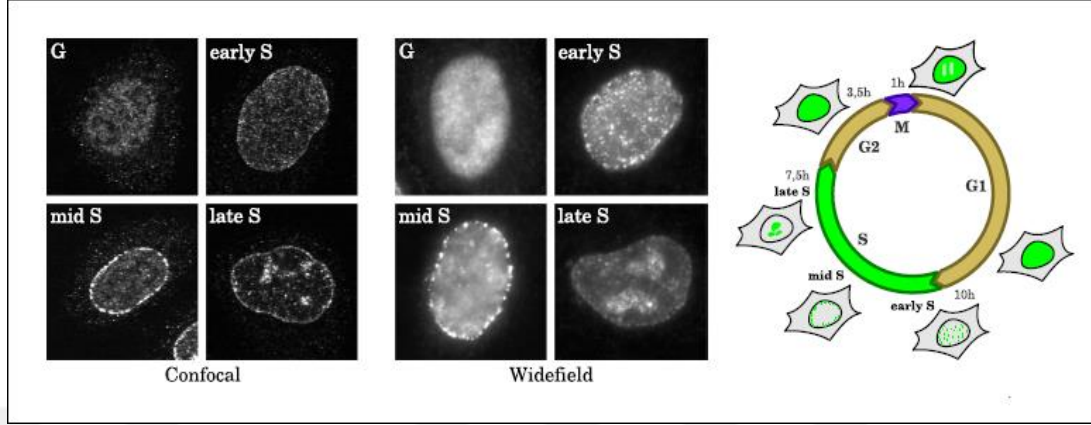
2.7. Hücre Döngüsü ve Kontrol Mekanizmaları

Hücrenin ya da yaşayan bir organizmanın kendini çoğaltması en temel özelliğidir. Tüm hücreler ikiye bölünerek çoğalır. Hücre bölünmesinin her aşamasının tamamlanması üzerine her atasal hücreden iki yavru hücre meydana gelmiş olur. Bu yeni yavru hücreler kendileri büyüyerek yeni hücre popülasyonları oluşturur (Cooper 2019). Hücre döngüsü sırasında bir hücrenin DNA replikasyonu yavru hücrelere gönderilecek şekilde sitoplazmasının ve organellerinin bölünmesini kapsayan olaylar gerçekleşir. Çevresel uyaranlar ve hücre içi kontrol noktaları tarafından düzenlenir. Hücre döngüsü sırasında yavru hücrelere hücrenin içeriğinin rastgele bölünmesi aynı şekilde hücrelerdeki biyomoleküllerin rastgele etkileşimleri hücre döngüsünün değişkenliğine yol açar (Mura ve ark. 2019).

Kromozomların çoğalması ve yavru hücrelere aktarılması ile ilgili olaylar tüm hücre döngüleri için ortaktır. Çünkü, birkaç istisna dışında, yeni bölünmüş bir hücrenin hayatta kalmak için tam bir genoma sahip olması gerekir (Nurse 2000). Hücre döngüsü iki temel kısma ayrılır: mitoz ve interfaz. Mitoz (nükleer bölünme) DNA sentezinin zamanlaması, ökaryotik hücrelerin hücre döngüsünü dört ayrı faza böler, döngünün M fazı, genellikle sitokinez tarafından takip edilen mitozla karşılık gelir (Cooper 2019). İnterfaz sırasında, bir hücre hacimce büyüme ve DNA replikasyonu yoluyla bölünmeye hazırlanır.

G1 fazı, bir önceki bölünmenin sitokinezinin sonu ile S fazının başlangıcı arasındaki boşluktur ve hücrenin DNA replikasyonu için hazırlık aşamasında hacimce büyüdüğü, hücrenin tekrar bölünüp bölünmeyeceğine karar verildiği fazdır (Şekil 2.8) (Wenzel ve Shwar 2018). S fazında her kromozomun sadece 1 kez replike olması sağlanır. G2 fazı ise mitozla hazırlık aşamasıdır. Bu aşamada sentromer duplikasyonu gerçekleşir. Ancak *S. cerevisiae*'de sentromer işlevini gerçekleştiren yapı nükleus zarında bulunan Spindel Pole Body (SPD) cisimciğidir (Feldman 2012). Yüksek organizasyonlu, doku organ farklılaşması gösteren ökaryotlardan farklı olarak *S. cerevisiae*'de mitozda nükleus zarı kaybolmaz. Bu tür bölünmeye kapalı mitoz denir. *S. cerevisiae*'de ökaryotlardan farklı olarak lizozom da bulunmaz. Lizozom işlevi vakuol tarafından gerçekleştirilir (Feldman

2012). *S. cerevisiae*'da hücre bölünmesi işlevsel olarak normal mitoz olsa da bazı kaynaklarda halen tomurcuklanma ile bölünme olarak adlandırılmaktadır.



Şekil 2.8. Hücre döngüsü aşamalarının şematik gösterimi. Konfokal (sol) ve geniş alan (orta) mikroskopta hücre döngüsü aşamaları. Hücre döngüsü şematik taslağı (sağ) (Schönenberger ve ark. 2015).

Memeli hücre döngüsünün G1 fazındaki kısıtlama (restriction)/kontrol noktası (Checkpoint), hücre büyümesini ve bölünme döngüsünü düzenleyen iyi bilinen ve yaygın olarak kabul edilen bir kontrol elemanıdır (Cooper 2003). Kısıtlama noktasından geçmeden önce, bazı hücrel ve çevresel koşullara bağlı olarak hücre döngüsü durdurularak hücreler G0 veya latent faz adı verilen proliferatif olmayan bir faza girebilirler. Bu çevrim dışı durum, geri dönüşümsüz olan yaşlılık veya terminal farklılaşma gibi diğer hücre döngüsü çıkışlarından temel olarak farklıdır. Çevresel veya hücre içi koşullar normal duruma geldiğinde hücreler, G0'dan tekrar G1'e geçerek hücre döngüsüne devam edebilirler (Grant ve Cook 2017).

Hücre döngüsünü kontrol eden faktörler sırasıyla; siklinler (Cln), siklin bağımlı protein kinazlar (Cdk) ve Cdk inhibitörü olan sikline bağımlı kinaz inhibitörleridir (Cki). Hücre döngüsünün moleküler bileşenleri ilk kez Leland Hartwel tarafından *S. cerevisiae*'da keşf edilmiştir (Hartwel 1973). *S. cerevisiae*'da farklı hücre döngüsü aşamalarının yani M, G1, S ve G2 aşamalarının mikroskopta kolayca görüntülenebilmesi ve şartlı mutantların kullanılması hücre döngüsünü kontrol eden faktörlerin tayin edilmesinde önemli rol oynamıştır (Hartwell 1973). Cdk'lar hücre döngüsünde döngü aşamasına özgü hücrel işlevlerin koordinasyonunu sağlayan kinazlardır (Morgan 1997). Cdk'lar siklinler ile

kompleks oluşturarak aktivite kazanır. Cln-Cdk kompleksi aktiviteleri çevresel ve hücrel sinyallere bağlı olarak sikline bağlı kinaz inhibitörleri (CKI) faktörlerince kontrol edilir.

Hücre döngüsü kontrol noktaları, DNA hasarına, DNA replikasyonu veya kromozom ayrımı gibi hücre döngüsü olaylarındaki hatalara yanıt olarak aktive edilen filogenetik olarak korunmuş sinyal kaskadlarıdır (Bartek ve Lukas 2001, 2003). Düzenleyici kontrol noktaları G1/S veya kısıtlama kontrol noktası, G2/M veya DNA replikasyon kontrol noktası ve metafaz/anafaz veya mitoz aparatı kontrol noktasını içerir.

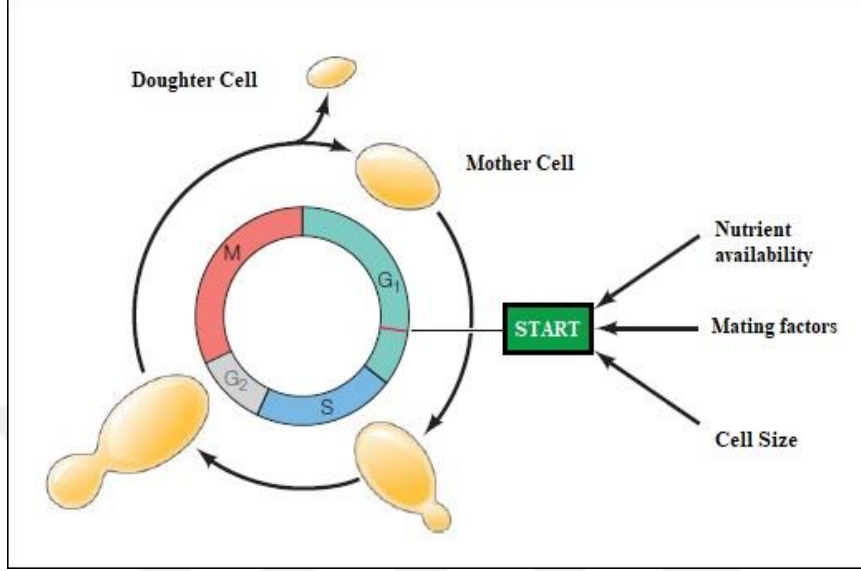
Kısıtlama kontrol noktası öncelikle büyüme faktörleri, hücre büyüklüğü, hücre beslenmesi ve DNA hasarından etkilenir. DNA replikasyonu kontrol noktası öncelikle uygun olmayan DNA replikasyonu ve hasarından etkilenir (Wenzel ve Singh 2018).

2.8. Mayada Hücre Döngüsü ve Kontrol Mekanizmaları

S. cerevisiae hücre döngüsü genetik kontrolünün analizi için uygun bir organizmadır. Bu organizma hem haploid hem de diploid hücre bölünmesi sırasında aynı olay dizisine uğrar. Hücre bölünmesini tamamlama yeteneğini bozan resesif mutasyonlar haploid hücrelerden izole edilebilir ve bu tür iki mutasyonun tamamlama sergileme kabiliyeti diploid hücrelerde incelenebilir. İkincisi, tek bir *S. cerevisiae*, yüzeyinde bir tomurcuğun ortaya çıkmasıyla mitotik bir döngüye başlar ve bu tomurcuk mitotik döngü boyunca büyür (Hartwell 1973).

S. cerevisiae'de büyüme ve bölünme iki aşamaya ayrılır, bu iki aşamanın arasına konumlandırılmış kritik bir eşik gereksiniminin (critical threshold requirement: CTR) varlığı söz konusudur. Aşama 1 büyüme ve CTR'de oluşur. Aşama 2 ise G1 fazı sonundaki 'START' ile başlar. START noktası veya aşaması *S. cerevisiae*'da yeni hücre döngüsü aşamasının başlangıcı için önemli bir noktadır. Hücreler START'dan geçtikten sonra, S fazına girmeye ve bir hücre bölünmesi döngüsüne girmeye kararlılırlar. Bununla birlikte, START yoluyla geçiş, maya hücre döngüsünde, dış sinyaller tarafından besin

maddelerinin mevcudiyeti ve hücre boyutuna göre kontrol edilen, oldukça düzenlenmiş bir olaydır (Şekil 2.9) (Cooper 2019).



Şekil 2.9. *S. cerevisiae*’da hücre döngüsü.

S. cerevisiae’de hücre döngüsü aşamalarını kontrol eden ve cell division cycle (CDC) genleri olarak bilinen çok sayıda gen tanımlanmıştır. Bu CDC genlerinin *S. cerevisiae* genomunun sekanslanması ve gen işlevlerinin tanımlanması sonucu günümüzde hücre döngüsünü kontrol eden Cdk, Cln, Cki ve DNA replikasyonu için gerekli faktörler olduğu ortaya çıkmıştır (Amon 1997).

Bu tez çalışmasının amacı glukoz transportunda işlevi olan genlerden *HXT2* ve *HXT4* genlerinin çok fonksiyonlu depo karbonhidratı olan trehalozun biyosentezinde işlevi olan *TPS1* genleri transkripsiyonuna etkilerinin incelenmesidir. Ayrıca kalsiyum sinyalinin hücre bölünme hızına ve depo karbonhidratı olarak glikojen birikimine etkilerinin incelenmesidir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Araştırmada Kullanılan *S. cerevisiae* Suşları ve Üreme Koşulları

Bu tez araştırmasında kullanılan *S. cerevisiae*'nin yaban tip ve mutantsuşları ve özellikleri çizelge 3.1'de verildi. Bu *S. cerevisiae* suşları Frankfurt Üniversitesi tarafından kontrol edilen EUROSCARF maya koleksiyonundan satın alındı. Bu *S. cerevisiae* suşlarının tüm genomları sekanslanmış olup Çizelge 3.1'de verilen delesyonlardan başka mutasyon içermedikleri bilinmektedir. Araştırmamızda yaban tip suş olarak kabul edilen BY4741 (Y00000) (laboratuvar kodu olarak YST124) suşu kalsiyum sinyal yollağının glukoz transportundan sorumlu bazı genler ve hücre döngüsü üzerine etiklerinin incelenmesi için standart referans suş olarak kabul edilmiştir. EUROSCARF'dan sağlanan yaban tip ve mutant *S. cerevisiae* suşlarına ait örnekler ayrı ayrı YPD (Yeast Extract, Peptone, Dextrose) petrilere çizgi ekimi yapılarak yeniden üretilmek ve canlılıklarını doğrulamak için 30 °C'de, 48 saat inkübatörde üremeye bırakıldı. Delesyonlu suşların ilgili gende delesyon içerdikleri satın alınan *S. cerevisiae* suşları G418 (Geneticin) içeren petrilere üretilerek doğrulandı. KanMX4 markör geni içeren delesyonlu suşların G418 antibiyotiğine direçli oldukları doğrulandı. Delesyonlu suşlar daha önce üretici kurum tarafından açıklandığı şekilde elde edilmiştir (Brachmann ve ark. 1998).

