

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

*Schizosaccharomyces pombe'de
İNVERTAZ AKTİVİTESİNE İLİŞKİN ÇALIŞMALAR*

Cenk KIĞ

Biyoloji Anabilim Dalı
(Moleküler Biyoloji Programı)

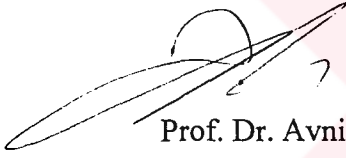
Danışman: Prof. Dr. Güler TEMİZKAN

HAZİRAN - 2003

İSTANBUL
T.C. YÜKSEK LİSANS
DOKÜMANİSTASYON MERKEZİ

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Bu çalışma 16/07/2003 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



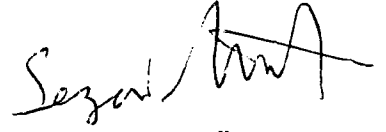
Prof. Dr. Avni KURU



Prof. Dr. Güler TEMİZKAN
Danışman



Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI



Doç. Dr. Sezai TÜRKEL



Doç. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA

ÖNSÖZ

Canlıların büyük çoğunluğu temel enerji kaynağı olan karbohidratlar arasında glukozu tercih etmekle birlikte sukroz, maltoz vb. şekerleri de alternatif karbon kaynakları olarak kullanabilirler. Bununla beraber, glukoz ortamda yeterli miktarda bulunduğu diğer şekerlerin hidrolizini sağlayan enzimlerin sentezi genellikle baskılanır (glukoz baskılaması veya katabolit represyon). Buna göre, katabolit represyon diğer düzenleme mekanizmaları ile birlikte canlılarda şeker kullanımının dengelenmesi sürecinde rol oynamaktadır.

Sentezleri katabolit represyonla kontrol edilen enzimlerin model moleküller olarak kullanılmasıyla yapılan araştırmalar, hücrelerin enerji gereksinimlerinin karşılanmasında rol oynayan metabolik süreçler ile bu süreçlerde iş gören genlerin tanımlanması ve anlatımlarının düzenlenmesine ilişkin konuların aydınlatılabilmesi açısından önemli katkılar sağlayabilmektedir.

Bu çalışmada ökaryotlardaki genetik ve moleküler biyoloji çalışmaları için uygun bir model organizma olarak kabul edilen *Schizosaccharomyces pombe* maya türünde sentezi katabolit represyonla kontrol edilen invertaz enzimini şifreleyen gen(ler)in anlatımlarının düzenlenmesine ilişkin ön bilgilerin elde edilmesi amaçlandı. Bu kapsamda, bu organizmada büyük olasılıkla özgül olarak invertaz sentezi bakımından katabolit represyona dirençli oldukları düşünülen konstitütif mutantlar ilk kez elde edildi. Bu mutantlarda morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve genetik bazı analizler yapıldı. Ek olarak, gen dozajının invertaz sentezi açısından katabolit represyondaki etkisi incelendi.

Öğrenim ve çalışmalarım sırasında değerli bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım, benden hiçbir yardımını esirgemeyen danışmanım Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Başkanı Prof. Dr. Güler TEMİZKAN 'a teşekkürlerimi sunarım.

Benden ilgi ve desteğini esirgemeyen, önerileriyle çalışmama değerli katkılar sağlayan Doç. Dr. Sezai TÜRKEL'e ve diğer tüm hocalarıma, ayrıca, laboratuvar çalışmalarım ve tezimin hazırlanması sırasında emeği geçen Dr. Semian KARAER ile diğer arkadaşlarıma teşekkür ederim. Tüm yaşamım ve tahsil hayatım boyunca bana daima destek olan AİLEM'e de teşekkür ederim.

Cenk KIĞ
İstanbul 2003

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği (Proje No: T-1267 / 01112001) ve İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi tarafından (Proje No: 01 / 01) desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİL LİSTESİ	IV
TABLO LİSTESİ	VI
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
I. GİRİŞ	1
II. MALZEME VE YÖNTEM	9
II.1. Organizmalar	9
II.2. Besi Ortamları	9
II.3. Organizmanın üretimi ve saklanması	11
II.4. Stabil diploid <i>S. pombe</i> soylarının elde edilmesi	11
II.5. Diploid ve haploid <i>S. pombe</i> soylarında üremenin izlenmesi	11
II.6. Generasyon sayısının ve süresinin hesaplanması	12
II.7. İnvertaz aktivitesinin saptanması	13
II.8. İnvertaz sentezinin baskılanmadığı glukoz konsantrasyonunun saptanması	14
II.9. Glukoz baskılamasına dirençli mutantların elde edilmesi	14
II.9.1. UV' nin <i>S. pombe</i> hücrelerinde yaşama yeteneği üzerine etkisi	15
II.9.2. EMS'nin <i>S. pombe</i> hücrelerinde yaşama yeteneği üzerine etkisi	15
II.9.3. Mutagenез ve mutantların seleksiyonu	16
II.9.3.1. İnvertaz aktivitesinin koloni yüzeyinde yarı kantitatif olarak gösterilmesi	16
II.9.3.2. 2-Deoksi-D-Glukoz ile seleksiyon	16
II.10. Mutantların analizi	17
II.10.1. Stabilite belirlenmesi	17
II.10.2. Prototrofluk kontrolleri	18
II.10.3. İnvertaz aktivitelerinin belirlenmesi	18
II.10.4. Üremenin izlenmesi	18
II.10.5. Morfolojik analiz	18
II.10.6. Resesiflik/dominantlık testi	18
III. BULGULAR	19
III.1. <i>S. pombe</i> ' de invertaz sentezi üzerinde glukoz baskılaması	19
III.1.1. Stabil diploid <i>S. pombe</i> soylarının elde edilmesi	19
III.1.2. Haploid ve diploidlerde zamana bağlı üreme	20
III.1.3. Haploid ve diploidlerde baskılama yapmayan glukoz konsantrasyonunun belirlenmesi	22
III.2. Glukoz baskılamasına dirençli invertaz mutantlarının elde edilmesi	24
III.2.1. Mutagen dozlarının belirlenmesi	24
III.2.2. Mutantların seleksiyonu	26

III.3. Glukoz baskılamasına dirençli invertaz mutantlarının analizi.....	30
III.3.1. Direnç özelliğinin stabilitesi.....	30
III.3.2. Hücre morfolojileri.....	32
III.3.3. Resesiflik/dominantlık kontrolü.....	33
III.3.4. Oksotrofi kontrolü.....	34
III.3.5. Kantitatif invertaz aktiviteleri.....	34
III.3.6. Üreme özellikleri.....	36
III.3.7. Glukoz baskılamasına karşı dirençte pleiotropi kontrolü.....	40
IV. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	44
V. KAYNAKLAR VE ÖZGEÇMİŞ.....	49



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil I.1. İnvvertaz enziminin katalizlediği reaksiyonun mekanizması.....	2
Şekil I.2. <i>S. cerevisiae</i> 'de şekerlerin kullanımını kapsayan metabolik yollar ([18]'den sadeleştirilerek).....	4
Şekil I.3. <i>S. cerevisiae</i> 'de glukoz tarafından heksoz taşıyıcı (HXT) genlerinin anlatımının düzenlenme yolu (Kesiksiz ok işaretleri pozitif kontrolü, kesikli ok ise negatif kontrolü simgelemektedir. Snf3p ve Rgt2p glukoz sensörleri olarak iş gören membran proteinlerini, RGT1p DNA'ya bağlanarak çeşitli şekillerde işlev görebilen düzenleyici proteini, HXT heksoz taşıyıcıları göstermektedir) ([14] ve [38]'den değiştirilerek).....	7
Şekil II.1. Mililitresindeki hücre sayısı bilinen hücre süspansiyonlarının 600 nm'deki optik yoğunluklarına göre çizilen standart grafik.....	12
Şekil III.1. <i>S. pombe</i> 'nin haploid (H) ve diploid (D) kolonilerinin magdala kırmızısı içeren besi ortamındaki görünüşleri.....	19
Şekil III.2. <i>S. pombe</i> 'nin (a) haploid ve (b) diploid hücrelerinin mikroskop altında görünüşleri (büyütme x400).....	19
Şekil III.3. Haploid ve diploid <i>S. pombe</i> kültürlerinde zamana bağlı üreme eğrileri.....	21
Şekil III.4. Haploid ve diploid <i>S. pombe</i> hücrelerinde çeşitli glukoz konsantrasyonlarındaki invertaz aktiviteleri.....	23
Şekil III.5. <i>S. pombe</i> hücrelerinin UV ışığın uygulama sürelerine bağlı ölüm oranı.....	25
Şekil III.6. <i>S. pombe</i> hücrelerinin EMS'nin uygulama sürelerine bağlı ölüm oranı.....	26
Şekil III.7. 2-DOG'un invertaz sentezini baskılayıcı etkisi.....	27
Şekil III.8. İzole edilen mutantların 2-DOG ve sukroz içeren YEA ortamındaki üreme durumları (a, çizgi ekim ; b, damla ekim. Damla ekiminde, petrinin dışından ortasına doğru sırasıyla 10^5 , 10^4 ve 10^3 sayıda hücre ekimi yapılmıştır).....	29
Şekil III.9. Mutantların seçici YEA ortamında (a) 25. generasyon sonunda, (b) 50. generasyon sonunda, (c) Seçici olmayan YEA' da (kontrol) 50. generasyon sonunda üreme durumları.....	31

Şekil III.10. Yabani tipe göre hücre morfolojilerinde farklılık gösteren mutantlara ait hücrelerin mikroskop altında görünüşleri (a , yabani tip 972 h^- (kontrol); b , <i>gdi3</i> c , <i>gdi11</i> d , <i>gdi9</i> mutantları) (büyütme x400).....	32
Şekil III.11. <i>gdi1-14</i> x meiB102 çaprazlamasıyla elde edilen diploidlerin a , seçici YEA ortamında ; b , kontrol olarak YEA'daki üremeleri (çaprazlamaların sonucunda her bir mutant için 20'şer adet farklı koloniden ekim yapılmıştır).....	33
Şekil III.12. Mutantlarının MMA'daki üreme durumları.....	34
Şekil III.13. Mutantlardaki invertaz aktivitelerinin glukoz tarafından baskılanma dereceleri ve mutantların bu ölçüte göre gruplandırılması	35
Şekil III.14. Mutantların üç grubundan seçilen örneklerin (<i>gdi</i> 5,6 ve 12) YEL besi ortamındaki üremelerinin yabani tiple (972 h^-) karşılaştırılması.....	38
Şekil III.15. Mutantların üç grubundan seçilen örneklerin (<i>gdi</i> 5,6 ve 12) sukroz (%1) içeren MML besi ortamındaki üremelerinin yabani tiple (972 h^-) karşılaştırılması.....	40
Şekil III.16. Mutantların (<i>gdi1-14</i>) karbon kaynağı olarak % 3 maltoz içeren seçici ortamlarda 5. gündeki üreme durumları (a , 250 µg/ml b , 500 µg/ml c , 750 µg/ml ve d , 1000 µg/ml 2-DOG).....	42

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo II. 1. Çalışmada kullanılan <i>S. pombe</i> soylarının özellikleri.....	9
Tablo II. 2. MML, MMA ve SPA besi ortamlarında kullanılan stok çözeltiler.....	9
Tablo II. 3 . Çalışmada kullanılan besi ortamları (Stok A ₂ , 3a ve 3b' nin içerikleri Tablo II.3. de verildi.).....	10
Tablo III.1. Haploid ve diploid <i>S.pombe</i> kültürlerinde zamana bağlı üremenin izlenmesi.....	20
Tablo III.2. Haploid ve diploid <i>S. pombe</i> kültürlerinde generasyon sayı ve süreleri.....	21
Tablo III.3. Haploid ve diploid <i>S. pombe</i> hücrelerinde çeşitli glukoz konsantrasyonlarındaki invertaz aktiviteleri.....	22
Tablo III.4. UV ışığın <i>S. pombe</i> hücreleri üzerindeki öldürücülük etkisi.....	24
Tablo III.5. EMS'nin <i>S. pombe</i> hücreleri üzerindeki öldürücülük etkisi.....	25
Tablo III.6. Çeşitli 2-DOG konsantrasyonlarındaki invertaz aktiviteleri.....	27
Tablo III.7. EMS uygulaması ile glukoz baskılamasına dirençli invertaz mutantlarının seleksiyonuna ilişkin sayısal değerler.....	28
Tablo III.8. Glukoz baskılamasına dirençli invertaz mutantlarında glukozun baskılayıcı ve baskılama yapmayan konsantrasyonunda invertaz aktiviteleri.....	35
Tablo III.9. Mutantların glukoz baskılamasına direnç özelliklerine göre gruplandırılması.....	36
Tablo III.10. Mutantlardan seçilen örneklerde (<i>gdi5</i> , 6ve12) ve yabancı tipte (972 <i>h</i>) YEL'deki zamana bağlı üremenin izlenmesi.....	37
Tablo III.11. Mutantlardan seçilen örneklerde (<i>gdi5</i> ,6ve12) ve yabancı tipte (972 <i>h</i>) % 1 sukroz içeren MML'deki zamana bağlı üremenin izlenmesi.....	39

Tablo III.12. Mutantların (*gdi1*-14) karbon kaynağı olarak maltoz içeren seçici besi ortamlarındaki 2. ve 5. günde üreme durumları (- üreme olmadığını , + üreme olduğunu ifade etmektedir ; + işaretindeki artış üremenin göreceli olarak fazlalığını belirtmektedir).....41



ÖZET

Schizosaccharomyces pombe'de İnvertaz Aktivitesine İlişkin Çalışmalar

Bu çalışmada *Schizosaccharomyces pombe*'de, karbohidrat metabolizmasının düzenlenmesi süreciyle ilişkili olarak, sukrozun monomerlerine ayrılmasını kataliz eden invertaz enzimini şifreleyen gen(ler)in anlatımının glukoz baskılaması ile düzenlenmesi konusunda ön bilgiler sağlanması hedeflendi.

Bu amaçla yapılan çalışmalar kapsamında öncelikle invertaz sentezini baskılayan ($\geq\%$ 2) ve baskılamayan ($\% 0.1$) glukoz konsantrasyonları saptandı. Ayrıca diploid ve haploid hücrelerde yapılan analizlerde gen dozajının, invertaz sentezi açısından, glukoz baskılamasına karşı verilen yanıtta etkili olmadığı belirlendi.

Mutasyon çalışmalarında 1 saatlik etilmetansulfonat (EMS) ($\% 3$) uygulamasının ardından 2-deoksi-D-glukoz (2-DOG)'a karşı dirence göre yapılan seleksiyonla katabolit represyona dirençli olan 14 adet konstitütif invertaz mutanlığı (*gdi1-14*) (glukoz-baskılamasına *dirençli* invertaz mutanlığı) elde edildi. Mutantların hepsinin yabani tipe göre resesif olduğu ve biyosentez yollarına ilişkin mutasyon taşımadıkları saptandı. Hücre morfolojileri bakımından büyük çoğunluğu yabani tipe benzeyen mutantların bazılarında yalancı hif benzeri yapılar ve anormal hücre şekilleri gözlemlendi. Baskılayıcı ve baskılama yapmayan glukoz konsantrasyonlarında yapılan kantitatif invertaz aktivitesi tayinlerinde mutantlar, baskılamaya karşı gösterdikleri direnç derecelerine göre 3 grup altında toplandı. Bu gruplardan seçilen birer temsilciyle yapılan çalışmalarda, glukoz ve sukroz içeren sıvı besi ortamlarında mutantların yabani tipe göre daha yavaş ürettiği gözlemlendi. Glukoz içeren besi ortamında mutantlara ait kültürlerdeki üreme profilleri birbirine paralellik gösterirken, sukroz içeren ortamdaki üreme eğrileri bakımından kendi aralarında farklılıklar olduğu bulundu. Ayrıca maltozu kullanma yetenekleri açısından da değerlendirilen mutantların, 2-DOG'a direnç dereceleri bakımından kendi aralarında farklılıklar gösterdiği saptandı. Bununla birlikte mutantlarda maltoz ve sukrozun kullanımındaki katabolit represyona direnç derecelerinin paralellik göstermediği belirlendi.

Elde edilen bulguların çeşitli kaynaklardaki sonuçlarla da irdelenmesiyle, mutantlarda alternatif karbon kaynaklarının kullanımına ilişkin genel düzenleme aşamalarına ilişkin mutasyon(lar) yerine özgül olarak invertaz sentezinin düzenlenmesinde rol oynayan gen(ler)de meydana gelmiş ve büyük olasılıkla birden fazla farklı mutasyonun olabileceği şeklinde yorumlandı.

SUMMARY

Studies on the Invertase Activity in *Schizosaccharomyces pombe*

In this study we aimed to gain some preliminary information about the regulation of the invertase (catalysing the hydrolysis of sucrose to its' monomers) gene(s) expression by catabolite repression, which is also involved in the regulation of carbohydrate metabolism, in *Schizosaccharomyces pombe*.

Glucose concentrations that causes repression ($\geq 2\%$) and derepression (0.1%) of invertase synthesis have been determined at the first stage. We have also shown that gene dosage had no effect on the response to catabolite repression in terms of invertase synthesis.

We have isolated 14 constitutive invertase mutants (*gdi1-14*) (glucose-repression resistant invertase mutants) resistant to catabolite repression. The selection was made on the basis of 2-deoxy-D-glucose (2-DOG) resistance, following EMS (3% , 1 hour) mutagenesis. All of the mutants were found to be recessive for the wild type and none of the mutants have failed to grow on minimal agar indicating that they had no defects with the biosynthetic pathways. Some of the mutant cells, though most of them resemble to that of wild type, possessed abnormal cell morphology and pseudo-hyphaeal formations. Quantitative invertase assays performed either in repressing and derepressing conditions have lead us to categorize the mutants in 3 different groups according to their levels of resistance to repression. One representative for each group has been chosen and further studies were carried on with them. We have observed that mutant cell cultures have grown slower than the wild type on media containing glucose or sucrose. Although the growth profiles of the representative mutant cultures were found to be parallel with each other on glucose, their growth curves showed considerable differences when sucrose had been used as a carbon source. When the mutants have been tested for their ability to use maltose, we have observed that mutant cells had different levels of resistance to 2-DOG regarding their maltase activity. We have also determined that the levels of resistance to 2-DOG in mutants were not parallel for the utilization of maltose and sucrose.

In the light of other similar studies, these findings have lead us to conclude that there might have been more than one mutation that are exclusively involved in the regulation of invertase synthesis, rather than the general regulatory mechanisms related to the utilization of alternative carbohydrate sources.

I. GİRİŞ

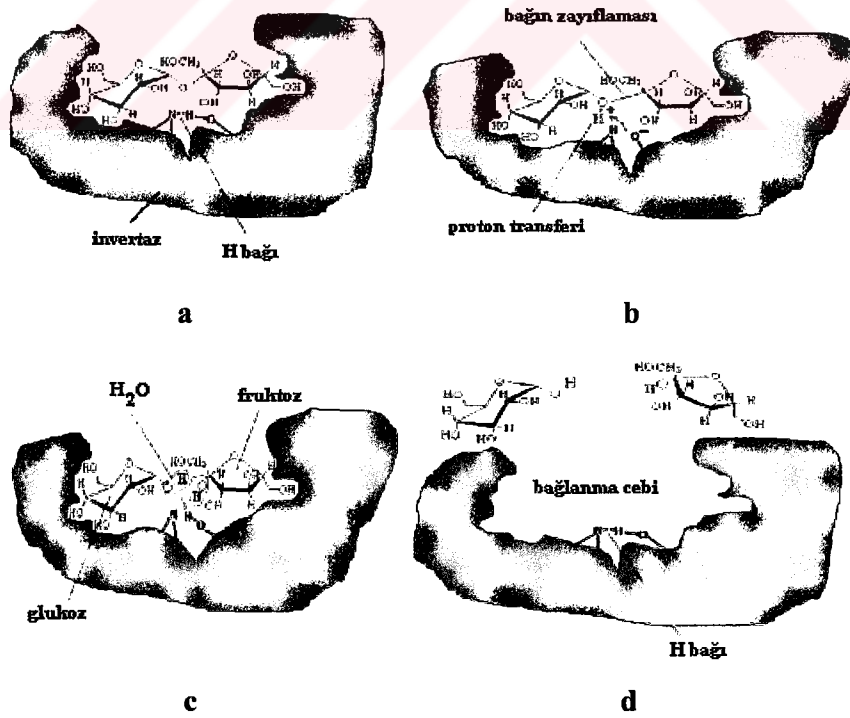
Canlı sistemlerde basit yapılı bileşenlerden biyomoleküllerin sentezlenmesi (anabolizma) ile besinler gibi karmaşık yapılı moleküllerin yıkımını (katabolizma) kapsayan ve karmaşık biyokimyasal reaksiyonlar ağından oluşan metabolizmada katabolik reaksiyonlarla elde edilen serbest enerji tüm metabolik işlevlerin sürdürülmesinde kullanılır. Bu açıdan değerlendirildiğinde biyolojik sistemlerin enerji gereksiniminin karşılandığı katabolik süreçler canlılık için kilit roller üstlenmektedir.

Doğada bol miktarda bulunan biyomoleküllerden olan karbohidratlar (sakkaritler) canlıların temel enerji kaynağını oluşturan bileşiklerdendir. Ayrıca, hücre yapısı öğeleri olarak da rol oynayan karbohidratların, son yıllarda yapılan araştırmalarla ökaryotik organizmalarda hormonlara benzer etkiler göstererek metabolik düzenleme süreçlerinde de sinyal molekülleri olarak çeşitli görevler üstlenebildiği ortaya konulmuştur [1,2]. Temel karbohidrat birimleri olan basit yapılı şekerler (monosakkaritler) arasında glukoz organizmaların büyük çoğunluğu tarafından tercih edilen bir karbon ve enerji kaynağıdır. Monosakkarit birimlerin birbirlerine glikozidik olarak bağlanmasıyla oluşan polisakkaritleri hücrelerin enerji kaynağı olarak kullanılabilmeleri için öncelikle bu polimerik molekülleri monomerlerine ayırmaları gerekir. Buna göre, karbon kaynağı olarak glukoz yerine polisakkaritlerden birinin ya da birkaçının bulunduğu ortamlarda hücrelerin canlılıklarını sürdürebilmesi organizmanın bu polimerlerin parçalanması sürecinde iş gören enzimleri sentezleyebilme yeteneğine bağlıdır. Bu süreçte hücreler için en ekonomik yol ortamda bulunmayan karbon kaynaklarının kullanımına ilişkin enzimlerin gereksiz yere sentezinden kaçınmak olacaktır. Bu açıdan karbohidratların kullanımına ilişkin düzenlenme mekanizmaları canlı sistemlerin önemli yetenekleri arasında yer alır.