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşları ve ilgili genotipler.

ST Lab Kodu	Genotipi ve ilgili mutasyonlar	EUROSCARF Kod'u
YST124	MATa, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0.	Y00000 (BY4741)
YST159	MATa, ura3Δ0; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; YDR477w::kanMX4 (Δsnf1 mutantı)	Y14311
YST240	MATa, ura3Δ0; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; YLR113w::kanMX4 (Δhog1 mutantı)	Y02724

YPD petrilerinde üretilen maya suşlarından steril şartlarda kürdan ile bir miktar örnek alınarak uzun süreli saklamak için 1 ml %20'lik gliserol içeren mikrofüj tüplerinde süspanse edildikten sonra –80 °C'de depo edildi. Normal veya zengin besiyeri olarak da adlandırılan YPD (Yeast Extract, Peptone, Dextrose) ortamında üretilen maya suşları tez deneyleri sırasında sıvı kültür başlatmak için +4 °C'de buzdolabında muhafaza edildi. *S. cerevisiae* suşlarının üretilmesinde kullanılan besiyeri içerikleri ve bu besiyerlerinin hazırlanmasında uygulanan standart yöntemler tarafından açıklandığı şekilde yapıldı (Rose ve ark. 1990). Araştırma kullanılan besiyeri içerikleri ve diğer çözeltilerin hazırlanması Ek 1'de verildi.

3.2. Raportör Gen Vektörlerinin Yapısı ve Transformasyonu

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

Hxt4-lacZ gen füzyonunda da *HXT4* geninin UAS bölgesinin 1605 bp'lik kısmı bulunmaktadır (Kruckeberg ve Bisson 1990, Theodoris ve ark. 1994). Bu bölgenin de *HXT4* gen füzyonunun glukoza bağlı olarak transkripsiyonunun kontrolü için yeterli olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Theodoris ve ark. 1994, Türkel ve Bisson 1999).

Çalışmamızda ayrıca kalsiyum sinyalinin *TPS1* geni transkripsiyonu üzerine etkisi de incelenmiştir. *TPS1* geni promotor bölgesinin 1kbp'lik bölümü bulunmaktadır. Aynı

şekilde Tps1-LacZ gen füzyonu kullanılmış olup daha önceki araştırmalarda hazırlanmış plazmitdir. Bu yöntem kısaca aşağıda özetlendiği şekilde uygulandı.

Maya suşları standart şartlar olarak adlandırılan 30 C’de 140 devir/dk dönüş hızında inkübatörde bir gece üretildi. Ertesi sabah bu maya suşlarından 20 ml’lik YPD besiyerine 500 ml ekim yapıldı ve maya suşları tekrar standart şartlarda logaritmik aşamaya kadar (yaklaşık $OD_{600} = 1-1.5$) üretildi. Bu aşamada maya kültürleri masaüstü santrifüjde 1600 rpm’de 5 dk çöktürüldü ve 25 ml steril saf suda suspanse edildi tekrar aynı hızda çöktürüldü. Sıvı faz atıldı, maya pelletleri bu kez 1 ml steril 0.1M lityum asetat çözeltisinde suspanse edilerek mikrofüj tüplerine alındı. Bu kez maya süspansiyonları 12500 rpm’de 1 dk çöktürüldü sıvı faz atıldı. Maya pelletleri bu kez 500 µl 0.1M Lityum asetat’da suspane edildi. Bu maya süspansiyonlarından mikrofüj tüpüne 50 µl alınarak üzerine aşağıda verilen miktarda ve sırada transformasyon çözeltileri ve plazmit DNA’sı ilave edildi.

240 µl PEG (%50’lik stoktan)

36 µl 1 M LiAOc (taze stok)

6 µl denatüreHerring sperm DNA’sı

4-5 µl (1-2 µg) plazmid DNA’sı

64 µl dsH₂O

Toplam hacim 350 µl olacak şekilde steril saf su eklendi.

Elde edilen transformasyon karışımı vorteksle karıştırıp önce 30 C’de 30 dk, daha sonra 42 C’de 20 dk bekletildi. Daha sonra transformasyon karışımı mikrofüjde 12500 rpm’de 30 sn çöktürüldü. Sıvı faz atıldı. Pellet olan maya hücreleri 500 µl stersil saf suda suspanse edildi. Bu transformant maya süspansiyonlarından Sc-Ura+%2 dekstroz içeren petrilere steril cam baget ile 100 µl yayma ekimi yapıldı. Petrilerin yüzeyleri kuruduktan sonra 30 C’de etüvde transformants maya kolonileri gelişinceye kadar inkübe edildi. Koloniler 1-2 mm çapında geliştikten sonra tekrar Sc-Ura+%2 dekstroz içeren petrilere 0.5 cm ebatlarında pasajlar yapıldı. Bu pasajlar da 30 C’de 2-3 inkübe edildi. Pasaj yapılan maya transformantları bir sonraki aşmada sıvı kültürlerin hazırlanmasında stok

olarak kullanıldı. Transformant petri ler deneyler süresince +4 C’de buzdolabında bekletildi.

3.3. Kalsiyum Sinyal Yolağının Aktivasyonu

HXT2, *HXT4*, *TPS1* promotor aktivitesine kalsiyum sinyal yolağının etkisini belirlemek için önce maya transformantları 10 ml Sc-Ura+%2 dekstroze içeren seçici üreme ortamında ikişerli olarak logaritmik aşamaya kadar üretildi. Log aşamasında maya kültürleri 5’er ml’lik iki kısma bölündü. Bir bölümü normal koşullarda üreme ortamında inkübe edildi. Maya kültürlerinin ikinci 5’er ml’lik kısımlarına ise son konsantrasyonları 100 mM olacak şekilde (stok 2M) kalsiyum klorür ilave edildi ve maya kültürleri 4-5 saat standart üreme şartlarında üremeye bırakıldı. Üreme süresi sonunda maya kültürleri masa üstü santrifüjde 1600 rpm’de 5 dk çöktürüldü, sıvı faz atıldı. Maya pelletleri 1 ml steril saf suda süspansiyon edilerek steril mikrofüj tüplerine aktararak tekrar 12500 rpm’de 1 dk çöktürüldü, sıvı faz atıldı. Maya pelletleri bir sonraki aşamada β -galaktozidaz aktiviteleri tayini için 200 μ l β -galaktozidaz lizis tampon çözeltisinde süspansiyon edildi. Daha sonraki aşamalarda β -galaktozidaz aktivitesi tayini için ise maya süspansiyonları -80 C’de derin dondurucuda bekletildi. *HXT2*, *HXT4* yüksek afiniteli glukoz taşıyıcılarıdır. *HXT2*, *HXT4*, *TPS1* genlerine kalsiyum sinyal yolağının derepres koşullarda etkisini analiz etmek için yukarıda açıklanan şekilde üretilen maya kültürleri logaritmik aşamada masa üstü santrifüjde 1600 rpm’de 5 dk çöktürüldü sıvı faz atıldı. Maya pelletleri 10 ml steril saf suda süspansiyon edilerek tekrar aynı şekilde santrifüjde çöktürüldü, sıvı faz atıldı. Maya pelletleri derepres üreme koşulları için Sc-Ura+%0,1 dekstroze üreme ortamında süspansiyon edildi. Bu şekilde hazırlanan maya kültürlerinin bir kısmına yukarıda açıklanan şekilde kalsiyum klorür uygulandı.

3.4. Gen Füzyonlarından Transkripsiyon Aktivitesi Tayini

Yukarıda açıklandığı şekilde normal ortamda veya kalsiyum stresi uygulanmış ortamda üretilen maya transformantları üreme periyodu sonunda masa üstü santrifüjde 1600 rpm’de 5 dk çöktürüldü. Çöktürülen maya pelletleri 1 ml steril distile suda süspansiyon edilerek mikrofüj tüplerine aktarıldı ve tekrar bu kez 12500 rpm’de 1 dk çöktürüldü. Sıvı faz atıldı,

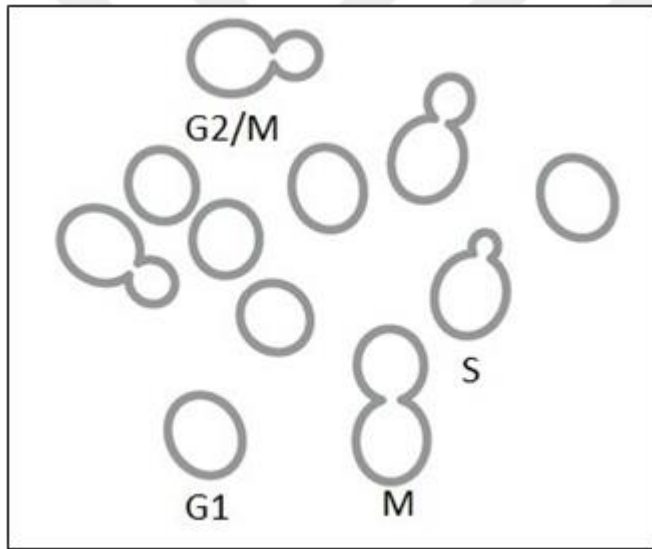
maya pelletleri 200 µl β-galaktozidaz süspansiyon çözeltisinde (β-Gal break buffer) süspanse edildi (Rose ve ark. 1990). Bu maya süspansiyonları enzimatif aktivitenin tayin edileceği aşamaya kadar -80 C`de depo edilebilir. Maya süspansiyonlarına maya hücrelerini β-galaktozidaz enzimini denatüre etmeden permeabilize edecek miktarda daha önce verilen miktarlarda SDS ve kloroform ilave edildi. Bu miktarlar %0,1`lik SDSden 20 µl ve stok kloroformdan da 20 µl`dir. SDS ve kloroform ilave edilen maya süspansiyonları yaklaşık 1 dk vortekslenerek maya lizatları elde edildi. Bu maya lizatlarından 3lü takımlar olarak 980 µl Z-buffer içeren test tüplerine 20`şer µl maya lizatı ilave edildi ve yavaşça karıştırıldı. Bu aşamada deney tüpleri 30 C sıcak su banyosuna koyularak 2 dk bekletildi. Bekleme süresi sonunda tüplere β-alaktozidaz substratı olan ONPG çözeltisinden 200 µl ilave edildi ve reaksiyon başlama zamanı kromometrede kayıt edildi. Reaksiyon ortamı açık sarı renge dönüştüğünde tüplere 500 µl 1M sodyum karbonat ilave edilerek reaksiyonun durması sağlandı. Deney tüpleri 1600 rpm de 5 dk santrifüj edilerek tüplerdeki maya lizatlarının çökmesi ve berrak sarı çözelti elde edilmesi sağlandı. Tüplerdeki reaksiyon çözeltisi spektrofotometre küvetlerine aktarılarak 420 nm`de absorbansları okunarak kayıt edildi. Enzim aktivitelerini normalize etmek için maya lizatlarında protein konsantrasyonları tayin edildi.

Protein konsantrasyonu tayini daha önce açıklandığı şekilde Lowry metodu ile yapıldı (Lowry ve ark. 1951). β-galaktozidaz ve Lowry deneyleri için kullanılan çözeltilerin hazırlanması da Ek.1`de verildi. β-galaktozidaz aktiviteleri dakikada mg çözünür protein başına hidroliz edilen nmol ONPG olarak verildi (nmol ONPG/dakika/mg protein). β -galaktozidaz deneyleri üç tekrarlı olarak yapıldı. Maya transformantları da en az iki tekrarlı olarak üretildi. Bu nedenle sonuçlar bölümünde verilen aktivite değerleri en az altı bağımsız deneyin ortalamasıdır. Aktivite hesapları Ek.2`de verilen formüle göre Excel tabloları hazırlanarak yapıldı.

3.5. Kalsiyum Sinyalinin Mitotik İndekse Etkilerinin Tayini

Kalsiyumun hücre döngüsü aşamalarına ve mitoz geçiren hücre oranına (mitotik indekse) etkileri de yaban tip, Δsnf, ve Δhog1 mutant hücrelerinde fenotipik olarak incelendi. Normal üreme ortamı olan 10 ml YPD`de logaritmik aşamaya kadar üretilen maya suşları

bu aşamada 5'er ml'lik iki kısma bölündü. Bir kısmına son konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde steril CaCl₂ eklendi ve standart üreme koşullarında 4 saat inkübe edildi. Bekleme süresi sonunda maya kültürlerinden direkt olarak 25-50 µl kadar numune alınarak ışık mikroskopunda 10x40 büyütme ile incelendi. *S. cerevisiae* hücrelerinin farklı hücre döngüsü aşamalarındaki fenotipik görüntülerinin tayini ve hücre döngüsü aşamalarına karar vermek için Şekil 3.1'de verilen fenotipik referanslar temel alındı. Bu fenotiplerde tomurcuk içermeyen hücreler G1, tomurcuk uzunlukları eşit olan ana ve yavru hücreler mitoz, tomurcuk uzunluğu ana hücre uzunluğunun yaklaşık 2/3 kadarı olan hücreler G2 ve tomurcuk başlangıcı ise hücre döngüsünün S fazı olarak kabul edilmektedir. Mitotik indeks değerleri görüntü alanında sayılan 100 maya hücresinden mitoz aşamasında olanların % oranı olarak verildi.



Şekil 3.1. *S. cerevisiae* hücre döngüsü aşamalarının şematik gösterimi. Hücre döngüsü analizinde referans olarak kullanılan *S. cerevisiae* fenotiplerinin şematik gösterimi.