Glukoz ortamda yeterli miktarda bulunduğu laktoz, sukroz ve maltoz gibi diğer şekerlerin hidrolizini gerçekleştiren enzimlerin sentezi baskılanır (glukoz baskılaması ya da katabolit represyon). Özellikle prokaryotlarda yapılan araştırmalarda organizmanın metabolik kapasitesine bağlı olarak katabolit represyonun diğer düzenleme mekanizmaları ile birlikte şeker kullanımının dengelenmesi sürecinde rol oynadığı belirlenmiştir. Buna göre, metabolik düzenlenme ağında iş gören bu süreç için, katabolit represyon yerine, daha doğru ve kapsamlı bir terim olarak “katabolik/metabolik dengeleme” ifadesinin kullanılması önerilmektedir [3]. Bu bağlamda sentezleri katabolit represyonla kontrol edilen enzimlerin model moleküller olarak kullanılmasıyla yapılan araştırmalar, hücrelerin enerji gereksinimlerinin karşılanmasında rol oynayan metabolik süreçler ve bu süreçlerde iş gören genlerin tanımlanması ve anlatımlarının düzenlenmesine ilişkin konuların aydınlatılabilmesi açısından önemli katkılar sağlayabilmektedir.

Doğada en yaygın bulunan disakkarit, sukroz (sakkaroz) (β -D-fruktofuranozil α -D-glukopiranozid) dur [1]. Halk arasında çay şekeri olarak da bilinen sukroz başlıca şeker kamışı ve şeker pancarından elde edilmekle birlikte melasta, meyvelerde ve fotosentetik bitki dokularında da bulunur [4]. Glukoz ve fruktoz alt birimlerinden oluşan sukroz, hücre tarafından kullanılacağı zaman, glikozil hidrolaz cinsi bir enzim olan invertaz (sukraz; β -D-frukto-furanozid fruktohidrolaz, EC 3.2.1.26) tarafından kataliz edilen bir reaksiyonla monomerlerine ayrılır [1].

Salgılanan tipte bir glikoprotein olan invertaz enziminin katalizlediği reaksiyonun mekanizması aydınlatılmıştır [5]. Substrat (sukroz) uygun 3 boyutlu yapısıyla enzimin bağlanma cebine yerleşir (Şekil I.1a). Enzimin yapısındaki bir aminoasitten, iki monosakkaridi bir arada tutan oksijene bir proton (H^+) transfer edilir. Bu H kaybı enzim cebinin genişlemesine ve enzime bağlanmış olan iki monosakkaridin yanlara doğru açılmasıyla aralarındaki bağın zayıflamasına neden olur (Şekil I.1b). Su molekülleri fruktoz ve glukozu bir arada tutan O köprüsüyle reaksiyona girer. Köprü kırıldığında proton yeniden enzimin yapısına transfer olur; sukroz, glukoz ve fruktoz alt birimlerine ayrılır (Şekil I.1c). Bu iki monosakkaridin üç boyutlu yapıları enzimin bağlanma bölgesine uygun konfigürasyonda olmadığı için cepten çıkarak serbest kalırlar. Enzim de eski yapısını kazandığı için yeni bir substratı bağlama yeteneğini kazanır (Şekil I.1d).

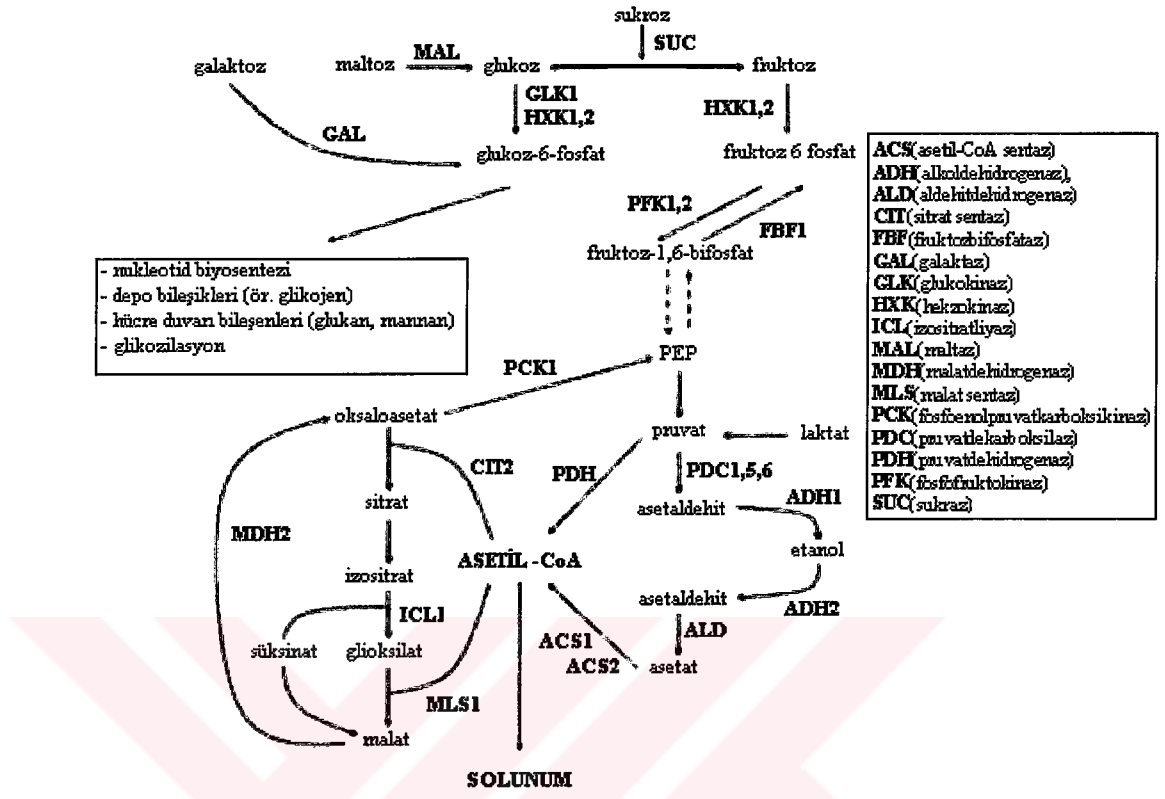


Şekil I.1. Invertaz enziminin katalizlediği reaksiyonun mekanizması [5]

Bakterilerden gelişmiş yapılı bitki ve hayvanlara kadar doğadaki organizma gruplarının büyük bir kısmı invertazı sentezleme ve buna bağlı olarak sukrozu karbon kaynağı olarak kullanabilme yeteneğine sahiptir [6]. İvertazın, sukrozun alternatif karbon kaynağı olarak kullanılmasına olanak vermesinin dışında, özellikle gelişmiş yapılı canlılarda başka önemli işlevleri de vardır. Örneğin bir çok bitki türünde fotosentez ürünlerinin depolanması ve bu ürünlerin yapraklardan diğer dokulara taşınması sukroz formunda olur [7]. Buna göre, invertaz enzimi sukrozun bitki dokularında uzun mesafeli taşınmasını sağlamaktadır. Ayrıca, bu şekerin solunum, hücre duvarı polisakkaritlerinin sentezi, savunma mekanizmasının uyarılması, hücre farklılaşması ve gelişimi gibi önemli süreçlerdeki rolünü kontrol etmektedir [8-11]. Memelilerde ise bağırsakta bulunan ve sukrozun sindiriminden sorumlu olan sukraz (invertaz) enziminin eksikliği, sukrozun sindirilememesine bağlı sindirim bozukluklarına neden olmaktadır [12]. Buna göre, invertaz enzimi şifreleyen genlerin anlatımlarının düzenlenmesine yönelik çalışmalar hücrelerdeki karbohidrat ve enerji metabolizmasının aydınlatılmasına ilişkin değerli katkılar sağlamaktadır [13-15].

Biyolojik öneminin dışında, özellikle maya kökenli invertaz besin endüstrisinde çeşitli şekerlemelerin ve kolay kristalleşmemesi nedeniyle tercih edilen fruktoz şuruplarının üretiminde kullanılmaktadır [16]. İvertaz enzimiyle ilgili çalışmalar daha çok endüstriyel bir maya olan *Saccharomyces cerevisiae*'de yoğunlaşmıştır. Özellikle endüstriyel amaca uygunluğu bakımından glukoz baskılamasına dirençli olan maya soylarının geliştirilmesi oldukça önem taşımaktadır [17].

Tek hücreli ve basit yapılı organizmalar olan mayalar ökaryotik sistemlere ait hücre ve moleküler biyoloji çalışmalarında model olarak tercih edilen sistemlerdir. Bu amaçla çok sıklıkla kullanılmakta olan, *Saccharomyces cerevisiae* maya türüne ait hücrelerde, diğer canlılarda olduğu gibi, ortamdaki kullanılabilir glukoz düzeyine göre bu karbon kaynağının kullanımına ilişkin metabolik süreçlerde önemli düzenlemeler gerçekleşir. Bu düzenlenme süreçleri karbon metabolizması, solunum, glukoneogenez, alternatif karbon kaynaklarının taşınması ve kullanımına ilişkin metabolik yolları kapsamaktadır [18] (Şekil I.2.).



Şekil I.2. *S. cerevisiae*'de şekerlerin kullanımını kapsayan metabolik yollar (18'den sadeleştirilerek)

İnvertaz enzimini şifreleyen genlerin anlatımı da katabolit represyonla (glukoz baskılaması) kontrol edildiğinden metabolik yollara ilişkin düzenlenme çalışmalarında bu enzim mayalarda model bir protein olarak sıklıkla kullanılmaktadır. İnvertaz, glikoprotein yapıda bir salgı proteini olması nedeniyle hem glikoproteinlerin işlenmesine yönelik çalışmalarda [19,20] hem de proteinlerin hücre içi taşınması, salgı yolları ve çeşitli sinyal moleküllerin araştırılmasında [21,22] uygun bir işaret protein olarak kullanılmaktadır.

S. cerevisiae'de invertaz enziminin sentezinden, her biri farklı kromozomda bulunan 6 adet yapısal genden (*SUC1-SUC5* ve *SUC7*) oluşan *SUC* gen ailesi sorumludur ve bu gen ailesi içinde üzerinde en çok çalışılmış olan gen *SUC2*'dir [23,24]. Haploid bir hücrenin genomunda hiç bir *SUC* geni bulunmayabildiği gibi (doğal negatif alleller) bir veya birden fazla *SUC* geni de bulunabilmektedir [25].

S. cerevisiae'de, yüksek oranda glikozillenmiş olan ve periplazmik alana taşınan dışsal tip ve sitosolde bulunan glikozillenmemiş içsel tip olmak üzere, invertazın iki biçimi bulunmaktadır. Dışsal tipin sentezi katabolit represyonla kontrol edilmekte, içsel tip ise düşük düzeylerde konstitutif olarak sentezlenmektedir. Her iki tip de aynı gen tarafından şifrelenmekte ancak başlangıç kodonlarındaki farklılığa bağlı olarak farklı mRNA ürünleri (5' ucunda sinyal peptid şifreleyen dizi bulunan dışsal tip 1.9 kb , içsel tip 1.8 kb) meydana gelmektedir. mRNA'lardaki bilgiler protein haline çevrildikten sonra yapısına karbohidrat bakiyeleri eklenen tip periplazmik alana taşınmakta buna karşılık diğeri sinyal peptid içermediğinden sitosolde kalmaktadır [26] .

Son yıllarda ökaryotik hücre ve moleküler biyoloji çalışmalarında *S. cerevisiae*'nin yanı sıra, onunla aynı sınıftan (Ascomycota) bir başka maya türü olan *Schizosaccharomyces pombe* de geniş çapta kullanılmaya başlanmıştır. Normal yaşam çevriminde haploid olan *S. pombe* hücreleri, memeli hücrelerindeki gibi ana hücrenin ortasında bir septum oluşumuyla iki eşit parçaya ayrılarak çoğalırlar [27]. *S. pombe*'nin generasyon süresi, laboratuvar koşullarında, 30°C'da, kullanılan besi ortamının içeriğine ve hücrelerin genetik yapısına bağlı olarak 2-4 saat arasında değişmektedir [28].