3.6. Kalsiyum Sinyalinin Hücre Üremesine Etkilerinin İncelenmesi

Kalsiyumun *S. cerevisiae* suşlarının üreme hızına etkileri yaban tip *S. cerevisiae* (BY4741) kültürlerinin 100 mM kalsiyum içeren ve içermeyen sıvı kültürde üreme değerlerinin (OD600 değerlerinin) ikilenme sürelerine uygun zaman aralıkları ile spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile tayin edildi. Bunun için 10 ml YPD ortamında gecelik ön kültürler hazırlandı. Ertesi sabah 100 mM kalsiyum içeren ve içermeyen taze

10 ml YPD kültürlerine ikişerli olarak başlangıç OD₆₀₀ değerleri ortalama 0.25 olacak şekilde ön kültürlerden ekim yapıldı, başlangıç OD₆₀₀ değerleri 0 zaman olarak kayıt edildi. Bu maya kültürleri standart koşullarda (30 C, 140 rpm dönüş hızı/dakika) çalkalamalı inkübatörde üremeye bırakıldı ve maya hücrelerinin ikilenme süresi olan her 90 dakikada bir 100 µl örnek alınarak maya kültürlerinin OD₆₀₀ değerleri tayin edildi. Elde edilen OD₆₀₀ değerlerinin ortalamaları ve standart sapma değerleri de hesap edilerek örnek alınan zaman aralıklarına göre grafiğe aktarıldı ve üreme eğrileri elde edildi. Elde edilen üreme eğrileri sonuçlar bölümünde verildi.

3.7. Kalsiyum Sinyalinin Glikojen Birikimine Etkilerinin İncelenmesi

Kalsiyum sinyalinin depo karbonhidratı olan glikojen birikimine etkisi kalitatif olarak petri testleri ile belirlendi (Chester 1967). Bunun için 100 mM veya 200 mM kalium içeren YPD petrileri hazırlandı. Yaban tip, *snf1Δ* ve *hog1Δ* mutants suşları normal 10 ml YPD sıvı besiyerinde logaritmik aşamaya kadar standart şartlarda üretildi. Bu aşamada maya kültürlerinin OD₆₀₀ değerleri spektrofotometrede ölçüldü ve bütün maya kültürlerinin OD₆₀₀ değerleri 2 olacak şekilde steril YPD besi kullanılarak ayarlandı. OD₆₀₀: 2 olan sıvı maya kültürlerinden her defasında 10X seyreltilecek şekilde 5 seri seyreltme yapıldı. Bunun için steril mikrofüj tüplerine 900 µl YPD besiyeri alındı ve stok kültürden 100 µl alınarak tüpten tübe de 100er µl aktararak seyreltmeler hazırlandı. Bu seyreltilen maya kültürleri normal YPD, ortamına ve farklı konsantrasyonlarda kalsiyum içeren YPD petrilere her seyreltmeden 4er µl olacak şekilde damla ekimi yapıldı. Petri yüzeylerinin oda sıcaklığında kuruması beklendi. Petriler 30 C etüvde 48 saat bekledikten sonra fotoğraflandı. Maya kolonilerinde biriken glikojen miktarının tayini için ise petri kapaklarına 3 numara Whatman kağıdı yerleştirildi. Bu kağıtların üzerine filtre kağıtlarını ıslatacak kadar (yaklaşık 5 ml kadar) lügol çözeltisi konuldu. Daha sonra lügol ile ıslatılmış petri kapaklarına maya kolonilerini içeren petriler kapatılarak 20 dk kadar beklendi. Bekleme süresi sonunda maya kolonilerinin fotoğrafları alınarak kayıt edildi.

3.8. *HXT2*, *HXT4*, ve *TPS1* Genleri Promotorlarının Biyoinformatik Analizi

HXT2, *HXT4* ve *TPS1* genleri transkripsiyonları çok sayıda transkripsiyon faktörü tarafından kontrol edilmektedir. Bu analizler için YEASTRACT veri tabanına kayıtlı olan ve farklı araştırmacılar tarafından çeşitli teknikler kullanılarak (Micro-array, ChiP, İkili hibrid, vd) *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1* genleri ekspresyonunda işlevi olduğu rapor edilen transkripsiyon faktörleri incelendi. Kalsiyumla aktive edildiği bilinen transkripsiyon faktörü Crz1p'nin *S. cerevisiae* genomunda bağlandığı deneysel olarak gösterilen sekans bilgileri de YEASTRACTdan derlenerek çizelge 3.2`de verildi. Crzpnin *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1* genlerinin promotor bölgelerindeki bağlanma dizileri belirlenerek sonuçlar bölümünde verildi. Snf1p ve Hog1p kinazlarının hedef substratları SGD (*Saccharomyces cerevisiae* Genome Data Base) veri tabanı kullanılarak analiz edildi. İnceleme sonuçları bölüm 4`de bulgular olarak verildi.

Çizelge 3.2. Crz1p transkripsiyon faktörünün bazı bağlanma dizileri. İnceleme için internet köprüleri açık bırakılmıştır (Anonim 2020b).

Crz1p	GAATGGCTG	TRANSFAC	MEME	View
Crz1p	GGGTGGCTG	TRANSFAC	MEME	View
Crz1p	GNGGCKCA	TRANSFAC	MEME	View
Crz1p	GGGGCTG	TRANSFAC	MEME	View
Crz1p	GAGCCC	TRANSFAC	MEME	View
Crz1p	CAGCCAC	TRANSFAC	MEME	View

4. BULGULAR

4.1. Kalsiyum Sinyalinin *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1* Transkripsiyonuna Etkileri

HXT2 ve *HXT4* *S. cerevisiae*'da glukoz transportu için membranda yer alan glukoz farklı afinitelerde olan transporter kanallarından ikisini kodlayan genlerdir. *HXT2* ve *HXT4*'ün transkripsiyonu glukoz baskılaması ile de kontrol edilir, bazal seviyede oldukça yüksek miktarda transkripsiyonları yapılır. *TPS1* ise depo ve stres karbonhidratı olan trehalozun biyosentezinde yer alan trehaloz fosfat sentaz enzim kompleksindeki alt birimi kodlar. Bu genlerin bazal seviyedeki transkripsiyonlarına kalsiyum sinyalinin etkisi incelendiğinde bazal transkripsiyonlarının kalsiyum uyarımı ile en az 2-3 kat aktive edildiği bulundu (Çizelge 4.1). Bu genler glukoz baskılaması ile de kontrol edildiğinden kalsiyum sinyalinin bu genlere olan etkisi glukoz baskılamasının olmadığı derepres koşullardaki etkisi de incelendi.

Çizelge 4.1. Kalsiyum Sinyalinin yaban tip maya suşunda repres şartlarda *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1*'de transkripsiyona etkileri. * β -Galaktozidaz aktiviteleri nmol ONPG/dakika/ mg protein olarak verilmiştir. $\pm$ SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir.

Gen Füzyonları	Gen Füzyonları ve β -Galaktozidaz Aktiviteleri*($\pm$ SD)	
	Normal Ortam	+100 mM Ca^{+2}
<i>HXT2</i> -LacZ	2295 $\pm$ 42	5989 $\pm$ 43
<i>HXT4</i> -LacZ	1028 $\pm$ 4	3488 $\pm$ 716
<i>TPS1</i> -LacZ	4992 $\pm$ 161	9847 $\pm$ 200

Bunun için düşük glukoz içeren ortama aktarılan yaban tip maya suşunun *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1* transformantları kalsiyum stresi uygulanan ve uygulanmayan ortamlarda üretildi. Elde edilen sonuçlar kalsiyum stresinin derepres koşullarda bu genler üzerine etki etmediğini göstermektedir (Çizelge 4.2). Repres koşullardan derepres koşullara geçişte *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1* geni transkripsiyonlarında ortalama 2-kat artış olduğu görüldü (Çizelge 4.2). Fakat derepres koşullarda üretilen maya transformantlarına

kalsiyum stresi uygulandığında transkripsiyonların daha fazla aktive edilmediği görüldü (Çizelge 4.2). Bu durum kalsiyum stresi ile aktive edilen transkripsiyon faktörlerinin *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1* genlerinde bazal transkripsiyon durumundaki promotor yapısına etki ettiğini göstermektedir. Derepres koşullara ek olarak, maya suşları fermente edilemeyen karbon kaynağı olarak gliserol içeren ortamda üretilip bu durumda kalsiyum stresinin etkisi de test edildi.

Çizelge 4.2. Kalsiyum Sinyalinin yaban tip maya suşunda derepres şartlarda *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1*'de transkripsiyona etkileri. Birim tanımları çizelge 4.1'de verildiği şekildedir.

Gen Füzyonları	Gen Füzyonları ve β -Galaktozidaz Aktiviteleri*($\pm$ SD)	
	Normal Ortam	+100 mM Ca^{+2}
HXT2-LacZ	5983 $\pm$ 301	6872 $\pm$ 167
HXT4-LacZ	5838 $\pm$ 336	7782 $\pm$ 357
TPS1-LacZ	9813 $\pm$ 283	11311 $\pm$ 653

Glukoz sinyalinin bağımsız olarak kalsiyum sinyalinin *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1* genleri transkripsiyonuna etkileri ise maya transformantlarını karbon kaynağı olarak %2 gliserol içeren tam besiyerinde üreterek tayin edildi (Çizelge 4.3). *HXT2* ve *HXT4* genleri ana aktivatör faktörü Rgt1p olup düşük glukozda aktif bir transkripsiyon faktörü olduğu bilinmektedir. Rgt1p non-fermentatif koşullarda yani glukozun olmadığı ortamda aktif değildir. Gliserol ortamında üretilen mayalarda bu genlerin transkripsiyonu Rgt1pden bağımsız olan transkripttir. Rgt1p nin aktif olmadığı gliserol içeren ortamda üretilen maya transformantlarında kalsiyum stresi uygulamasının bu genlerde farklı seviyelerde aktivasyona yol açtığı görüldü (Çizelge 4.3). Non-fermentatif olarak üretilen maya suşunda kalsiyum sinyaline yanıt olarak *HXT2* geni yaklaşık 2-kat aktive edilirken, *HXT4* ve *TPS1* genlerinde aynı seviyede aktivasyon görülemedi. Bu şekilde kalsiyum sinyal iletim yolağına ve kalsiyum stresine bağlı olarak aktive edilen faktörlerin repres, derepres ve non-ferementatif üreme koşullarında araştırmada incelenen promotorlara farklı şekillerde etki ettikleri bulundu.

Çizelge 4.3. Kalsiyum Sinyalinin yaban tip maya suşunda non-ferementatif şartlarda *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1*'de transkripsiyona etkileri. Birim tanımları çizelge 4.1'de verildiği şekildedir.

Gen Füzyonları	Gen Füzyonları ve β -Galaktozidaz Aktiviteleri*($\pm$ SD)	
	Sc-Ura +%2 Gliserol Ortamı	+100 mM Ca^{+2}
<i>HXT2</i> -LacZ	1341 $\pm$ 240	2552 $\pm$ 140
<i>HXT4</i> -LacZ	1689 $\pm$ 117	2674 $\pm$ 38
<i>TPS1</i> -LacZ	3120 $\pm$ 86	5642 $\pm$ 43

4.2. Protein kinaz Snf1'in *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1*'de transkripsiyona etkileri

Yaban tip maya suşunda farklı üreme koşullarında (repres, derepres ve non-fermentatif) kalsiyum stresinin etkileri test edildikten sonra *S. cerevisiae*'de kalsiyum iyon stresleri ile de aktive edildiği bilinen protein kinaz olan Snf1p'nin kalsiyum stresi koşullarında *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1* geni transkripsiyonun kontrolünde yer alıp almadıkları da test edildi. Bunun için *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1* gen füzyonlarını içeren raportör vektörler Snf1p kinazı içermeyen (Δ snf1) mutant suşlara transform edildi. Kalsiyum stresinin en önemli etkisinin bazal seviyedeki transkripsiyona olduğu bulunduğundan bu suşta derepres ve non-fermentatif koşullar test edilmedi. Yapılan deneylerde Δ snf1 mutant suşunda kalsiyum stresine yanıt olarak *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1* genleri transkripsiyonunda yine yaban tip suşta olduğu gibi önemli seviyede aktivasyon olduğu bulundu (Çizelge 4.4). Ancak, beklenmedik bir şekilde *HXT2* ve *TPS1* genleri transkripsiyonlarının Δ snf1 mutant suşunda normal koşullarda yaban tip suşta görülen transkripsiyon sevieleri ile karşılaştırıldığında yaklaşık 2- kat azaldığı görüldü (Çizelge 4.4). *HXT4* geni transkripsiyonu bazal seviyesinin ise snf1 Δ mutasyonundan etkilenmediği görülmektedir. Bu mutant suşa kalsiyum stresi uygulaması sonucu ise *HXT2* geni transkripsiyonunda 2-kat, *TPS* geni transkripsiyonunda da yaklaşık 4-kat aktivasyon olduğu bulundu. Bu durum bir çeşit AMP aktive edilen protein kinaz olan Snf1p'nin *HXT2* ve *TPS1* genleri bazal transkripsiyonları için gerekli olmakla birlikte kalsiyum sinyaline yanıt oluşumunda yer almadığını göstermektedir (Çizelge 4.4). Snf1p kinaz aktivitesinin *HXT4* transkripsiyonu için ise gerekli olduğu elde edilen sonuçlarda

görülmektedir. Snf1p aktivitesinin kalsiyum iyonlarınca oluşturulan alkali strese yanıt olarak aktive edildiği bilinmektedir (Hong ve Carlson 2007).

Çizelge 4.4. Snf1'in *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1*'de repres şartlarda transkripsiyona etkileri. Birim tanımları çizelge 4.1'de verildiği şekildedir.