S. pombe hücrelerinin kendi aralarında eşleşebilen homotallik (h^{90}) ve karşı eşey tiplerinin eşleşme gösterdiği heterotallik (h^+ ve h^-) eşey tipleri vardır [29]. Besin açlığının eşleşmeyi teşvik ettiği koşullarda iki hücrenin kaynaşmasıyla oluşan diploid zigotta mayoz bölünme sonrasında bir askus içinde bulunan 4 adet haploid askospor meydana gelir; askus çeperinin parçalanmasıyla serbest kalan sporlar uygun koşullarda bölünerek haploid klonları meydana getirir [28,29]. 3 kromozoma sahip olan [29] bu maya türünün 4824 adet gen şifrelediği saptanan 13,8 Mb boyutundaki genomunun dizilenmesi tamamlanmıştır [30]. Genom boyutunun küçük olması [28], genlerin yapısal ve işlevsel analizlerine yönelik çalışmalarda kolaylık sağlamaktadır. Ayrıca normal yaşam çevrimlerinde haploid olmaları da genlerdeki mutasyonların etkilerinin fenotipte izlemesine olanak vermektedir. Bunun yanı sıra, bazı koşullarda diploid duruma da geçebilmeleri [29], özellikle alleller arasındaki etkileşimlerin izlenmesi açısından avantajlar sağlamaktadır.

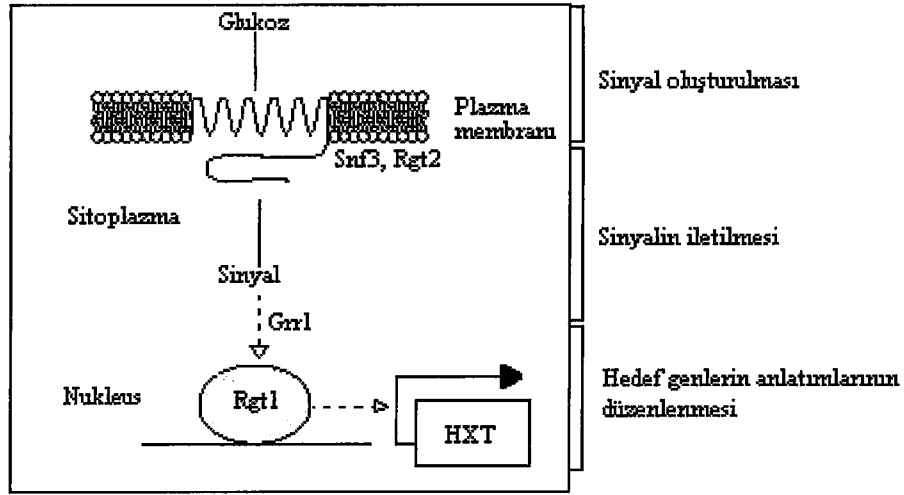
S. pombe ve *S. cerevisiae*'nin, taksonomik olarak aynı sınıfta yer almalarına karşılık, evrimsel açıdan birbirlerine çok yakın olmadıkları belirlenmiştir. Protein dizisi karşılaştırmaları sonucunda evrim ağacında *S. cerevisiae*'nin *S. pombe*'ye ancak memeliler kadar yakın olduğu düşünülmektedir [28]. *S. pombe* genetik, biyokimyasal ve moleküler düzeydeki çeşitli özellikleri açısından çok hücreli ökaryotlara, özellikle memelilere, benzerlikler gösterdiğinden, gelişmiş yapıli türlerde genlerin yapısının, işlevinin ve düzenlenmesinin araştırılmasına yönelik çalışmalar için uygun bir model organizma olarak kabul edilmektedir [28,29]. Örneğin, kromozom yapısı ve hücre çevrimi açısından memeli hücrelerine benzerlik göstermektedir; moleküler düzeyde memeli genlerine ait intronların *S. pombe*'de doğru biçimde kesilebildiği gösterilmiştir;

ayrıca, memeli genlerine ait promotörlerin ve poli(A) sinyallerinin *S. pombe*'de işlevsel olmasına karşılık *S. cerevisiae*'de tanınmadığı anlaşılmıştır [28].

Bu maya türü, organizmaların çoğu gibi, karbon kaynağı olarak glukozu tercih etmektedir. Ayrıca laktoz ve sellobioz gibi karbon kaynaklarını kullanamamakla birlikte maltoz, sukroz vb şekerleri başarılı şekilde kullanabilmektedir [31]. *S. pombe*'de, sukrozu kullanabilmesine bağlı olarak, invertaz aktivitesi gösterilmiştir [32] ve bu türde invertazın membran dışına salınan tek bir tipinin bulunduğu belirlenmiştir [33]. İzole edilen ve saflaştırılan enzimin 205 kDa molekül ağırlığında olduğu ve kütlesinin %67'si oranında karbohidrat bakiyesi (mannoz:galaktoz 1:1) içerdiği belirlenmiştir [34]. Enzim, karbohidrat bakiyesinin kompozisyonu bakımından da *S. cerevisiae*'den çok, gelişmiş yapılı ökaryotlara benzemektedir [34].

Dizi homolojisi temel alınarak yapılan PCR uygulamasıyla, *S. pombe*'nin 3. kromozomunda *S. cerevisiae*'ninkine %38 benzerlik gösteren bir gen bölgesi izole edilmiş ve bu genin (*inv1*) *S. pombe*'de invertazın sentezinden sorumlu olduğu gösterilmiştir [35]. Ek olarak, *S. pombe* genomunda, homoloji temeline göre saptanmış, 1. kromozomda yer alan ve invertazla ilişkili olduğu var sayılan bir açık okunma çerçevesine (ORF) daha işaret edilmektedir [36]. Bununla birlikte, bu bölgenin fonksiyonu henüz kanıtlanmadığından bu mayada invertaz sentezinden sorumlu bir gen ailesinin veya başka gen(ler)in bulunup bulunmadığı henüz bilinmemektedir.

Katabolit represyonun etkili olduğu metabolik yollarda, bu düzenlenmenin meydana gelmesinde çeşitli düzenleyici molekül kompleksleri rol oynamaktadır. Bu süreçte ilk aşama hücre dışındaki glukozun algılanması ve sinyal oluşturulmasıdır. Daha sonra bu sinyal sitoplazmadan nukleusa iletilir ve ardından transkripsiyon faktörlerinin teşvik edilmesi veya baskılanması tetiklenir [14]. *S. cerevisiae*'de yapılmış çeşitli çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, glukoz konsantrasyonuna bağlı düzenlenmeyi gösteren bir şema Şekil I.3.'de verilmiştir. Bu genel düzenlenmenin dışında, değişik katabolik enzimlerin sentezlenmesinin düzenlenmesi süreçlerinde rol oynayan düzenleyici genlerin ve ürünlerinin farklılık gösterebildikleri de bilinmektedir [14,35,37].



Şekil I.3. *S. cerevisiae*'de heksoz taşıyıcı (HXT) genlerinin anlatımının glukoz tarafından düzenlenme yolu (Kesiksiz ok işareti pozitif kontrolü, kesikli ok ise negatif kontrolü simgelemektedir. Snf3p ve Rgt2p glukoz sensörleri olarak iş gören membran proteinlerini, Rgt1p DNA'ya bağlanarak çeşitli şekillerde işlev görebilen düzenleyici proteini, HXT heksoz taşıyıcıları göstermektedir) ([14] ve [38]'den değiştirilerek).

S. pombe'de de invertazı şifreleyen genin (*inv1*) anlatımı katabolit represyonla düzenlenmektedir. Bununla birlikte, hücrelerde baskılayıcı glukoz konsantrasyonlarında bile çok düşük düzeylerde (bazal) invertaz aktivitesinin varlığı gösterilmiştir [32]. Ancak, invertaz sentezinin düzenlenmesinde katabolit represyonun ayrıntılı mekanizması ve bu düzenleme sürecinde rol oynayan düzenleyici genler ve ürünleri hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır. Sadece bu mayada glukoz baskılamasının meydana gelmesinde düzenleyici rol oynadığı anlaşılan bir gen (*scr1*) tanımlanmıştır [35]. Katabolit represyonda baskılayıcı etkiye sahip bir proteini şifreleyen bu genin delesyonunun invertaz sentezi üzerindeki glukoz baskılamasını da ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. Ancak, bu genin delesyonu, *S. pombe*'de anlatımı katabolit represyonla kontrol edilen ve glukoneogenik bir enzimi şifreleyen fruktoz 1,6-bifosfataz (*fbp1*) geninin üzerindeki glukoz baskılamasını yok etmemektedir. *fbp1*'in anlatımının düzenlenmesinde cAMP düzeyi önemli rol oynamaktadır. Buna karşılık adenilat siklaz aktivitesi göstermeyen soylarda *inv1* geninin konstitütif olarak anlatım yapmaması, cAMP'nin invertaz sentezinin düzenlenmesinde etkili olmadığının kanıtı olarak değerlendirilmektedir [35].

Diğer taraftan, *S. cerevisiae* kökenli *SUC2* geninin *S. pombe*'de heterolog anlatımının başarılı şekilde meydana geldiği, buna karşılık *S. cerevisiae* invertazının bu yabancı konakta baskılayıcı glukoz konsantrasyonlarında bile konstitütif olarak sentezlendiği belirlenmiştir [39]. Bu bulgulardan da anlaşıldığı gibi taksonomik açıdan yakın olsalar bile farklı organizmalarda (örneğin *S. cerevisiae* ve *S. pombe*) aynı metabolik yollardaki düzenleme mekanizmaları bazı farklılıklar gösterebilmektedir. Bunun yanı sıra, aynı organizma içinde de benzer metabolik yollara ilişkin enzimlerin sentezlerinin düzenlenmesi sürecinde değişik düzenleyici moleküller rol oynayabilmektedir[14,18,19,35].

Bu çalışmada, *S. pombe*'de sentezi katabolit represyonla kontrol edilen invertaz enzimini şifreleyen gen(ler)in anlatımlarının düzenlenmesine ilişkin ön bilgilerin elde edilmesi amaçlandı. Bu kapsamda, bu maya türünde büyük olasılıkla özgül olarak invertaz sentezi bakımından katabolit represyona dirençli oldukları düşünülen konstitütif mutantlar ilk kez elde edildi. Bu mutantlarda morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve genetik düzeyde bazı analizler yapıldı. Ek olarak, gen dozajının invertaz sentezi açısından katabolit represyondaki etkisi incelendi. Elde edilen bulguların, ökaryotlar için uygun bir model organizma olan *S. pombe*'de katabolit represyon ve dolayısıyla karbohidrat metabolizmasının düzenlenmesine ilişkin bazı ipuçlarının ortaya konulmasına yardımcı olacağı düşünüldü.

II. MALZEME VE YÖNTEM

II. 1. Organizmalar

Çalışma mantarların Ascomycota sınıfına ait olan *Schizosaccharomyces pombe* Linder *liquifaciens* maya türünde gerçekleştirildi. Bu mayanın çalışmada kullanılan ve İ.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonunda bulunan soylarına ait özellikler Tablo II.1.' de verildi.

Tablo II. 1. Çalışmada kullanılan *S. pombe* soylarının özellikleri

Soylar	Özellikleri
972h ⁻	Yabani tip
975h ⁺	Yabani tip
meiB102 (mat2-B102)	Mayoz bölünme kusurlu
lys7	Lizin oksotrofu

II. 2. Besi ortamları

Organizmanın üretilmesinde, diploid *S. pombe* soyunun elde edilmesinde, fenotipik kontrollerin yapılmasında ve hücrelerdeki invertaz enzimi düzeylerinin saptanmasında kullanılan besiy ortamlarının içerikleri Tablo II.2. ve Tablo II.3.' de verildi.

Tablo II. 2 . MML, MMA ve SPA besiy ortamlarında kullanılan stok çözeltiler

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

Tablo II. 3. Çalışmada kullanılan besi ortamları
(Stok A₂, 3a ve 3b' nin içerikleri **Tablo II.2.** de verildi.)

Besi Ortamı	İçerik
Maya özütü sıvı besi ortamı (YEL)	Maya özütü (Difco) 5 g/l Glukoz (Merck) 30 g/l
Maya özütü katı besi ortamı (YEA)	YEL besi ortamına Agar (Difco) eklendi 20 g/l
Minimal sıvı besi ortamı (MML)	Stok A ₂ 100 ml/l Stok 3a 1 ml/l Stok 3b 1 ml/l Glukoz 10 g/l Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O 1 g/l
Minimal katı besi ortamı (MMA)	MML besi ortamına Agar (Difco) eklendi 20 g/l
Sentetik katı sporulasyon besi ortamı (SPA)	Glukoz 10 g/l KH ₂ PO ₄ 1 g/l 3a 1 ml/l 3b 1 ml/l Agar 30 g/l
Maya özütü ve peptonlu sıvı besi ortamı (YP)	Maya özütü 10 g/l Pepton 20 g/l
Malt özütü katı besi ortamı (MEA)	Malt özütü 30 g/l Agar 20 g/l

Tüm besi ortamları otoklavda 121°C'da (1 atmosfer basınçta) 20 dakika tutularak steril edildi.

S. pombe soylarının çalışma süresince üretilmesi ve saklanması için zengin katı besi ortamı (YEA), genotip kontrolü için minimal katı besi ortamı (MMA) ve diploidlerin elde edilmesinde sentetik spor oluşturma katı besi ortamı (SPA) kullanıldı

II.3. Organizmanın üretimi ve saklanması

S. pombe'nin üretimi, genotipik kontrolü ve saklanması Gutz ve ark. (1974) [29]'nın önerdikleri yöntemler kullanıldı. Silika jel içinde 4°C' da saklanan stok kültürlerden alınan örnekler YEA'da 30°C' da yaklaşık 3 gün üretildi. Kültürlerden öze ile alınan örnekler MMA'ya azaltma yöntemi ile ekildi. Bu aşamada stoklardan üretilen hücrelerin prototrof olup olmadıkları belirlendi. Tek düşen kolonilerden rasgele seçilen birkaç koloni eğri YEA besi ortamlarına aktarılacak şekilde 30°C' da yaklaşık 3 gün tutularak saf kültürleri elde edildi. Saf kültürler 4°C' da saklandı ve çalışma boyunca 3-6 ayda bir saflık kontrolleri yapıldı.

II.4 Stabil diploid *S. pombe* soylarının elde edilmesi

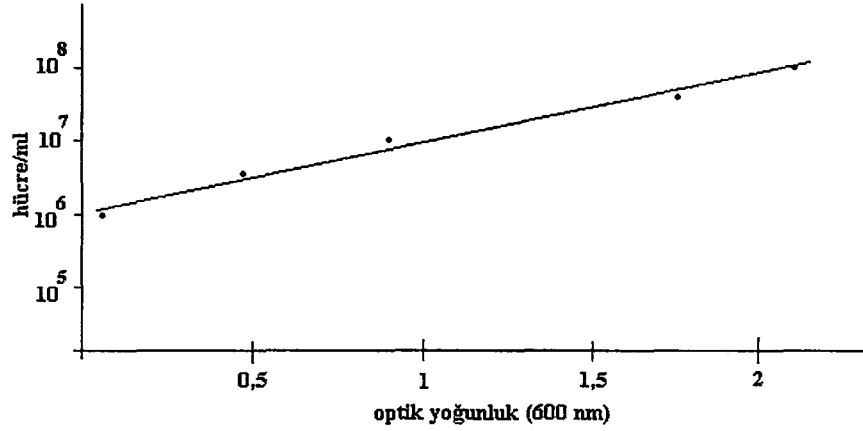
Stabil diploid hücrelerin elde edilmesi amacıyla *S. pombe*'nin mei B102 mutanlığı kullanıldı. Mayoz bölünme kusurlu olan bu soy, h^+ soyları ile eşleştiğinde sporlar oluşturmaktadır. Buna karşılık h^- soyları ile eşleştiğinde meydana gelen zigot mayoz geçiremediği için hücreler diploid olarak kalmaktadır [40].

S. pombe 972 h^- ve mei B102 haploid soylarının YEA'da üretilen 3 günlük eğri kültürleri, mililitresinde 10^8 hücre bulunacak şekilde steril saf su ile süspansiyon haline getirildi. Farklı soyları içeren her bir tüpten eşit hacim alınıp bir tüpte karıştırıldıktan sonra karışımdan 0,1 ml alındı ve eğri SPA üzerine ekildi. Zigot oluşumu için 25°C'da 3 gün bırakıldı. Kültürün 10^{-1} ve 10^{-2} sulandırımından 0,1 ml alınıp magdala kırmızısı (Phloxin B) (20mg/l) içeren MMA besi ortamına yayma yöntemiyle ekim yapıldı ve 30°C'da 5 gün üremeye bırakıldı. Magdala kırmızısı içeren besi ortamında diploid koloniler koyu pembe renkli olmalarıyla seçildiler. Seçilen kolonilerden alınan hücre örnekleri mikroskopta morfolojik açıdan incelenerek doğrulandı.

II.5. Diploid ve haploid *S.pombe* soylarında üremenin izlenmesi

Zamana bağlı olarak üremeleri izlenecek olan soylar önce eğri YEA'da 30°C'da 3 gün üremeye bırakıldı. Kültürdeki hücreler 5 ml steril saf su ile süspansiyon haline getirildikten sonra, YEL besi ortamına 10^6 hücre/ml olacak şekilde inokulum yapılarak çalkalamalı inkübatörde 180 devir/dakika hızda ve 30°C'da üremeye bırakıldı.

Kültürdeki üreme, spektrofotometrede (Shimadzu UV-160) 600 nm dalga boyundaki ışık kullanılarak belirli zaman aralıklarında (2 saatte bir) bulanıklık ölçümleri ile izlendi. Her ölçüm için kültürden bir defada iki örnek alınıp spektrofotometrede iki ayrı ölçüm yapıldı ve hesaplamalarda ortalama değerler kullanıldı. Deneyler iki tekrarlı olarak yapıldı. Optik yoğunluk (OD) cinsinden elde edilen değerleri hücre/ml cinsine çevirmek için, aynı hücre soyuna ait kültürün, mililitresindeki hücre sayısı bilinen çeşitli sulandırımının 600 nm'de ölçülen OD değerlerine göre çizilen standart grafikten (Şekil II.1.) yararlanıldı.



Şekil II.1. Mililitresindeki hücre sayısı bilinen hücre süspansiyonlarının 600 nm'deki optik yoğunluklarına göre çizilen standart grafik

II.6. Generasyon sayısının ve süresinin hesaplanması

Logaritmik üreme sırasında hücrelerin kaç bölünme geçirdiğinin ifadesi olan generasyon sayısının hesaplanması için aşağıdaki formülden yararlanıldı [41].

$$\text{Generasyon sayısı (n)} = \frac{\log N_2 - \log N_1}{\log 2}$$

N_2 = logaritmik üreme sonundaki hücre sayısı

N_1 = kültürde üremenin başlangıcındaki hücre sayısı

Hücrelerin logaritmik üreme sırasında iki katına çıkmaları için gerekli süre olan generasyon süresinin (S_t) hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı [42].

$$S_t = (T_2 - T_1) / n$$

T_2 = logaritmik üremenin bitiş zamanı

T_1 = logaritmik üremenin başlama zamanı

n = generasyon sayısı

II.7. İnvvertaz aktivitesinin saptanması

S. pombe hücrelerinde invertaz aktiviteleri Goldstein & Lampen (1975)' [43] in geliştirdiği yöntemle, sukroz içeren ortamda invertaz enzimi aktivitesine bağlı olarak ortaya çıkan glukoz miktarının ölçülmesiyle kantitatif olarak saptandı. Glukoz miktarının saptanmasında ticari bir kit (Fluitest®GLU , Biocon) kullanıldı. Ölçüm ve hesaplamalar üretici firmanın önerilerine uygun şekilde yapıldı..

Eğri YEA besi ortamında üretilen *S. pombe* soyları steril saf su ile süspansiyon haline getirildi. Hücre süspansiyonundan YEL besi ortamına yaklaşık 7×10^5 hücre/ml olacak şekilde inokulum yapılarak çalkalamalı inkübatörde 180 devir/dakika hızda 30°C'da üremeye bırakıldı. Logaritmik evrenin ortalarında olan ve 600 nm dalga boyunda yaklaşık 1 OD verecek yoğunluktaki hücre kültüründen 3500 devir/dakika hızda 3 dakika santrifüjlemeyle hücreler toplandı. Hücre çökeltisi, eşit hacimde steril saf su ile süspansiyon haline getirildi ve tekrar santrifüj edilerek hücreler toplandı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Elde edilen hücre çökeltisi, karbon kaynağı içermeyen eşit hacimdeki YP ile süspansiyon haline getirildi.

Bu süspansiyon kullanılarak, belirlenen konsantrasyonlarda glukoz (Bölüm III.1.3.) ve/veya diğer bileşikleri (Bölüm III.2.2.) içeren 5'er ml 'lik hücre süspansiyonları hazırlandı; çalkalamalı inkübatörde 150 devir/dakika hızda 30°C'da 2 saat tutuldu. İnkübasyon sonunda, 4°C'da santrifüjleme yapılarak hücreler toplandı. Hücrelerin parçalanması ve lizattaki invertaz aktivitesi tayini Rothe & Lehle (1998)' [22] nin kullandıkları yöntemle göre yapıldı. Tüm işlemler aksi belirtilmedikçe buzda gerçekleştirildi. Hücreler eşit hacimde steril saf su ile ikişer kez ve daha sonra eşit hacimde steril 50mM sodyum asetat (pH5) çözeltisiyle ikişer kez yıkandı. Santrifüj edilerek toplanan hücreler 250 µl parçalama tamponu [2mM PMSF (fenilmetilsülfonilflorür) 50mM sodyum asetat (pH5,2)] içinde süspansiyon haline getirildi. Hücre süspansiyonundan alınan örneklerin (1/20) sulandırımalarında OD₆₀₀ değerlerine bakılarak hücre yoğunlukları belirlendi. Süspansiyonun 200 µl'si üzerine 0,50 g steril cam boncuk (0,45 mm çaplı) eklenerek yaklaşık ikişer dakikalık sürelerle tüp karıştırıcısında tutulup, uygun süre sonunda (yaklaşık 25 dakika) hücrelerin mekanik yöntemle parçalanması sağlandı.

Lizat 11 000 devir/dakika hızda 4°C' da 15 dakika santrifüj edildi. Her bir tüpten 50'şer µl üst sıvı alınarak içlerinde 200 µl 200mM sukroz bulunan tüplere koyuldu ve 30°C' da 15 dakika bekletildi. Tüplere 50'şer µl 1M Tris-HCl (pH 8,8) eklenerek reaksiyon durduruldu (bu aşamada her bir tüpteki toplam hacim 300 µl dir). Son aşamada, her reaksiyon tüpünden alınan 10 µl örnek, içerisinde ticari kitteki glukoz saptama çözeltisinden ("enzyme reagent") 990 µl bulunan mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Tüpler 37°C' da 15 dakika bekletildi. Son olarak 546 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapılarak OD değerleri kaydedildi. Ölçümlerde kör olarak glukoz saptama çözeltisi (0.5 M fosfat tamponu (pH 7.5), 7.5 mM fenol, 12000ünite/ml glukoz oksidaz, 660 ünite/ml peroksidaz, 0.4 mM 4-amino antipirin) kullanıldı.