Gen Füzyonları	Gen Füzyonları ve β -Galaktozidaz Aktiviteleri*($\pm$ SD)	
	Normal Ortam	+100 mM Ca^{+2}
HXT2-LacZ	1182 $\pm$ 86	2679 $\pm$ 295
HXT4-LacZ	1087 $\pm$ 71	1272 $\pm$ 298
TPS1-LacZ	2897 $\pm$ 190	10863 $\pm$ 2445

4.3. Kalsiyum Sinyalinin Hücre Bölünmesine ve Morfolojisine Etkileri

S. cerevisiae hücrelerinin hangi hücre döngüsü aşamasında oldukları herhangi bir ara işlem (boyama, floresans etiketleme, antikor bağlanması vd gibi) gerektirmeden direkt olarak ışık mikroskopunda canlı hücrelerde görüntülenebilir. Şekil 3.1'de verilen hücre döngüsü aşamalarına ait fenotipik referanslar kullanılarak yapılan incelemede araştırmada uygulanan konsantrasyonda kalsiyumun yaban tip BY4741 maya suşunda mitotik indeksde %3 kadar azalmaya neden olduğu ancak G1 aşamasında bulunan hücre oranını ise oldukça azalttığı görüldü (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6). Snf1p kinazın kalsiyum iyonlarının oluşturduğu alkali strese yanıt için gerekli olduğu daha önce açıklanmıştır. Hog1p kinaz ise sodyum iyon stresi ile aktive edilen ve sodyum iyon stresine yanıt için gerekli olan protein kinazdır. Bu nedenle kalsiyum stresinin bu kinazları içermeyen mutant suşlara etkisi de incelendi.

Yapılan çalışmada senkronize maya kültürü kullanılmamasına rağmen kalsiyum stresinin hücre döngüsü ve mitotik indekse etkisi olduğu görülmektedir. Özellikle Δsnf1 mutantsu suşunda kalsiyum stresine yanıt olarak mitotik indeksin normal seviye olan %13'den %2'ye gerilediği, hücrelerin ağırlıklı olarak G1 aşamasında hücre döngüsünde durduğu görüldü (Çizelge 4.5, 4.6 ve Şekil 4.1, 4.2). Sodyum stresi için gerekli olan

Hog1p kinazın kalsiyum stresi için gerekli olmadığı da bulundu. $\Delta hog1$ mutant susunda mitotik indeksin yaban tip maya suşuna benzer oranda olduğu görüldü (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Kalsiyumun mitotik indekse etkisi.

Üreme Ortamı	Yaban tip	$\Delta snf1$	$\Delta hog1$
Normal ortam	%19 $\pm$ 2	%13 $\pm$ 4	%20 $\pm$ 4
+100 mM Ca ⁺²	%16 $\pm$ 4	%2 $\pm$ 4	%15 $\pm$ 5

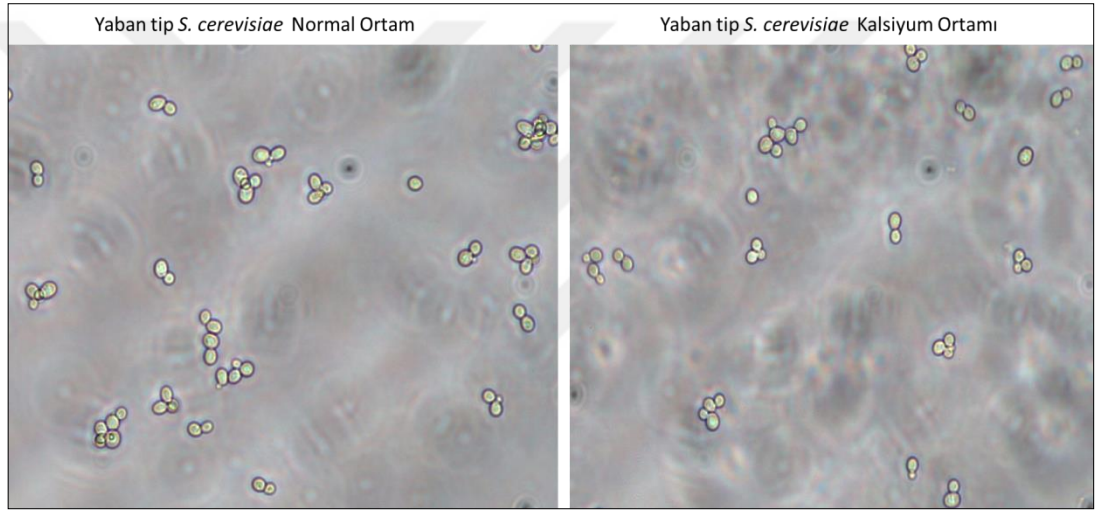
Çizelge 4.6. Kalsiyumun hücre döngüsüne etkisi. Çizelgede G1 aşamasında olan hücrelerin % değerleri verilmiştir.

S. cerevisiaesusları	% G1 aşaması hücre oranı
Yaban tip	%4 $\pm$ 1
$\Delta snf1$	%50 $\pm$ 3
$\Delta hog1$	%4 $\pm$ 1

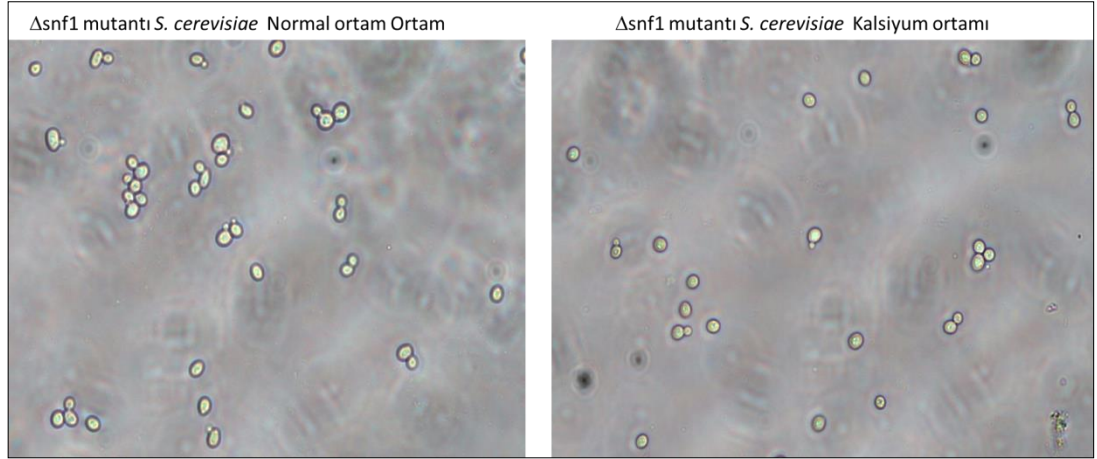
Kalsiyum sinyal yolağının hücre döngüsüne etkileri incelendikten sonra bu sinyal yolağının hücre morfolojisinde (hücrede büyüme, anormal veya çoklu tomurcuklanma, uzamış sitokinez/telofaz bağlantısı vd gibi) herhangi bir anomaliye yol açıp açmadığı da mikroskobik olarak incelendi. Normal ortamda ve kalsiyum stresi uygulanmış üreme ortamlarında üretilen yaban tip ve $\Delta snf1$ mutantı maya suşlarının mikroskobik görüntüleri incelendi. Yapılan incelemelerde kalsiyum stresinin yaban tip maya hücrelerinin morfolojisinde önemli derecede bir anomaliye neden olmadığı görüldü (Şekil 4.1). Ancak, kalsiyum stresi uygulanmış yaban tip maya hücrelerinin daha küçük olduğu görüldü. Fakat kesin sonuç için daha detaylı mikroskobik analizlerle (örneğin elektron mikroskobu ile) hücre boyutlarının hem G1 ve hem de diğer bölünme aşamalarında ölçülmesi gerektiği sonucuna varıldı.

Hücre boyutlarında kalsiyum stresine bağlı anomali olup olmadığı $\Delta snf1$ mutantı maya suşlarında da mikroskobik olarak tayin edildi. Normal koşullarda üretilen $\Delta snf1$ mutantı

maya hücrelerinde ana hücrelerin yaban tip hücrelere göre daha büyük olduğu dikkat çekmektedir (Şekil 4.2). Kalsiyum stresi uygulanmış hücrelerin morfolojileri incelendiğinde direkt olarak G1 aşaması hücrelerinin çoğunlukta olduğu görüldü. Hücre morfolojilerinde ise uygulanan teknikle tayin edilebilir bir farklılık görülmedi. Ancak hücre büyüklüklerinin yaban tip maya suşuna göre daha kantitatif tayini için hücre büyüklüklerinin daha hassas görüntüleme tekniği ile ölçülmesi ve senkronize hücre kültürleri ile çalışılması gerektiği sonucuna varıldı. Yapılan incelemelerde çoklu tomurcuklanma veya budneck uzaması (telofazda sitokinez aşaması) gibi anomaliler incelenen hücrelerde görülmedi.



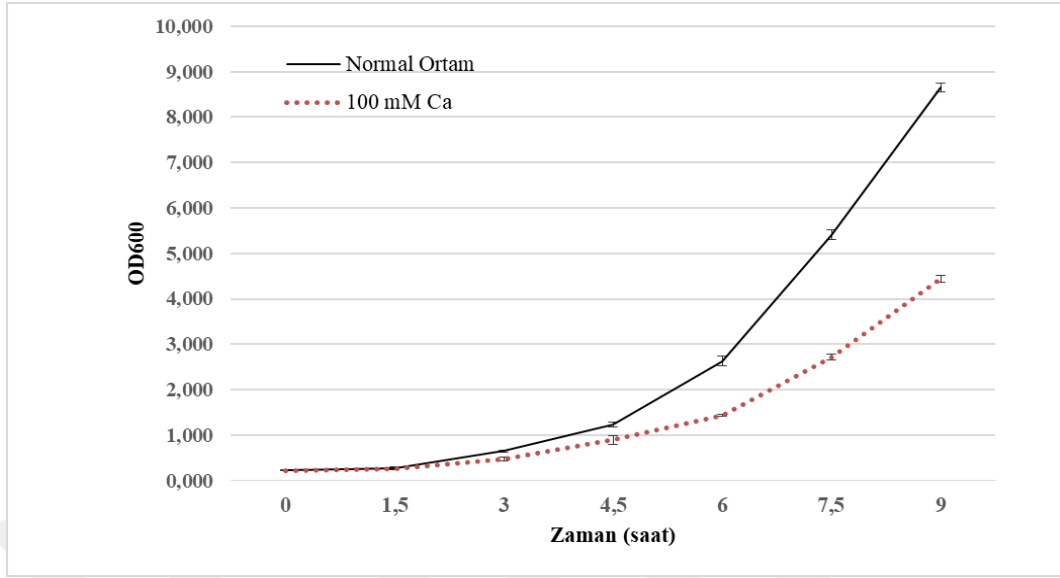
Şekil 4.1. Kalsiyum stresinin yaban tip *S. cerevisiae*'da hücre morfolojisine etkileri. Görüntü 10x40 ışık mikroskobu ile alınmıştır.



Şekil 4.2. Kalsiyum stresinin *snf1Δ* mutanđı *S. cerevisiae*’da hücre morfolojisine etkileri. Görüntü 10x40 ışıık mikroskobu ile alınmıştır.

4.4. Kalsiyum Sinyalinin Hücre Üremesine Etkileri

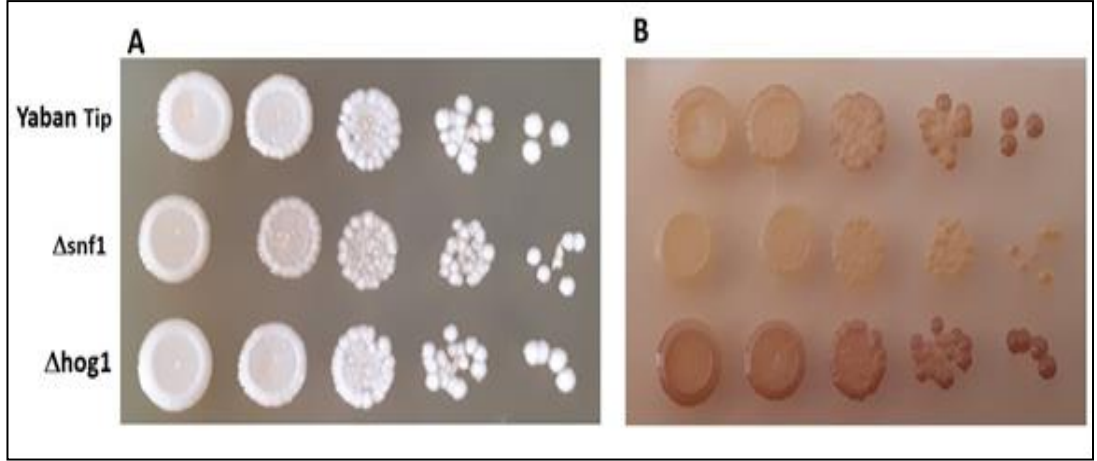
Kalsiyumun *S. cerevisiae* suşlarının üreme hızına etkileri yaban tip maya hücrelerinin standart koşullarda, kalsiyumlu ve kalsiyumsuz üreme ortamında üretilmesi ile tayin edildi (Şekil 4.3). Kalsiyumun hücre üremesini logaritmik aşamada önemli derecede yavaşlattığı görüldü. Normal ortamda üreyen mayaların bölünme sürelerinin ortalama 90 dk olduğu bulundu. Diğer taraftan kalsiyum içeren ortamda yaban tip maya hücrelerinin bölünme sürelerinin (ikilenme sürelerinin) ise yaklaşık 150 dk kadar olduğu yapılan ölçümlerden tayin edildi. Bu sonuç kalsiyumun hücrelerde üreme hızını yavaşlattığını ve bölünme süresini arttırdığını göstermektedir.