İnvertaz Aktivitesinin Hesaplanması

Spektrofotometrede elde edilen OD değerlerinden gidilerek aşağıda verilen matematiksel işlemlerle 10µl hacimdeki örnekte bulunan, invertaz enziminin 200 mM sukroz çözeltisinden 1 dakikada açığa çıkardığı, glukoz miktarı (G_A), hesaplandı.

$$G_A = \frac{\text{Örneğin 546 nm' deki ortalama OD'si}}{\text{Glukoz standardının 546 nm' deki ortalama OD'si}} \times \text{standardın konsantrasyonu}$$

(kitte bulunan glukoz standardının konsantrasyonu = 0,556µM)

Elde edilen G_A değerinden (µM glukoz / 10µl / 15 dak.) gidilerek, 300µl hücre süspansiyonunda bulunan invertaz tarafından 1 dakikada açığa çıkarılan glukoz miktarı (µM) hesaplandı.

Her bir deney serisindeki farklı reaksiyon ortamlarında ardışık işlemler sırasında olası hücre sayısı farklılıklarından kaynaklanabilecek sapmaları gidermek amacıyla elde edilen değer, OD_{600} de saptanmış olan hücre yoğunluklarına bölündü. Buna göre invertaz aktivitesi değeri µM glukoz/dak./300µl hücre süspansiyonu cinsinden verildi.

II.8. İnvertaz sentezinin baskılanmadığı glukoz konsantrasyonunun saptanması

S. pombe hücrelerinde invertaz sentezinin baskılanmadığı glukoz konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla % 0.025 , 0.05 , 0.1 , 0.15 , 0.25 , 0.5 , 1 , 2 , 5 ve 10 konsantrasyonunda glukoz içeren inkübasyon ortamlarında tutulan örneklerde **Bölüm II.7.** de anlatıldığı şekilde invertaz aktiviteleri ölçüldü. Kontrol olarak glukoz içermeyen ortamda tutulan örnekler kullanıldı. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapıldı.

II.9. Glukoz baskılamasına dirençli mutantların elde edilmesi

Glukozun baskılayıcı konsantrasyonuna dirençli mutant soyların elde edilebilmesi amacıyla fiziksel mutagen olarak ultraviyole (UV) ışık, kimyasal mutagen olarak da etilmetansulfonat (EMS) kullanıldı.

II.9.1. UV' nin *S. pombe* hücrelerinde yaşama yeteneği üzerine etkisi

Ultraviyole ışınların öldürücü dozlarının saptanmasında Galli ve Schiestl (1995)'in [44] geliştirdikleri yöntem kısmen değiştirilerek kullanıldı. Eğri YEA' da 30°C' da üretilmiş olan 3 günlük *S. pombe* 972h⁻ kültürü 5 ml steril saf su ile süspansiyon haline getirildi. 10⁴ hücre/ml olacak şekilde sulandırılan hücre süspansiyonundan 10 ml alınarak steril petri kabına koyuldu. 254 nm dalga boyunda UV ışık kullanılarak 3,5 erg/m² (V. Lourmat) saniye şiddetinde UV radyasyon dozu uygulandı. Hücre süspansiyonu karanlıkta 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 ve 60 saniyelik sürelerle UV ışık etkisinde bırakıldı. Belirtilen sürelerin sonunda hücre süspansiyonlarından 100'er µl alınarak YEA içeren petrilere çeşitli sulandırmalarda yayma yöntemiyle ekim yapıldı. 30 °C'da 4-5 günlük üreme sonucu oluşan koloniler sayıldı. Kontrol grubu olarak, aynı süspansiyondan UV etkisinde bırakılmamış hücreler kullanıldı. UV uygulamaları sonucunda üreyen koloni sayıları kontrol grubundakilere oranlanarak, UV dozlarının öldürücülük etkileri belirlendi.

II.9.2. EMS'nin *S. pombe* hücrelerinde yaşama yeteneği üzerine etkisi

Eğri YEA' da 30°C' da üretilmiş olan 3 günlük *S. pombe* 972h⁻ kültüründen 5 ml steril saf su ile yapılmış hücre süspansiyonundan YEL besi ortamına yaklaşık 10⁶ hücre/ml olacak şekilde inokulum yapıldı. 30°C' da 180 devir/dakika hızda çalkalanarak 1 gece üretildi. Ertesi gün hücre sayımı yapıldı ve 10⁹ hücre steril santrifüj tüpüne aktarıldı. 3000 devir/dakika hızda 2 dakika santrifüjlenerek hücreler toplandı ve 10 ml steril saf su ile süspansiyon haline getirilip tekrar santrifüjlendi. Yıkama işlemi 2 kez tekrarlandı. Ardından hücreler 1 kez de 10 ml steril 0.1 M NaH₂PO₄ (pH 7) tamponuyla yıkandıktan sonra tekrar 10 ml aynı tamponda süspansiyon haline getirildi. 1'er ml hücre süspansiyonu 10 ml hacmindeki steril cam tüplere konuldu. Tüplere 30'ar µl EMS eklendi*. Uygulama 30°C 'da 180 devir/dakika hızda çalkalamalı inkübatörde 30, 60, 90, 120 ve 180 dakika sürelerde yapıldı. Kontrol olarak, eş değer koşullarda tutulmuş EMS eklenmemiş hücre süspansiyonları kullanıldı. Belirtilen sürelerin sonunda tüplerin içeriği mikro santrifüj tüplerine aktarılarak 3000 devir/dakika hızda 2 dakika santrifüjlendi ve hücreler toplandı. Hücre çökeltileri üzerine 1'er ml steril saf su eklenerek süspansiyon haline getirildi ve yeni tüplere aktarıldı. Santrifüjleme ile yeniden toplanan hücreler 1'er ml % 5'lik steril sodyum tiyosülfat ile süspansiyon haline getirildi ve hücre süspansiyonları yeni tüplere aktarıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Ardından hücreler bir kez daha steril saf su ile yıkandıktan sonra kontrol ve deney gruplarına ait çeşitli sulandırmalardan YEA içeren petrilere yayma ekim yapıldı. 30 °C'da 4-5 günlük inkübasyondan sonra oluşan koloniler sayıldı ve kontrol grubundaki koloni sayıları ile karşılaştırma yapılarak öldürücülük dozları saptandı [45].

* EMS kuvvetli bir mutagen olduğu için deney sırasında eldiven kullanıldı ve EMS ile bulaşmış olan tüm materyal %5'lik sodyum tiyosülfat çözeltisi ile nötr duruma getirildi.

II.9.3. Mutagenез ve mutantların seleksiyonu

UV ışığın ve EMS'nin yaklaşık % 50-95 arasında öldürücülük etkisi yaratan konsantrasyonlarının kullanımıyla Bölüm II.9.1. ve II.9.2.'de açıklandığı şekilde yapılan uygulamalar sonucunda ortaya çıkacak glukoz baskılamasına dirençli invertaz mutantlarının seleksiyonu için 2 ayrı yöntem kullanıldı.

II.9.3.1. İnvvertaz aktivitesinin koloni yüzeyinde yarı kantitatif olarak gösterilmesi

Bu amaçla, Paravicini ve ark. (1992)'nin [46] geliştirdikleri yöntem kullanıldı. Yöntemin temeli, invertaz aktivitesine bağlı olarak açığa çıkan glukozdan, glukoz oksidaz ve peroksidaz enzimlerinin etkisiyle (invertaz enzimini sentezleyebilen) kolonilerin yüzeyinde ve çevresinde kırmızı rengin saptanmasına dayanmaktadır. Hücreler belirlenen dozlarda mutagen etkisinde bırakıldıktan sonra baskılayıcı konsantrasyonda glukoz içeren zengin katı besi ortamına (YEA) yaklaşık 250 koloni/petri olacak şekilde yayma yöntemiyle ekim yapıldı. Petriler 30°C'da 3-5 gün bekletildi. Kontrol grubu olarak mutagen etkisinde bırakılmamış yabani tipteki hücreler kullanıldı. Oluşan koloniler petri kopyalama ("replica plating") yöntemi ile YEA besi ortamına aktarıldı. 125 mM sukroz, 100 mM sodyum asetat (pH 5.5), 10 µg/ml turp bitkisi peroksidazı ("horseradish peroxidase"), 8 ünite/ml glukoz oksidaz, 2 mM O-dianizidin içeren çözelti, eşit hacimde iki kez saflaştırılmış su ile hazırlanan, % 2.4'lük agarın yaklaşık 50°C'deki çözeltisiyle karıştırıldı. Elde edilen bu karışım soğumadan kopya petrilere, kolonilerin yüzeyini örtecek miktarda döküldü. İnvvertaz aktivitesine sahip olan hücreleri içeren kolonilerin yüzeyinde ve çevresinde kırmızı rengin oluşması için oda sıcaklığında yaklaşık 5 dakika beklendi.

II.9.3.2. 2-Deoksi-D-Glukoz ile seleksiyon

Bu seleksiyon yönteminin temeli bir glukoz analogu olan 2-deoksi-D-glukoz (2-DOG)'un glukoz etkisi göstererek katabolit represyona neden olmasına dayanır [17]. 2-DOG hücre içinde 2-DOG-6-fosfat şeklinde fosforilasyona uğradıktan sonra diğer metabolik aşamalara girememekte ve karbon kaynağı olarak kullanılamamaktadır. Bununla birlikte, glukoz etkisi göstererek sukroz ve maltozun kullanımı gibi katabolit represyon ile kontrol edilen metabolik yollarda baskılamaya neden olmaktadır [17, 47].

2-DOG'un seleksiyonda kullanılacak konsantrasyonunu saptamak amacıyla 100, 250, 500 ve 1000 µg/ml'lik konsantrasyonları denendi [17]. Bu koşullar altında tutulan hücrelerdeki invertaz düzeyleri Bölüm II.7.'de açıklandığı gibi kantitatif olarak ölçüldü. Bu deney için 3 farklı kontrol grubu hazırlandı: K1 (baskılama yapmayan konsantrasyonda glukoz içeren ortam), K2 (baskılayıcı konsantrasyonda glukoz içeren ortam) ve K3 (glukozun baskılama yapmayan konsantrasyonuna eş değer fruktoz içeren ortam). 2-DOG'un, yukarıda belirtilen konsantrasyonlarının invertaz enzimi sentezini baskılama dereceleri K1'de ölçülen invertaz miktarları temel alınarak değerlendirildi.

2-DOG'un belirlenen baskılayıcı konsantrasyonunun katı ortamda gerçekleştirilecek seleksiyon sürecinde de etkili olup olmayacağını kesinleştirilmesi için deney katı ortamlarda da tekrarlanarak kontrol edildi. Bu amaçla glukoz içermeyen YEA besi ortamına (5 mg/ml maya özütü ve 20 mg/ml agar) , final konsantrasyonu % 3 olacak şekilde sukroz (filtre ile steril edilmiş) ve baskılayıcı konsantrasyonda 2-DOG eklenerek seçici bir ortam oluşturuldu. Kontrol ortamı olarak da YEA kullanıldı. Bu ortamlara *S. pombe*'nin yabani tipteki hücrelerinden eşit miktarlarda yayma yöntemiyle ekim yapıldı. Petriler 30°C' da 3-5 gün inkübasyona bırakıldı. Mutantlarda glukoz baskılamasına karşı maltaz sentezi açısından da direnç olup olmadığını anlamak üzere, aynı denemeler seçici besi ortamına karbon kaynağı olarak % 3 konsantrasyonunda maltoz eklenerek yapıldı. UV ışınlama ve EMS kullanılarak gerçekleştirilen mutagenizasyonun ardından hücreler doğrudan % 3 (w/v) sukroz, baskılayıcı konsantrasyonda 2-DOG, 5 mg/ml maya özütü ve 20 mg/ml agar içeren besi ortamlarına yayma yöntemiyle ekildi. Petriler 30°C'da 5-10 gün bekletildi. Kontrol olarak, mutagen uygulamasından önce ve sonra kültürün çeşitli sulandırımından YEA'ya ekim yapıldı. Uygulama sonrası oluşan koloni sayıları ve kontrol grupları arasındaki orantılardan mutagenizasyon sonrasında canlı kalabilen ve buna göre seleksiyon etkisinde tutulan hücrelerin sayıları hesaplandı. Oluşan olası mutant koloniler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere stoklara alındı.

II.10. Mutantların analizi

Seleksiyon sonucunda elde edilen olası mutantlardan, Bölüm II.9.3.2.'de açıklanan yöntemle glukoz baskılamasına dirençli oldukları doğrulanarlarda morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve genetik analizler yapıldı.

II.10.1. Stabilite belirlenmesi

Glukoz baskılamasına dirençli mutant soyların stabilitelerinin belirlenmesi amacıyla hücreler seçici olmayan zengin besi ortamında (YEA) 30°C' da 180 devir/dakika hızda, izleme sürecinde kültürler geç logaritmik evreye ulaştıklarında pasajları yenilenerek, 50 generasyon boyunca izlendi [17]. Kontrol grubu olarak *S. pombe*'nin yabani tipi aynı koşullar altında izlendi. 25. ve 50. generasyonlar sonunda sıvı kültürlerden sayım yapılarak 10^5 , 10^4 ve 10^3 hücre alınıp 2-DOG' lu seçici besi ortamı ve zengin besi ortamı (YEA) içeren petrilere eşit hacimde damlalar halinde ekim yapıldı. Yaklaşık 5 gün sonunda 2-DOG'lu ortamdaki üreme durumlarına göre stabiliteleri değerlendirildi.

II.10.2. Prototrofluk kontrolleri

Glukoz baskılamasına dirençli mutantlarda, ek olarak biyosentez yollarıyla ilişkili bir kusur olup olmadığının belirlenmesi amacıyla minimal ortamda üreyebilme yetenekleri izlendi. Mutantların 2-DOG içeren YEA'daki 3 gecelik taze kültürlerinden steril kürdanlarla alınan örnekler MMA'ya aktararak 30°C'da 3 gün bekletildi. Ayrıca minimal ortama karbon kaynağı olarak glukoz yerine aynı konsantrasyonda (% 1) sukroz eklenerek mutantların bu koşul altındaki üreme yetenekleri de izlendi. Kontrol olarak *S. pombe*'nin yabani tipi (K1) ve lizin oksotrofu olan *lys7* mutan (K2) kullanıldı.

II.10.3. İnvvertaz aktivitelerinin belirlenmesi

Glukoz baskılamasına dirençli olan mutant soyların, baskılama yapan ve yapmayan glukoz konsantrasyonlarındaki invvertaz aktiviteleri Bölüm II.7.' de açıklandığı gibi kantitatif yöntemle ölçüldü. Ölçüm değerleri, kontrol grubu olarak kullanılan *S. pombe*'nin yabani soyundakilerle karşılaştırıldı. Elde edilen bulgular doğrultusunda, mutantlar glukoz baskılamasına karşı direnç derecelerine göre fenotipik olarak gruplandırıldı.

II.10.4. Üremenin izlenmesi

Mutantların her bir fenotipik grubundan seçilen temsilcilerinin zamana bağlı olarak üremeleri YEL ve karbon kaynağı olarak glukoz yerine eşdeğer konsantrasyonda sukroz içeren MML besi ortamlarında izlendi. Deneyler Bölüm II.5.' de anlatıldığı gibi ve iki tekrarlı olarak yapıldı.

II.10.5. Morfolojik analiz

Mutantlara ait hücrelerin 3 günlük taze kültürlerinden hazırlanan lam/lamel arası preparatlar ışık mikroskopunda incelendi ve fotoğrafları çekildi. Mutant hücrelerin morfolojileri yabani tipteki hücrelerle karşılaştırıldı.

II.10.6. Resesiflik/dominantlık testi

Mutant ve yabani tipteki alleller arasındaki resesiflik/dominantlık ilişkisinin saptanması amacıyla mutant soylar *S. pombe*'nin mei B102 soyu ile Bölüm II.4.'de açıklandığı gibi çaprazlanarak stabil diploid hücreler elde edildi. Magdala kırmızısı ortamındaki kırmızı renkleriyle seçilen ve mikroskopik incelemede de diploid oldukları doğrulanmış kolonilerden alınan örnekler 2-DOG içeren seçici besi ortamına ve kontrol olarak zengin besi ortamına aktarıldı ve üreme durumları izlendi.

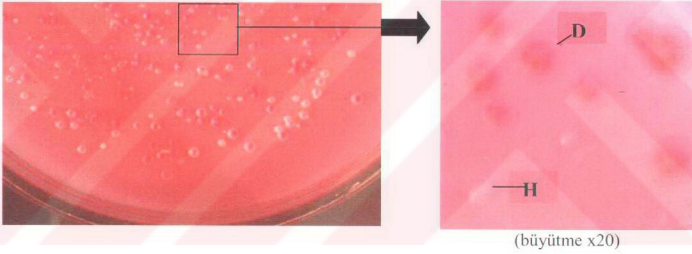
III. BULGULAR

III.1. *S. pombe*' de invertaz sentezi üzerinde glukoz baskılaması

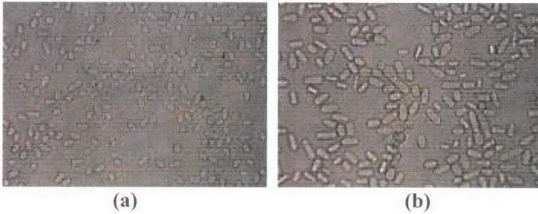
S. pombe'nin yabani soyunda invertaz sentezi üzerinde glukoz baskılamasına ilişkin bilgiler elde etmeye yönelik olarak öncelikle glukozun baskılama yaptığı konsantrasyon saptandı ve bu değerlik üzerinde gen dozajının etkili olup olmadığını belirlemek üzere çalışmalar haploid ve diploid soylarda karşılaştırmalı olarak yürütüldü.

III.1.1. Stabil diploid *S. pombe* soylarının elde edilmesi

Doğal yaşam biçimi haploid olan *S. pombe*'den stabil diploidler elde etmeye yönelik olarak 972h⁻ ve meiB102 hücre soylarının SPA'da çaprazlanması sonucunda 3-5 gün içinde zigotların oluştuğu mikroskobik olarak gözlemlendi. 5. gündeki çaprazlama karışımının aktarıldığı magdala kırmızısı içeren besi ortamında çok açık pembe ya da beyaz renkli haploid koloniler arasında, diploid koloniler koyu pembe renkli olmalarıyla seçildiler (Şekil III.1.). Ayrıca, diploid kolonilerdeki hücreler iri ve pleimorfik görünümleyle de daha küçük ve çubuk şekilli olan haploid hücrelerden ayırt edildi (Şekil III.2.).



Şekil III.1. *S. pombe*'nin haploid (H) ve diploid (D) kolonilerinin magdala kırmızısı içeren besi ortamındaki görünümü



Şekil III.2. *S. pombe*'nin (a) haploid ve (b) diploid hücrelerinin mikroskop altında görünümü (büyütme x400)

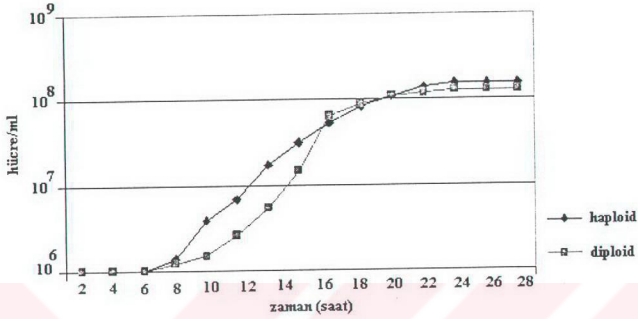
III.1.2. Haploid ve diploidlerde zamana bağılı üreme

Glukozun baskılayıcı konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan kantitatif invertaz aktivitesi tayini logaritmik evrenin ortalarındaki kültürlerde gerçekleştirildiği [35] için öncelikle haploid ve diploid soylarda zamana bağılı üreme izlenerek logaritmik evrelerin süresi belirlendi.

Bölüm II.5.'de anlatıldığı gibi ve iki tekrarlı olarak yapılan ölçümlerden elde edilen ortalama değerler **Tablo III.1.**'de verildi ve bu sayısal değerlere göre çizilen üreme eğrileri **Şekil III.3.**'de gösterildi.

Tablo III.1. Haploid ve diploid *S.pombe* kültürlerinde zamana bağılı üremenin izlenmesi

Zaman (saat)	Haploid		Diploid	
	OD ₆₀₀	hücre/ml	OD ₆₀₀	hücre/ml
0.	0.089	1.0x10 ⁶	0.081	1.0x10 ⁶
2.	0.087	1.0x10 ⁶	0.083	1.0x10 ⁶
4.	0.090	1.0x10 ⁶	0.082	1.0x10 ⁶
6.	0.120	1.4x10 ⁶	0.110	1.2x10 ⁶
8.	0.460	3.9x10 ⁶	0.204	1.5x10 ⁶
10.	0.810	7.0x10 ⁶	0.302	2.6x10 ⁶
12.	1.140	1.7x10 ⁷	0.650	5.5x10 ⁶
14.	1.330	3.2x10 ⁷	1.220	1.5x10 ⁷
16.	1.550	5.4x10 ⁷	1.660	6.5x10 ⁷
18.	1.820	8.3x10 ⁷	2.080	9.0x10 ⁷
20.	2.110	1.1x10 ⁸	2.161	1.1x10 ⁸
22.	2.180	1.4x10 ⁸	2.194	1.2x10 ⁸
24.	2.210	1.6x10 ⁸	2.201	1.3x10 ⁸
26.	2.220	1.6x10 ⁸	2.197	1.3x10 ⁸
28.	2.210	1.6x10 ⁸	2.196	1.3x10 ⁸



Şekil III.3. Haploid ve diploid *S. pombe* kültürlerinde zamana bağlı üreme eğrileri

Ayrıca haploid ve diploid *S. pombe* soyları için generasyon sayıları ve süreleri Bölüm II.6.'da verilen formüllere göre hesaplandı (Tablo III.2.).

Tablo III.2. Haploid ve diploid *S. pombe* kültürlerinde generasyon sayı ve süreleri

Soylar	Generasyon sayısı	Generasyon süresi
Haploid	1.66	2.40
Diploid	3.56	1.12

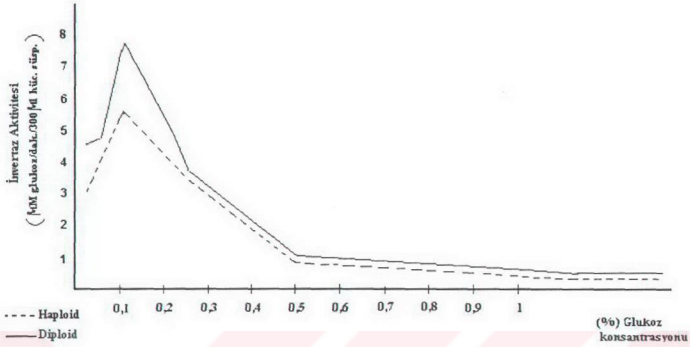
Formüllere göre yapılan hesaplamalardan, kültürlerde logaritmik evrelerin ortalarına denk gelen 12 - 16. saatler arasında diploid kültürlerin bölünme hızının haploidlerdekinin yaklaşık iki katı olduğu belirlendi. İnvertaz aktivitesi tayinlerinde haploid soy için 15. saatteki, diploid soy için 14. saatteki kültürlerin kullanılması kararlaştırıldı.