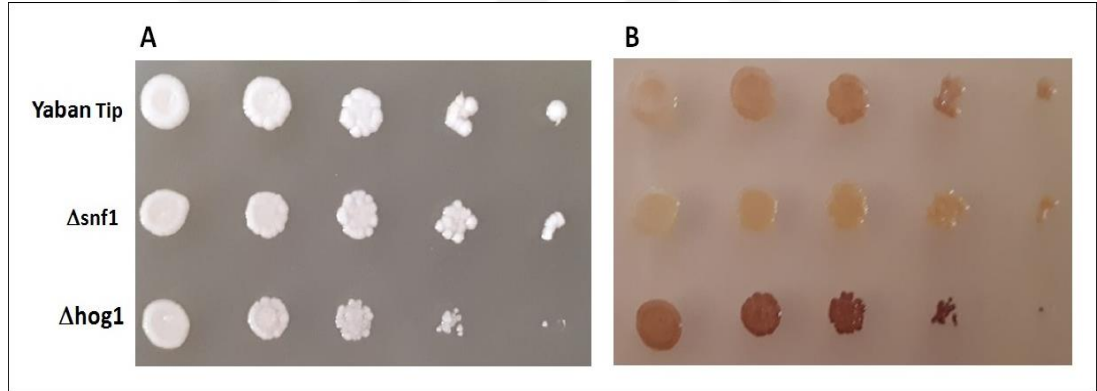
Şekil 4.3. Kalsiyum stresinin *S. cerevisiae*'nin üremesine etkileri.

4.5. Kalsiyum Sinyalinin Glikojen Biyosentezine Etkileri

S. cerevisiae'da hücre içine taşınan glukozun hücre üreme aşamasına göre metabolize edildiği önemli bileşiklerden birisi glikojendir. Kalsiyum sinyalinin maya hücrelerinde glikojen depolanmasına etkileri de kalitatif olarak petri testi ile tayin edildi. Logaritmik aşamaya kadar üretilen hücreler yukarıda bölüm 3.7'de açıklandığı şekilde seyreltmeler yapılarak normal YPD ve ayrıca 200 mM kalsiyum içeren üreme ortamlarına damla ekimi ile ekildi ve 30 C'de 48 saat inkübe edildikten sonra hücrelerdeki glikojen miktarının kalitatif tayini için iyot boyama tekniği uygulandı. Sonuçlar incelendiğinde kalsiyum stresine yanıt olarak hem yaban tip ve hem de $\Delta hog1$ mutant suşunda çok fazla miktarda glikojen birikimi olduğu görüldü (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).



Şekil 4.4. Normal ortamda üretilen *S. cerevisiae*'da glikojen depolanma durumu. A paneli normal petri'yi, B paneli ise aynı petrinin iyot ile boyanmış fotoğrafını göstermektedir.



Şekil 4.5. Kalsiyum stresinin (200 mM) *S. cerevisiae*'da glikojen depolanmasına etkileri. A paneli 200 mM kalsiyum eklenmiş petri'yi, B paneli ise aynı petrinin iyot ile boyanmış fotoğrafını göstermektedir.

4.6. *HXT2*, *HXT4*, ve *TPS1* Genleri PromotorlarıYapısının İn-Silico Analizi

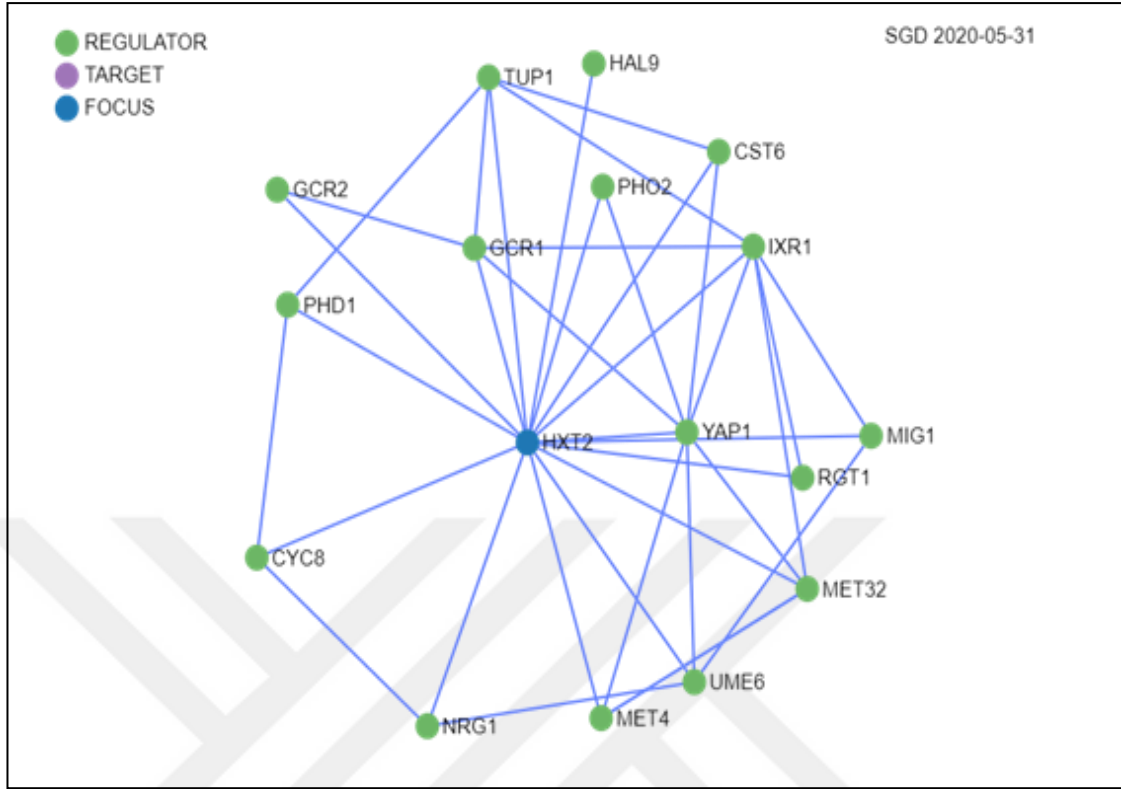
Crz1p'nin kalsiyum sinyaline yanıt olarak çeşitli genlerin transkripsiyonunu aktive ettiği daha önce yapılan çalışmalar ile tayin edilmiştir. Crz1p'nin bağlandığı promotor sekanslarına CDRE sekansı (calcineurin-dependentresponse element) adı verilmiştir. Crz1p'nin transkripsiyon faktörü olarak aktive ettiği genlerin promotor dizilerinde bağlandığı konsensüs nükleotid sekansları da (CDRE sekansları) YEASTRACT veri

tabanında kayıt altına alınmış olup Çizelge 4.9’da verilmiştir. Çalışmanın bu bölümünde *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1* genleri promotor sekanslarında CDRE konsensüs sekanslarının varlığı YEASTRACT veri tabanı kayıtlarında tarama yapılarak incelendi (Anonim 2020b).

Çizelge 4.7. Transkripsiyon faktörü Crz1p’nin YEASTRACT veri tabanına kayıtlı bağlanma sekansları ve ilgili genler. N: herhangi bir nükleotid, K: Guanin/timin olduğunu göstermektedir. (Anonim 2020b)

Konsensus bağlanma sekansı	İlgili genler	Kaynak
GAAT GG CTG	ENO1	Mendizabal vd., MolGenetGenomics, 2001 Jul; 265(5):801-811
GGGT GG CTG	ENO1	Mendizabal vd., MolGenetGenomics, 2001 Jul; 265(5):801-811
GNGGCKCA	Genom kapsamlı analiz (çok sayıda gen)	Yoshimoto vd., J BiolChem, 2002 Aug 23;277(34):31079-31088
GGGGCTG	HXT2	Ruiz vd., J Biol Chem, 2008 May 16;283(20):13923-33
GAGCCC	TRK1	Casado vd., FEBS Lett, 2010 Jun 3;584(11):2415-2420
CAGCCAC	PHO4, PHO80	Serra-Cardona vd., Mol Cell Biol, 2014 Dec;34(24):4420-4435

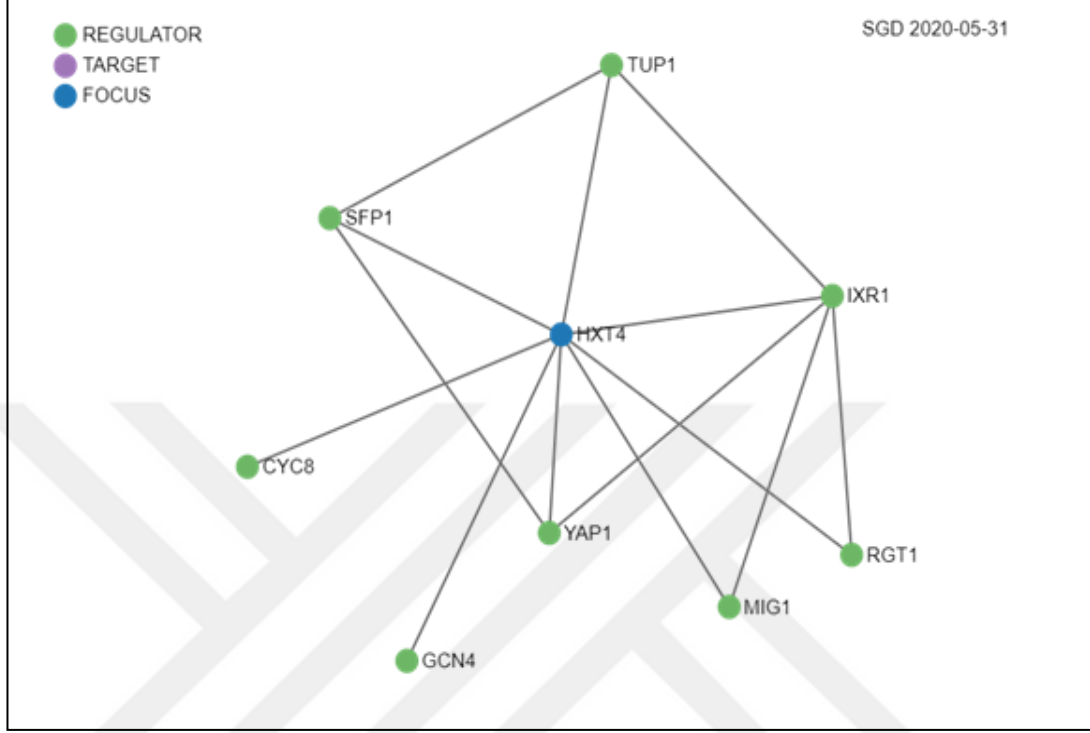
Crz1p’nin *HXT2* geni transkripsiyonunu kontrol ettiği ve Crz1p’nin *HXT2* promotoruna da bağlandığı daha önce açıklanmıştır (Ruiz ve ark. 2008). *HXT2* geninin rapor edilen transkripsiyonel regülatörleri SGD veri tabanından da incelendi (Şekil 4.7). Bu veri tabanında yer alan ve daha önce deneysel olarak doğrulanmış araştırma sonuçlarına göre *HXT2* geni transkripsiyonu da çoklu faktörler tarafından kontrol edilmektedir. Bu faktörlerden Yap1p, Ixr1p, ve Hal9p’nin stresle aktive edilen transkripsiyon faktörleri olduğu bilinmektedir. Özellikle Hal9p tuz stresine yanıt olarak aktive edilen transkripsiyon faktörüdür. Bu sonuçlar *HXT2* geni transkripsiyonunun kalsiyum stresi koşullarında Crz1p’ye ek olarak farklı transkripsiyon faktörlerince de aktive edildiğini öne sürmektedir.



Şekil 4.6. *HXT2* geni transkripsiyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörleri. (Anonim 2020a).

HXT4 geni promotor analizi yapıldığında ise YEASTRACT kayıtlarında direkt olarak Crz1p'nin *HXT4* promotoruna bağlanıp transkripsiyonel aktivasyonunda işlevi olduğuna ilişkin daha önce rapor edilmiş bir çalışma bulunmamıştır. Bu nedenle *HXT4* geni 1 Kbç'lik promotor bölgesi sekansı SGD veri tabanından kayıt edilerek Crz1p konsensüs bağlanma dizisi olup olmadığı incelendi. Yapılan incelemede *HXT4* promotor 1 Kbç'lik bölgesinde sadece 1 adet Crz1p core sekansı olduğu bu sekansın ise transkripsiyon başlama bölgesinden uzaklığı dikkate alındığında işlev olarak *HXT4* geni kontrolünde yer almasının zayıf bir olasılık olduğu değerlendirildi (Çizelge 4.10). YEASTRACT kayıtlarına ek olarak SGD veritabanı da *HXT4* geni transkripsiyonunu kontrol eden faktörler için kontrol edildi. Bu veri tabanında da *HXT4* geninin Crz1p tarafından kontrol edildiğine ilişkin bir kayıt bulunmadığı görüldü. Bu sonuçlara göre *HXT4* geninin kalsiyum sinyali ile aktivasyonunun Crz1p'den bağımsız olduğu varsayılmıştır. *HXT4* geni aktivasyonunun muhtemelen daha önce rapor edilen ve stres faktörleri olarak da

adlandırılan Yap1p, Ixr1p ve Sfp1p tarafından kalsiyum stresine yanıt olarak aktive edilebileceği düşünülmektedir (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. *HXT4* geni transkripsiyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörleri (Anonim 2020a).

Crz1p'nin *TPS1* geni promotor bölgesine bağlanıp bağlanmadığı da YEASTRACT kayıtlarından incelendi. Yapılan incelemede Crz1p'nin konsensüs bağlanma sekansı olan 5'-GAATGGCTG-3' dizisi temel alınarak değerlendirildiğinde *TPS1* geni promotorunun Crz1p tarafından kontrol edildiğine yönelik deneysel olarak doğrulanmış 3 farklı çalışma olduğu görüldü (Çizelge 4.10). Crz1p bağlanma ana sekansı (coresequence) temel alınarak yapılan karşılaştırmada *TPS1* geni ilk 1000bç'lik kontrol bölgesinde hem kodlama hem de komplementer dizide çok sayıda potansiyel Crz1p bağlanma sekansı olduğu bulundu (Çizelge 4.11). Bu bağlanma sekanslarından +752 konumunda yer alan sekans özellikle CDRE sekansına yüksek homoloji göstermektedir. Elde edilen analiz sonuçları *TPS1* geni transkripsiyonunun kalsiyum stresine yanıt olarak Crz1p tarafından aktive edilmiş olduğunu öne sürmektedir.

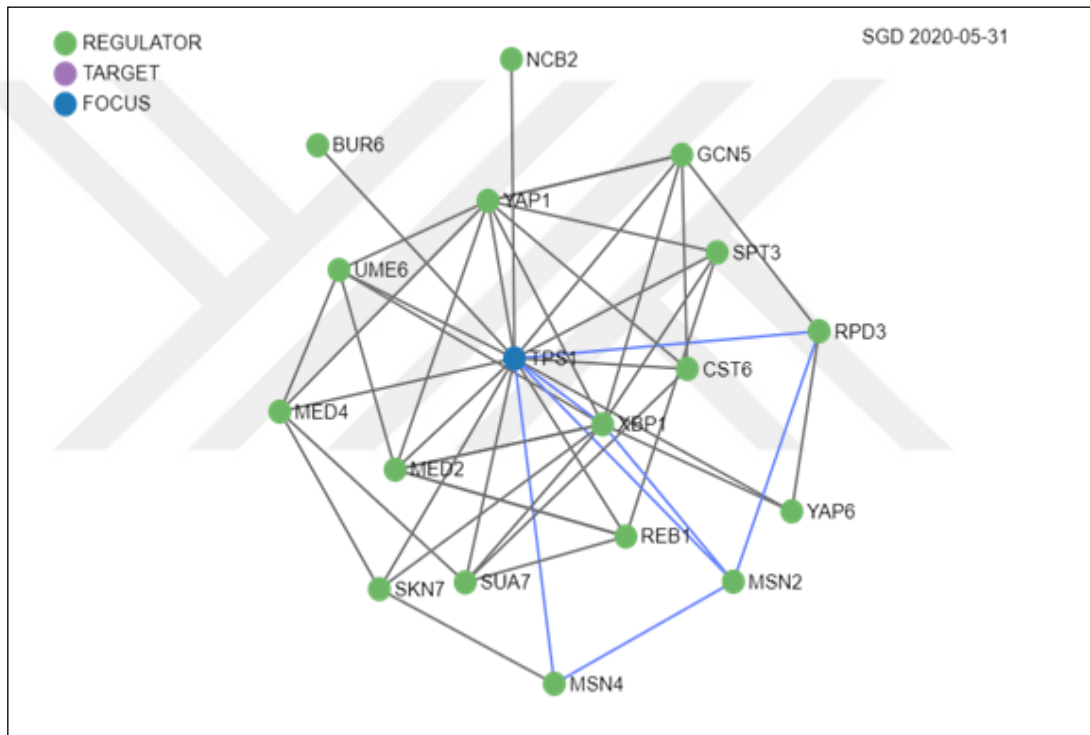
Çizelge 4.8. *TPS1* geni promotoruna Crz1p'nin bağlandığı konsensüs sekansını gösteren YEASTRACT kayıtları (Anonim 2020b).

TPS1 promotorunda Crz1p bağlanma sekansı	Analiz yöntemi	Kaynak
GGGTGGCTG	Yaban tip/ Δ crz1 mutant suşlarında Micro-array	Chua vd. ProcNatlAcadSci U S A, 2006 Aug 8;103(32):12045-12050
	Yaban tip suşta 0.2M Kalsiyum aktivasyonu ve ChIP-Seq	Ruiz vd., J BiolChem, 2008 May 16;283(20):13923-13933
	YPD ortamı, pH 8.0 (alkaline stres ve ChIP-Seq)	Roque vd., BMC Genomics, 2016;

1	CCCAAAGATT	CTTGATGAAT	TTTACGATAG	AGCC CAGAGAC	GATGCCGACG	AAGATGAAGA
61	AGATCCCGAC	ACAAGAAGCT	CCGGTAAGAA	GAAGGACGCC	AGCC AAGAAG	AATCTCTAAT
121	CTAAGAGGAC	GGTTGCTGAA	GAAAAA GGCT	TTTTTTATT	TGTCCGTTTT	TTTTTTGTAA
181	AACCCAAAGA	TCTGAATCTA	AAGCTTTTT	AAACGTATAT	AGATGTCTAC	ATGTGTGTTT
241	TTGTTTTTTT	ACGTACGTAT	ACCCACCTAT	ATATGCATAA	TCCGTAATTG	AAAAAAAAAA
301	AAGAAAAAGA	TCAAGGAACA	CATCACCTG	GGCACATCAA	GCGTGAGGAA	TGCCGTCCAA
361	CTGGTGGAGA	CGCTTGATTT	GCTCTTTTG	TTCTGGGTCC	AACCCGGTCT	CGAAGAACAT
421	CAGCACCACG	CCCGCAACGA	CAAAGAACAT	TGCAATACAC	TTGCATATGT	GAGCATAGTC
481	GAGCGGTCCG	TTCTGTGGTT	GATGCTGTTG	TTCTTTCTTC	TGTTTGTGAG	GGGTGATAGC
541	CATATCTTCG	TGCTCTTGTT	GCGATTGTTC	TGTTCCATCT	GCACCAGAAC	AAAGAACAAA
601	AGAACAAGGA	ACAAAGTCCA	AGCACGTCAG	CGCTGTTTAT	AAGGGGATTG	ACGAGGGATC
661	GGGCTAGAG	TGCCAGCGCG	CCAGGGAGAG	GG AGCC CCCT	GGGCCCTCAT	CCGCA GGCT G
721	ATAGGGGTCA	CCCCGCTGGG	CAGGTCAGGG	CA GGGGCTCT	CAGGGGGGCG	CCATGGACAA
781	ACTGCACTGA	GGTTCTAAGA	CACATGTATT	ATTGTGAGTA	TGT TATATATA	GAGAGAGATT
841	AAGGCGTACA	GCCGGGTGGT	AGAGATTGAT	TAAC TTGGTA	GTCTTATCTT	GTCAATTGAG
901	TTTCTGTGAG	TTTCTTCTTG	AACAAGCACG	CAGCTAAGTA	AGCAACAAAG	CAGGCTAACA
961	AACTAGGTAC	TCACATACAG	ACTTATTAAG	ACATAGAACT		

Şekil 4.8. *TPS1* geni 1 Kbp promotor bölgesinde Crz1p bağlanma sekanslarının incelenmesi.

YEASTRACT ve SGD veritabanlarında yapılan incelemelerde *TPS1* geni transkripsiyonunun kalsiyum stresine yanıt olarak aktivasyonunda Crz1p'nin işlevi olduğu görülmektedir. Ancak, *TPS1* aktivasyonunun stres koşullarında farklı faktörler tarafından aktive edildiği de SGD kayıtlarında açıklanmaktadır (Şekil 4.13). SGD kayıtlarına *TPS1* geninin stresle aktive edilen *YAP1*, *YAP6*, ve özellikle *Msn2/Msn4* gibi transkripsiyon faktörlerince de aktive edildiği görülmektedir. Bu nedenle kalsiyum stresine yanıt olarak *TPS1* promotorunun sadece Crz1p değil, çoklu faktörler tarafından aktive edildiği kabul edilebilir.



Şekil 4.9. *TPS1* geni transkripsiyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörleri (Anonim 2020a).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kalsiyumun biyometal iyonu olarak çok sayıda fizyolojik ve patolojik fonksiyonu bulunmaktadır. İnsanda bilinen etkilerinin başında kasılma, hücre bölünmesi, nörolojik işlevler, apoptoz vd sayılabilir (Dupont ve ark. 2011). Bu nedenle kalsiyumun hücre içine alınması depolanması ve hücrede çok iyi kontrol edilmelidir. Bütün hücrelerde önemli bir karbon ve enerji kaynağı da glukozdur. Glukozun da hücreye girişi ve hücrede farklı metabolik yollarda kullanımı oldukça kontrol edile bir işlemdir. Glukozun kontrolsüz hücreye taşınmasının hücre ölümüne yol açtığı, hücreye hiç alınmamasında letal etkileri olduğu bilinmektedir. Glukozun hücre içine taşınması da canlı türüne göre ve hücre türüne göre değişiklik gösterecek şekilde kontrol edilmektedir.

Araştırmamızda *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1* genlerinin bazal seviyedeki transkripsiyonlarına kalsiyum sinyalinin etkisi incelendiğinde bazal transkripsiyonlarının kalsiyum uyarımı ile daha fazla aktive edildiği bulundu. Glukoz repres şartlarda belirli seviyede aktive edilen bu genlerin glukoz derepresed koşullarda ise kalsiyumdan bağımsız olduğu görüldü. Diğer ifade ile, aktive edilen genlere kalsiyum stresi uygulanmasının daha fazla aktivasyona neden olmadığı görüldü. Bu durum *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1* genleri promotor yapılarının repres ve derepresed koşullardaki farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Repres koşullarda *HXT2* ve *HXT4* promotoruna kalsiyum stresi ile aktive edilen Crz1p veya diğer transkripsiyon faktörleri bağlanabilirken, derepresed koşullarda nispeten açık olan (nükleozomlardan arındırılmış olan) bu promotorlara diğer aktivatörler bağlanıyor olabilir. Bu durumda kalsiyum sinyali aktive edilmiş olan transkripsiyon faktörleri de bu genlerin promotorlarına bağlanamaz ve düşük glukoz sinyali ile aktive edilmiş bu genler daha fazla aktive edilmemiş olur. Repres koşullardan derepresed koşullara geçişte *HXT2* ve *HXT4* genlerinin promotorlarına bağlanan faktörlerde değişiklik olduğu daha önce gösterilmiştir (van Oevelen ve ark. 2006). Glukoz baskılaması olan üreme ortamı koşullarından düşük glukoz içeren derepres ortama geçişte *HXT2* ve *HXT4* promotorlarında bir çeşit histon asetil transferaz olan SAGA kompleksinin bu genlerin promotorunda histon asetilasyonu ile nükleozomların atılmasını sağladığı Oevelen ve ark. (2006) tarafından gösterilmiştir.

Gliserol ortamında, non-fermentatif koşullarda üretilen maya transformantında ise kalsiyum aktivasyonunun normal glukoz ortamı kadar olmadığı ve genellikle *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1* genlerinde yaklaşık 2-kat kadar kalsiyuma bağlı aktivasyon olduğu görülmektedir. Gliserol ortamında *HXT2* ve *HXT4* genleri ana aktivatörü Rgt1 inaktif durumdadır. Dolayısıyla bu koşullarda görülen aktivasyon Rgt1`den bağımsız olarak yapılan transkripsiyondur. Kalsiyum ilavesi ile *HXT2* ve *HXT4* genlerinde 2-kat kadar aktivasyon olması kalsiyum stresinin *RGT1*`den bağımsız olan diğer aktivatörler ile sağlandığını göstermektedir. Bu aktivatörlerden birisi de bu genlerin aktivatörü olan Gcr1p olabilir. Transkripsiyon aktivatörü Gcr1p hem *HXT2* ve hem de *HXT4* promotoruna bağlanır ve bu genlerin aktivasyonu için de gerekli olduğu daha önce de gösterilmiştir (Türkel ve Bisson 1999). Gcr1p bir fosfoprotein olup aktivasyonu çeşitli kinazlar tarafından kontrol edilmektedir. Gcr1p yapısında çok sayıda serin ve threonin bulunur ve bu serin threonin amino asitlerinin de fosforile edildiği bilinmektedir (Anonim 2020b). Bu nedenle kalsiyum tarafından hiper-aktive edilen faktörlerden birisi de Crz1p ye ek olarak Gcr1p olabilir.

Snf1 AMP aktive edilen çok fonksiyonlu bir protein kinazdır. Bu kinaz düşük glukoz ortamında aktif hale geçerek hedef proteinleri fosforlayıp aktivitelerini kontrol eder. Snf1p aktivitesinin kalsiyuma ve kalsiyumun oluşturduğu alkali strese bağlı olarak da aktive edildiği daha önce gösterilmiştir (Hong and Carlson 2007). Araştırmamızda elde edilen sonuçlar özellikle *HXT4* geninin kalsiyuma bağlı aktivasyonunun tümüyle Snf1p kinaza bağlı olduğunu göstermiştir. Bu durum aynı zamanda *HXT4*`ün kalsiyumla aktivasyonunun Crz1pden bağımsız olduğunu da öne sürmektedir. *S. cerevisiae*`da son zamanlarda yapılan yeni bir çalışmada çevresel strese yanıt olarak çok sayıda kinazın aktive edildiği rapor edilmiştir. Mace ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmada çevresel streslere yanıt olarak *S. cerevisiae*`da 28 farklı protein kinazın aktivitesinde değişiklik olduğu bulunmuştur. Bu kinazlardan birisi de yüksek sodyum ile aktive edilen Hog1p kinazdır ve Hog1p nin hem kalsiyum ve hem de sodyum iyonlarına yanıt ile aktive edildiği bilinmektedir (Yoshimoto ve ark. 2002). *HXT2* transkripsiyonunda ise *snf1Δ* mutantında bu kinazdan bağımsız yaklaşık 2-kat kadar artış olduğu görülmektedir. Ruiz ve ark (2008) yayınladığı sonuçlarda *HXT2* geni transkripsiyonunun Snf1p ve bu kinaz tarafından aktive edilen Crz1p tarafından aktive edildiği rapor edilmektedir. Ancak bu

araştırmacı tarafından yayınlanan makalede de snf1 mutant suşunda da *HXT2* geninde normal ortama göre kalsiyumla 3-kat kadar aktivasyon olduğu görülmektedir. Bu sonuç bizim çalışmalarımızı da doğrular niteliktedir. Bu durumda *HXT2* ve *HXT4* genlerinin Snf1p kinazı ile kontrol mekanizmalarında farklılıklar olduğu düşünülebilir. Kalsiyum ile transkripsiyonun aktivasyonu *HXT4*'de tamamen Snf1p ye bağlı iken, *HXT4* ve hatta *TPS1*'de bu aktivasyonun Snf1pden bağımsız olarak gerçekleştiğini söylemek mümkündür.

Kalsiyum stresi ile aktive edilen önemli transkripsiyon faktörlerinden birisi de Crz1pdir. Araştırmamızda *HXT2*, *HXT4* ve *TPS1* promotor bölgelerinde bu faktörün bağlanma dizilerinin olup olmadığı da YEASTRACT veritabanı bilgileri kullanılarak incelendi (Anonim 2020b). *HXT2* geni promotorunda Crz1p bağlanma sekansı olduğu daha önce rapor edilmiştir (Ruiz ve ark. 2008). Bu tez çalışması kapsamında yapılan incelemede *HXT4* geni promotorunda Crz1p bağlanma sekansının daha önce rapor edilmediği görüldü. Ancak *TPS1* geni promotorunda 1 adet Crz1p bağlanma sekansı olduğu bulundu. Yapılan promotor analizi çalışmasında araştırmada incelenen her 3 genin de promotor bölgesinde stresle aktive edilen çok sayıda transkripsiyon faktörü bağlanma sekansı olduğu, bunların bazılarının da in vivo olarak işlevsel olduğu YEASTRACT kayıtlarında verilmiştir. Bu durumda bu genlerin kalsiyum stresine yanıt olarak sadece Crz1p ile değil diğer transkripsiyon faktörleri ile de aktive edilebileceği düşünülmektedir.

Araştırma sonuçları kalsiyum stresinin *S. cerevisiae*'da üreme hızını düşürdüğünü göstermektedir. Bu da kalsiyum stresinin hücre döngüsünü muhtemelen belirli kontrol noktalarında durdurduğunu öne sürmektedir. Yaptığımız çalışmalarda kalsiyumun hücre döngüsüne Snf1p üzerinden etki ederek G1-S aşamasını bloke ettiğini göstermiştir. Daha önce yapılan çalışmaların hücresel koşullara göre G1-S geçişinin Snf1p kinaz aktivitesine bağlı olduğu, Snf1p'nin bir çeşit S-fazı spesifik siklin olan Clb5p nin aktivitesini kontrol ederek gerçekleştirdiği rapor edilmiştir (Pessina ve ark. 2010). Dolayısıyla daha önce rapor edilen bu sonuç elde ettiğimiz mitotik indeks değerlerini ve kalsiyuma bağlı hücre bölünme hızında yavaşlamayı da doğrular niteliktedir.

Hxt transporterları ile hücre içine alınan glukozun hücrenin metabolik durumuna ve üreme aşamasına göre bir bölümü depo karbonhidratları olan glikojen ve trehaloza dönüşür. Trehaloz biyosentezinde işlevi olan *TPS1* geninin hem bazal seviyede ve kalsiyumla aktivasyonunda yüksek seviyede transkript ürettiği elde edilen sonuçlardan görülmektedir. *TPS1* geni aktivasyonu ağırlıklı olarak stresle aktive edilen transkripsiyon faktörleri olan Msn2-Msn4'e bağlıdır (Francois ve Parrou 2001). Bu nedenle bu genin kalsiyumla aktivasyonunun da kısmen Snf1p'den bağımsız olarak Msn2-Msn4'e bağlı olarak yapıldığından snf1Δ mutasyonundan etkilenmeden 5-kat kadar aktive edildiği düşünülmektedir. Ancak *TPS1* aktivasyonunun hücrede trehaloz birikimine neden olmayacağı da düşünülmektedir. Çünkü, trehalozun hidrolizini gerçekleştiren nötral trehalaz enzimi Nth1p'nin de aktivitesi kalsiyumla aktive edilmektedir (Alblova ve ark. 2019). Bu nedenle kalsiyum stresi koşullarında *TPS1* transkripsiyonunun artışının trehaloz birikimine yol açmayacağı ön görülebilir.

Diğer depo karbonhidratı olan glikojenin ise hog1Δ mutant suşunda kalsiyuma yanıt olarak fazla biriktiği görülmüştür. Glikojen metabolizmasının ana düzenleyicisi Snf1p kinazdır. Snf1p kinazın Hog1p aktivitesini kontrol ettiği de bilinmektedir (Mizuno ve ark. 2015). Bu nedenle stres koşullarında aktive edilen Snf1p'nin hog1Δ mutantında hücrede glikojen yıkımını aktive edemediğini göstermektedir. SGD kayıtlarında hog1Δ mutantında görülen önemli bir fenotipik özelliğin bazı metabolitlerin aşırı birikimidir (Anonim 2020a). *HOG1* geni delesyonla çıkarılan mutant suшта aminoasitlerin, polifosfatın, glikojenin ve diğer metabolitlerin hücre içi birikiminde önemli anomaliler olduğu da rapor edilmiştir (Anonim 2020a).

Bu araştırmada elde edilen sonuçlar kalsiyumun önemli bir biyometal iyonu olmasına rağmen kontrollü şekilde hücrede bulunması gerektiğini, stres oluşturacak miktarda uygulanmasının hücre üremesini yavaşlattığı ve G1-S geçişini de durdurabildiğini göstermektedir. Glukoz transportu genlerini aktive etmesine rağmen hücre üreme hızının artmadığı görülmektedir. Bu durumda kalsiyum stresinde aktive edilen *HXT* genleri transkripsiyonunun translasyon seviyesinde de artışa neden olup olmadığının incelenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Adamczyk, M., Szatkowska, R. 2017.** Low RNA polymerase III activity results in upregulation of *HXT2* glucose transporter independently of glucose signaling and despite changing environment. *PLOS ONE*, 12(9): e0185516.
- Alblova, M., Smidova, A., Kalabova, D., Lentini Santo, D., Obsil, T., Obsilova, V. 2019.** Allosteric activation of yeast enzyme neutral trehalase by calcium and 14-3-3 Protein. *Physiol. Res.*, 68: 147–160.
- Amon, A. 1997.** Regulation of B-type cyclin proteolysis by Cdc28-associated kinases in budding yeast. *EMBO J.*, 16(10): 2693–2702.
- Anonim, 2020a.** *Saccharomyces cerevisiae* Genome Database (SGD). <https://www.yeastgenome.org/>-(Erişim tarihi: 10 Temmuz, 2020)
- Anonim, 2020b.** YEASTRACT (Yeast Search for Transcriptional Regulators and Consensus Tracking). <http://www.yeasttract.com/>-(Erişim tarihi: 10 Temmuz, 2020)
- Avonce, N. Vargas, A.M., Morett, E., Iturriaga, G. 2006.** Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evolutionary Biol.*, 6 (109): 1–15.
- Bartek, J., Lukas, J. 2001.** Mammalian G1- and S-phase check points in response to DNA damage. *Current Opin. Cell Biol.*, 13(6): 738–747.
- Bartek, J., Lukas, J. 2003.** Chk1 and Chk2 kinases in check point control and cancer. *Cancer Cell*, 3: 421–429.
- Bell, W.W., Sun, W., Hohmann, S., Wera, S., Reinders, A., DeVirgilio, C., Wiemken, A., Thevelein, J.M. 1998.** Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *J. Biol. Chem.*, 273: 33311–33319.
- Berridge, M.J. 2016.** The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. *Physiol Rev.*, 96(4):1261–1296.
- Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, D.M. 2000.** The versatility and universality of calcium signalling, *Mol. Cell. Biol.*, 1: 11-21.
- Bisson, L.F. 1987.** The SNF3 gene is required for high-affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 175(23): 7689–7696.
- Blazquez, M.A., Lagunas, R., Gancedo, C., Gancedo, J.M. 1993.** Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Lett.*, 329: 51–54.
- Boles, E., Hollenberg, C.P. 1997.** The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1: 85–111.

Bonilla, M., Cunningham, K.W. 2003. Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca^{2+} signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol. Biol. Cell*, 14: 4296–4305.

Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, 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.

Broach, J.R. 2012. Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics*, 192: 73–105.

Chester, V.E. 1968. Heritable glycogen-storage deficiency in yeast and its induction by ultra-violet Light. *J. Gen. Microbiol.*, 51: 49–56.

Connolly, S., Woode, Q.D., Waldron, L., Eberly, C., Waters, K., Muller, M.E., Kignsbury, J.T. 2018. Calcineurin regulatory subunit calcium-binding domains differentially contribute to calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 209: 801–813.

Conrad, M. 2014. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 38: 254–299.

Cooper, G.M. 2019. The cell cycle: The cell a molecular approach. Sinauer Associates, New York, USA, 604–635 pp.

Cooper, S. 2003. Reappraisal of serum starvation, the restriction point, G0, and G1 phase arrest points, *FASEB J.*, 17(3): 333–340.

Cui, C., Merritt, R., Fu, L., Pan, Z. 2016. Target in calcium signaling in cancer therapy, *Acta Pharm. Sinica B*, 7(1): 3–17.

Cui, J. 2009. Calcium homeostasis and signaling in yeast cells and cardiac myocytes. *FEMS Yeast Res.*, 9: 1137–1147.

Cunningham, K.W., Fink, R.G. 1994. Ca^{2+} transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Experimental Biol.*, 196: 157–166.

Cyert, M.S. 2001. Genetic analysis of calmodulin and its targets in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genetics*, 35: 647–672.

Cyert, M.S., Kunisawa, R., Kaim, D., Thorner, J. 1991. Yeast has homologs (CNA1 and CNA2 gene products) of mammalian calcineurin, a calmodulin-regulated phosphoprotein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88(16): 7376–7380.

Cyert, M.S., Thorner, J. 1992. Regulatory subunit (CNB1 gene product) of yeast Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatases is required for adaptation to pheromone. *Mol. Cell. Biol.*, 12(8): 3460–3469.

Çiftçi, N. 2017. Hücre içi kalsiyum sinyali, apoptoz ve kanser progresyonunda kalsiyum kanallarının (Voc, Trp ve Soc kanalları) rolü, Derleme Review. *MCBU-SBED*,4(3): 1021–1027.

Dupont, G., Combettes, L., Bir, S.G., Putney, W.J. 2011. Calcium oscillations, *Cold Spring Harb. Perspect Biol*, 3: a004226.

Dürvanger, Z., Harmat, V. 2019. Structural diversity in calmodulin – peptide interactions. *Curr Protein Pept Sci.*, 20(11): 1102–1111.

Eastmond, P.J., Graham, I.A. 2003. Trehalose metabolism: a regulatory role for trehalose-6-phosphate. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 6: 231–235.

Elbing, K. 2004. Role of hexose transport in control of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(9): 5323–5330.

Francois J., Parrou, JL. 2001. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.*, 25(1):125–145.

Feldman, H., 2012. Yeast: Molecular and Cellular Biology, Wiley-Blackwell, Weinheim, Germany, 1650pp.

Gadd, G.M. 1987. The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisia*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 48: 249–254.

Gancedo, C., Flores, L.C. 2004. The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi, *FEMS Yeast Res.*, 4 (5): 351–359.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, ve ark. 1996. Life with 6000 genes, *Science*, 274(5287): 546, 563–567.

Grant, G.D., Cook, J.G., 2017. The temporal regulation of S-phase proteins during G1. *Adv. Exp. Med Biol.*, 1042: 335–369.

Hartwell, L.H. 1973. Genetic control of the cell division cycle in yeast: V. genetic analysis of *cdc* mutants. *Genetics*, 74: 267–286.

Hedbacker, K., Carlson,M. 2009. SNF1/AMPK pathways in yeast, *Front Biosci.*, 13: 2408–2420.

Hong, S.P., Carlson, M. 2007. Regulation of Snf1 protein kinase in response to environmental stress. *J. Biol. Chem.*, 282: 16838–16845.

Hounsa, C.G. 1998. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stres. *Microbiology*, 144(3): 671–680.

- Juvvadi, R.P., Lamoth, F., Steinbach, W. 2014.** Calcineurin as a multifunctional regulator: unraveling novel functions in fungal stress responses, hyphal growth, drug resistance, and pathogenesis, *Fungal Biol. Rev.*, 28(2-3): 56–69.
- Kaniak, A. 2004.** Regulatory network connecting two glucose signal transduction pathways in *Saccharomyces cerevisiae*, *Eukaryotic Cell*, 3(1): 221–231.
- Kasahara, T., Kasahara, M. 2003.** Transmembrane segments 1, 5, 7 and 8 are required for high-affinity glucose transport by *Saccharomyces cerevisiae* HXT2 transporter, *Biochem. J.*, 372: 247–252.
- Kayıkcı, Ö., Nielsen, J. 2015.** Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res.*, 15(6): 1–8.
- Kruckeberg, A.L., Bisson, L.F. 1990.** The HXT2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is required for high-affinity glucose transport, *Mol. Cell. Biol.*, 10(11): 5903–5913.
- Levin, D.E. 2011.** Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway, *Genetics*, 189: 1145–1175.
- Liu, S., Hou, Y., Liu, W., Lu, C., Wang, W., Sun, S. 2015.** Components of the calcium-calcineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets, *Euk. Cell*, 14(4): 324–334.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193(1): 265–275.
- Lucero, P., Moreno, E., Lagunas, R. 2002.** Catabolite inactivation of the sugar transporters in *Saccharomyces cerevisiae* is inhibited by the presence of a nitrogen source, *FEMS Yeast Res.*, 1(4): 307–314.
- Mace, K., Krakowiak, J., El-Samad, H., Pincus, D. 2020.** Multi-kinase control of environmental stress responsive transcription. *PLoS ONE* 15(3): e0230246.
- Morgan, D. O. 1997.** Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13: 261–91.
- Mura, M., Feillet, C., Bertolusso, R., Delaunay, F., Kimmel, M. 2019.** Mathematical modelling reveals unexpected inheritance and variability patterns of cell cycle parameters in mammalian cells. *Plos Computational Biol.*, 15(6): e1007054.
- Mizuno, T., Masuda Y., Irie, K. 2015.** The *Saccharomyces cerevisiae* AMPK, Snf1, negatively regulates the Hog1 MAPK pathway in ER stress response. *PLOS Genetics*, DOI:10.1371/journal.pgen.1005491
- Nurse, P. 2000.** A long twentieth century of the cell cycle and beyond, *Cell*, 100: 71–78.

Özcan, S., Johnston, M. 1995. Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose, *Mol. Cell. Biol.*, 15(3): 1564–1572.

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(11): 6419–6426.

Özcan, S., Dover, J., Rosenwald, A.G., Wölfl, S., Johnston, M. 1996. Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 12428–12432.

Özcan, S. 2002. Two different signals regulate repression and induction of gene expression by glucose. *J. Biol. Chem.*, 277(49): 46993–46997.

Özcan, S., Johnston, M. 1999. Function and regulation of yeast hexose transporters, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63(3): 554–569.

Paidhungat, M., Garrett, S. 1997. A homolog of mammalian, voltage-gated calcium channels mediates yeast pheromone-stimulated Ca²⁺ uptake and exacerbates the *cdc1(Ts)* growth defect. *Mol. Cell. Biol.*, 17(11): 6339–6347.

Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, S.A., Hatziloukas, E. 2019. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications, *AIMS Microbiology*, 6(1): 1–31.

Pessina, S., Tsiarentsyeva, V., Busnelli, S., Vanoni, M., Alberghina, L., Coccetti, P. 2010. Snf1/AMPK promotes S-phase entrance by controlling CLB5 transcription in budding yeast. *Cell Cycle*, 9(11): 2189–2200.

Reifenberger, E., Freidel, K., Ciriacy, M. 1995. Identification of novel *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux, *Mol. Microbiol.*, 16(1): 157–167.

Reifenberger, E., Boles, E., Ciriacy, M. 1997. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression, *Euro. J. Biochem.*, 245: 324–333.

Rolland, F. 2002. Glucose-sensing and-signalling mechanisms in yeast, *FEMS Yeast Res.*, 2(2): 183–201.

Rose, M., Casadaban, M.J., Botstein, D. 1981. Yeast genes fused to beta-galactosidase in *Escherichia coli* can be expressed normally in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 2460–2464.

Rose, M., Winston, F., Heiter, P. 1990. Methods in Yeast Genetics. A Laboratory Course Manual, *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA*, 455 pp.

- Rusnak, F., Mertz, P. 2000.** Calcineurin: form and function, *Physiological Reviews*, 80(4): 1483–1521.
- Ruiz, A., Serrano, R., Arino, J. 2008.** Direct regulation of genes involved in glucose utilization by the calcium/calcineurin pathway, *J. Biol. Chem.*, 283(20):13923–13933.
- Schönenberger, F., Deutzmann, A., Ferrando, M.E., Merhof, D. 2015.** Discrimination of cell cycle phases in PCNA-immunolabeled cells, *BMC Bioinformatics*, 16: 180.
- Sherman, F. 1998.** Yeast genetics: the encyclopedia of molecular biology and molecular medicine, *VCH Publisher*, Weinheim, Germany, 6: 302–325pp.
- Stathopoulos, A.M., Cyert, M.S. 1997.** Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast, *Genes & Dev.*, 11(24): 3432–3444.
- Theodoris, G., Fong, N.M., Coons, D.M., Bisson, L.F. 1994.** High-copy suppression of glucose transport defects by *HXT4* and regulatory elements in the promoters of *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, 137(4): 957–966.
- Thevelein, J.M., Hohmann, S. 1995.** Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast, *Trends Biochem. Sci.*, 20(1): 3–10.
- Thewes, S. 2014.** Calcineurin-Crz1 signaling in lower eukaryotes, *Euk. Cell*, 13(6): 694–705.
- Trumbly, R.J. 1992.** Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, 6(1): 15–21.
- 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.
- Van Oevelen, C.J.C., van Teeffelen, H.A.A.M., van Werven, F.J., Marc Timmers, H.Th. 2006.** Snf1p-dependent Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase (SAGA) recruitment and chromatin remodeling activities on the *HXT2* and *HXT4* promoters. *J. Biol. Chem.*, 281: 4523–4531.
- Vicente, R.L., Spina, L., Gomez, P.L.J., Dejean, S., Parrou, J.L., Francois, J.M. 2018.** Trehalose-6-phosphate promotes fermentation and glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell*, 5(10): 444–459.
- Viladevall, L., Serrano, R., Ruiz, A., Domenech, G., Giraldo, J., Barcelo, A., Arino, J. 2004.** Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 279(42): 43614–43624.
- Voogd, C., Brain, A.L., Gasic, V.E. 2016.** Two subclasses of differentially expressed TPS1 genes and biochemically active TPS1 proteins may contribute to sugar signalling in kiwifruit *Actinidia chinensis*. *PLOS ONE*, 11(12): 1–21.

Wang, X., Zhang, Y., Wang, C., Wang, C., Hau, L. 2013. Intracellular level of trehalose in soy sauce yeasts under different stresses. *IERI Procedia*, 5: 321–326.

Wendell, D.L., Bisson, L.F. 1993. Physiological characterization of putative high-affinity glucose transport protein HXT2 of *Saccharomyces cerevisiae* by use of anti-synthetic peptide antibodies. *J. Bacteriol.*, 175(23): 7689–7696.

Wenzel, E.S., Singh, A. T. K. 2018. Cell-cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer, *In vivo*, 32: 1–5.

Wieczorke, R. 1999. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.*, 64(3): 123–128.

Xu, D., Cheng, J., Cao, C., Wang, L., Jiang, L. 2015. Genetic interactions between Rch1 and the high-affinity calcium influx system Cch1/Mid1/Ecm7 in theregulation of calcium homeostasis, drug tolerance, hyphal development and virulence in *Candida albicans*, *FEMS Yeast Res.*, 15(7): fov079.doi: 10.1093.

Yan, N. 2017. A glimpse of membrane transport through structures-advances in the structural biology of the GLUT glucose transporters. *J. Mol. Biol.*, 429(17): 2710–2725.

Yoshimoto, H., Saltsman, K., Gasch, A.P., Li, H.X., Ogawa, N., Botstein, D., Brown P.O., Cyert, M.S. 2002. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the Calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 277: 31079–31088

Zhang, M. Abrams, C., Wang, L., Gizzi, A., He, L., Lin, R., Chen, Y., Loll, J.P., Pascal, M.J., Zhang, J.F. 2012. Structural basis for calmodulin as a dynamic calcium sensor. *Structure*, 20(5): 911–923.

Zhao, Q.F., Keating, A.F. 2007. Functional properties and genomics of glucose transporters, *Current Genomics*, 8(2): 113–128.

EKLER

EK 1. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması

EK 2. β - Galaktozidaz Aktivitesi Hesaplanması



EK 1. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması

1: Yeast Ekstrakt, Pepton, Dekstroz (YPD) (Tam Besiyeri)

10 g yeast ekstrakt ve 20 g pepton saf suda çözüldü. Katı besiyeri (petriler) için, sıvı besiyeri ortamına 20 gram/litre oluşturacak şekilde *Agar agar* eklendi ve 121 C sıcaklıkta, 25 dk steril edildi. Karbon kaynağı olarak %20'lik stok çözelti halinde glukoz hazırlandı, 121 C'de 25 dakika otoklavda steril edildi. Glukoz, kullanımından önce besiyerlerine son konsantrasyonu %2 olacak şekilde ortama ilave edildi. Tam besiyeri *S. cerevisiae* suşlarının transformasyon öncesi rutin üremesi için kullanıldı.

2: Urasil İçermeyen Sentetik Tam Besiyeri (Sc-Ura)

Sc-Ura besiyerini hazırlamak için 1.7 gram/litre YeastNitrogen Base (YNB), 5 gram/litre Amonyum sülfat distile suda çözülüp, otoklavda steril edildi. Otoklavdan sonra Sc-Ura amino asit karışımı 1.97 gram/litre olacak şekilde saf suda çözüldü ve 0.45 mm'lik disk filtre ile steril edilerek verilen konsantrasyonlarda besiyerine eklendi.

Sc-Ura katı besiyerleri için 20 gram/litre olacak şekilde *Agar agar* ilave edildi. Glukoz son konsantrasyonu %2 olacak şekilde %20'lik steril stok çözeltiden deneydeki kullanımdan hemen önce ilave edildi. Derepres şartlar için son konsantrasyon %0.1 olacak şekilde steril glukoz ilavesi yapıldı.

3: Lityum Asetat Çözeltileri (1M ve 0,1M)

Lityum asetat (Molekül ağırlığı: 102,02) 1M olacak şekilde saf suda hazırlandı ve 0,45 µm por çaplı steril disk filtreler ile steril edildi. Maya transformasyonu için kullanıldı.

4: Polietilen Glikol (%50 PEG)

Polietilen Glikol (PEG) (Molekül ağırlığı: 3,350) distile suda %50'lik stok çözelti olarak hazırlanıp, 121°C'de 25 dk otoklavda steril edildi. Maya transformasyonu için kullanıldı.

5: Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (%0,1) ve Kloroform Çözeltileri

Sodyum dodesil sülfat (SDS), steril distile suda %0,1'lik stok çözelti olarak hazırlandı. Kloroform seyreltilmeden, doğrudan stoktan kullanıldı. Bu çözeltiler maya hücrelerini permeabilized ederek hücre lizatı hazırlamak için kullanıldı.

6: Lizis Tampon Çözeltisi (Break Buffer)

Lizis Tampon Çözeltisinin (Break Buffer) Bileşenleri:

100 mM Tris.HCl (pH: 8)

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

%20 Gliserol

4 mM Phenyl methane sulfonyl fluoride (PMSF).

7: β - Galaktozidaz Tampon Çözeltisi (Z Buffer)

Z Buffer içeriği:

60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$,

10 mM KCl ,

1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

50 mM β -Merkepto-etanol çözeltisi

Yukarıda belirtilen son konsantrasyonlarda, steril distile su ile hazırlanıp $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı

8: Lowry Çözeltileri

I: Lowry A çözeltisi:

20 g Na_2CO_3 ve 4g NaOH , toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü.

II: Lowry-B1 çözeltisi:

1 g CuSO_4 , toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile su ile çözülüp, $+4^\circ\text{C}$ 'de depolandı.

III: Lowry-B2 çözeltisi:

2 g Sodyum potasyum tartarat, toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile su ile çözülüp, $+4^\circ\text{C}$ 'de depo edildi. (Stok çözelti)

IV: Lowry-C çözeltisi:

Her deney için, Lowry-A, Lowry-B1 ve Lowry-B2 stok çözeltilerden belirlenen konsantrasyonda taze olarak hazırlandı.

Lowry-C Çözeltisinin İçeriği:

24,5 ml Lowry A,

250 μl Lowry B1,

250 μl Lowry B2.

9: ONPG (O-Nitrofenil β -D-Galaktopiranozid)

ONPG (Sigma N1127), en son konsantrasyonu 4 mg/ml olacak şekilde Z-tampon çözeltisi içinde hazırlanıp, $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

10- Kalsiyum Klorür Çözeltilerinin Hazırlanması

Ca^{++} (CaCl_2 , FW: 147,02)

Son konsantrasyonu 100 mM olarak kullanıldı. Stok: 2 M'dır. 2 M stok hazırlamak için 7,35 gr CaCl_2 , 25 ml dH_2O 'da çözüldü. Bu 2 M stoktan 5 ml'lik kültürler 250 μl eklendi ve 4 saat beklendi.

EK 2. β - Galaktozidaz aktivitesi hesaplanması

β -Galaktozidaz aktivitesi aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

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

OD₄₂₀: Sarı rengin absorbanası

1.7: Sarı rengin bulunduğu tüpün hacmi (980 μ l Z buffer, 20 μ l lizat, 200 μ l ONPG, 500 μ l NaCO₃)

0,0045: ONPG'nin molar absorpsiyon katsayısı

t: β -galaktozidaz reaksiyon süresi (dakika)

V: β -Galaktozidaz ölçümünde kullanılan hücre lizatı hacmi (ml)

P: Hücre lizatlarının protein konsantrasyonları (mg/ml)

β -Galaktozidaz aktivitesi biririmi, dakika başına hücre lizatındaki 1 mg çözünür protein içindeki β -Galaktozidaz enziminin hidroliz edilen nmol ONPG (nmol ONPG/dk/ mg protein) cinsinden verilmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Osman Alp ÖZTOP
Doğum Yeri ve Tarihi : Aydın, 06.12.1994
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lise : Germencik Anadolu Lisesi/ 2013
Lisans : Uludağ Üniversitesi/ 2018
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi/ 2020

Çalıştığı Kurum/Kurumlar : -
İletişim (e-posta) : osmanalpoztop@gmail.com
Akademik çalışmalar :

Türkel, S., Çolakoğlu, C., Tanık, E., Öztop, O.A. 2019. Induction of autophagy and apoptosis affects the gene expression in Ty elements of *Saccharomyces cerevisiae*. 29th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (ICYGMB). Gothenburg, İsveç. 18-22 Ağustos, 2019 (Poster).

Tanık, E., Çolakoğlu, C., Öztop, O.A, Türkel, S. 2019. Apoptosis and autophagy signaling repress the transcription of GPD1 and CYC1 gene. 7th. International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey. İTÜ, İstanbul, 27-29 Eylül, 2019 (Poster) (Abstract published in *Turk J. Biol.*, 2019. 45 (5), Suppl. p:106.

Öztop, O.A., Tanık, E., Çolakoğlu, C., Türkel, S. 2020. Investigation of the effects of calcium signaling pathway on the cell cycle regulation and transcription of genes that involves in glucose metabolism. II. International Conference on Agricultural, Biological and Life Science. Edirne, Türkiye. 1-3 Eylül, 2020 (Poster).