III.1.3. Haploid ve diploidlerde baskılama yapmayan glukoz konsantrasyonunun belirlenmesi

İnvertaz enziminin baskılanmadığı glukoz konsantrasyonunun saptanması amacıyla, logaritmik evrenin ortalarındaki kültürlerle ait hücrelerle yapılan deneylerde glukozun % 0.025 – 0.10 arasında değişen konsantrasyonları denendi. Bölüm II.7.'de açıklandığı şekilde ve üç tekrarlı olarak yapılan deneylere ait ortalama değerler Tablo III.3.'de verildi. Bu değerlerden yararlanılarak çizilen grafik Şekil III.4.'de gösterildi.

Tablo III.3. Haploid ve diploid *S. pombe* hücrelerinde çeşitli glukoz konsantrasyonlarındaki invertaz aktiviteleri

Glukoz (%) (w/v)	OD ₆₀₀		OD ₅₄₆		İnvertaz aktivitesi (μ M glukoz/dak./300 μ l hücre süspansiyonu)	
	Haploid	Diploid	Haploid	Diploid	Haploid	Diploid
0.025	0.458	0.722	0.302	0.629	3.161	4.612
0.050	0.477	0.745	0.376	0.656	3.804	4.647
0.100	0.610	0.813	0.642	0.984	5.660	7.575
0.150	0.547	0.847	0.642	1.211	5.079	6.468
0.250	0.537	0.567	0.386	0.395	3.469	3.542
0.500	0.575	1.105	0.088	0.186	0.738	0.884
1	0.655	0.914	0.069	0.146	0.508	0.838
2	0.620	1.076	0.043	0.076	0.334	0.358
5	0.589	1.080	0.043	0.045	0.352	0.254
10	0.569	1.074	0.039	0.053	0.330	0.255



Şekil III.4. Haploid ve diploid *S. pombe* hücrelerinin çeşitli glukoz konsantrasyonlarındaki invertaz aktiviteleri

Elde edilen sayısal değerlere göre, haploid ve diploid soylara ait hücrelerin glukoz baskılamasına karşı çok farklı bir yanıt vermedikleri anlaşıldı. Hem haploid hem de diploid soylarda % 0.1' lik glukoz konsantrasyonunun invertaz enziminin sentezini baskılamadığı, buna karşılık glukoz konsantrasyonundaki artışa paralel olarak baskılamanın meydana geldiği saptandı. $\geq 2\%$ 'lik glukoz konsantrasyonunda baskılamanın olmadığı koşula oranla invertaz aktivitesinin yaklaşık %95 oranında baskılandığı belirlendi. Bununla birlikte, glukoz konsantrasyonunun daha yükseldiği koşullarda bile invertaz aktivitesinin çok düşük düzeyde sabit kalarak devam ettiği (bazal aktivite) gözlemlendi. Buna göre *S. pombe* hücrelerinde invertaz sentezi açısından glukoz baskılamasına verilen yanıtta gen dozajının etkili olmadığı belirlendi. Sadece, Şekil III.4.'teki grafikten de izlendiği gibi, baskılamanın olmadığı koşulda diploid hücrelerdeki invertaz aktivitesinin haploid hücrelere oranla yaklaşık 1,5 kat daha fazla olduğu belirlendi. Bununla birlikte, % 0.25'lik glukoz konsantrasyonunda diploidlerdeki baskılamanın haploidlere oranla daha etkin bir şekilde meydana geldiği saptandı.

Çalışmanın sonraki aşamalarında baskılama yapmayan glukoz konsantrasyonu olarak % 0.1, baskılayıcı etki sağlamak için de en az % 2'lik konsantrasyonları kullanıldı.

III.2. Glukoz baskılamasına dirençli invertaz mutantlarının elde edilmesi

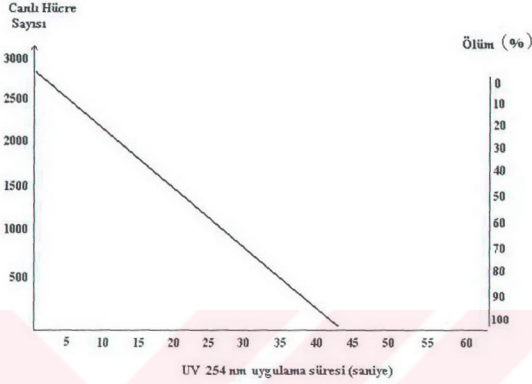
Glukoz baskılamasına dirençli konstitütif invertaz mutantlarının elde edilmesi amacıyla fiziksel (UV) ve kimyasal (EMS) mutagenler kullanılarak *S. pombe*'nin yabani soyunda (972h') mutagenез gerçekleştirildi.

III.2.1. Mutagen dozlarının belirlenmesi

Mutasyon çalışmasında fiziksel mutagen olarak kullanılacak UV dozunu saptamak üzere öncelikle 254 nm dalga boyundaki UV ışığın çeşitli dozlarının hücreler üzerindeki öldürücü etkilerinin derecesi saptandı. Bu amaçla 5 - 60 saniye arasında değişen UV ışık uygulamaları sonucunda elde edilen değerler **Tablo III.4.**' de verildi. Bu değerlere göre çizilen grafik **Şekil III.5.**' de gösterildi.

Tablo III.4. UV ışığın *S. pombe* hücreleri üzerindeki öldürücülük etkisi

Uygulama süresi (saniye)	Canlı hücre sayısı	Yaşama yeteneği (%)
0	3000	100
5	2820	94
10	2250	75
15	1740	58
20	1430	47
25	1060	34
30	650	21
35	330	11
40	120	4
50	10	1
60	-	< 1



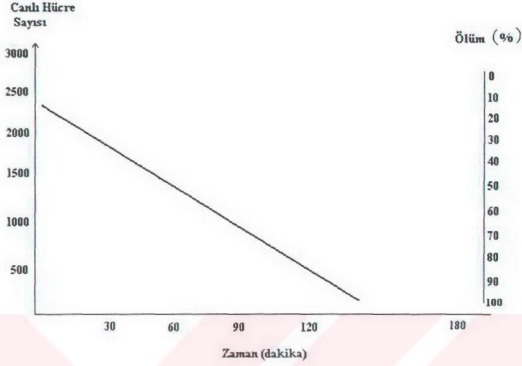
Şekil III.5. *S. pombe* hücrelerinin UV ışığının uygulama sürelerine bağlı ölüm oranı

UV ışığının uygulama sürelerine bağlı olan öldürücülük etkisi, UV ışık etkisine bırakılmamış olan kontrol grubu ile yapılan karşılaştırma sonucuna göre belirlendi. Buna göre UV ile yapılacak mutasyon çalışmalarında yaklaşık %50 öldürücü etki gösteren 20- 30 saniyelik uygulama süreleri seçildi.

Kimyasal mutagen olarak kullanılacak EMS'nin hücreler üzerindeki öldürücülük derecesinin saptanması amacıyla %3'lük konsantrasyonu kullanılarak 30 - 180 dakika arasında değişen uygulama süreleri denendi. Elde edilen değerler **Tablo III.5.**'de verildi ve bu değerlere göre çizilen grafik şekil **Şekil III.6.**'da gösterildi.

Tablo III.5. EMS'nin *S. pombe* hücreleri üzerindeki öldürücülük etkisi

Uygulama süresi (dakika)	Canlı hücre sayısı	Yaşama yeteneği (%)
0	2650	100
30	1740	67
60	1210	46
90	680	26
120	310	12
180	3	<1



Şekil III.6. *S. pombe* hücrelerinin EMS'nin (% 3) uygulama sürelerine bağlı ölüm oranı

EMS'nin uygulama sürelerine bağlı olan öldürücülük etkisi, EMS etkisine bırakılmamış olan kontrol grubu ile yapılan karşılaştırma sonucuna göre belirlendi. Buna göre, mutasyon çalışmaları için % 50-90 öldürücülük etkisinin saptandığı 60,90 ve 120 dakikalık uygulama süreleri seçildi.

III.2.2. Mutantların seleksiyonu

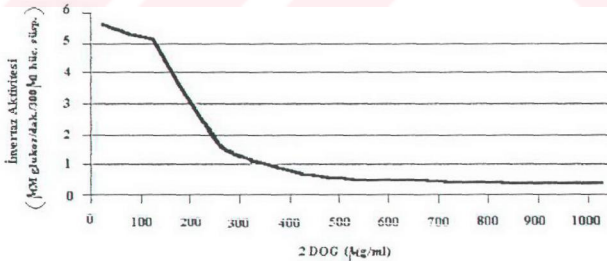
UV ve EMS'nin belirlenen dozlarının kullanımıyla, **Bölüm II.9.**'da açıklandığı şekilde yapılan işlemler sonucunda glukoz baskılamasına dirençli invertaz mutantlarının seleksiyonunda iki teknikten yararlanıldı.

Koloni yüzeyinde invertaz aktivitesinin gösterilmesi temeline dayalı seleksiyon tekniğiyle, UV'nin belirlenen sürelerinin kullanıldığı 5 ayrı uygulamada toplam yaklaşık 32.000 hücre seleksiyon etkisinde bırakıldı. **Bölüm II.9.3.1.**'de belirtildiği şekilde petri kopyalama tekniğinin kullanılmasını gerektiren ve bu nedenle çok fazla hücre taranmasına olanak vermeyen bu yöntemle yapılan taramalarda glukoz baskılamasına dirençli mutant elde edilemedi.

Bölüm II.9.3.2.'de verilen, 2-DOG seleksiyonunun uygulanmasında öncelikle, kullanılacak 2-DOG konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla bu glukoz analogunun 100, 250, 500 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ ' lik konsantrasyonları denendi. Kontrol gruplarıyla birlikte üç tekrarlı olarak eş zamanlı yapılan deneylerden elde edilen ortalama değerler **Tablo III.6.**' de verildi. Bu değerlerden yararlanılarak çizilen grafik **Şekil III.7.**' de gösterildi.

Tablo III.6. Çeşitli 2-DOG konsantrasyonlarındaki invertaz aktiviteleri

2-DOG ($\mu\text{g/ml}$)	OD ₆₀₀	OD ₅₄₆	İnvertaz Aktivitesi (μM glukoz/dak./300 μl hücre süspansiyonu)
100	0.521	0.443	5.169
250	0.549	0.130	1.557
500	0.555	0.045	0.513
1000	0.553	0.033	0.350
K1 (%01 glukoz)	0.564	0.491	5.330
K2 (%5 glukoz)	0.590	0.063	0.637
K3 (%01 fruktoz)	0.566	0.539	5.610
Glukoz Standardı	-	0.183	-



Şekil III.7. 2-DOG'un invertaz sentezini baskılayıcı etkisi

Elde edilen bulgular doğrultusunda mutantların seçiminde, direnç özelliği düzeyleri farklı olabilecek mutantları seçebilmek amacıyla, 2-DOG'un yeterli derecede baskılamaya (yaklaşık %70) neden olduğu belirlenen 250µg/ml'lik konsantrasyonun kullanılmasına karar verildi.

Sıvı inkübasyon ortamında belirlenen 2-DOG konsantrasyonunun seleksiyon yönteminde (Bölüm II.9.3.2.) kullanılacak olan katı besi ortamına da uygunluğu, bu dozdaki 2-DOG içeren katı zengin besi ortamında yabancı tipteki *S. pombe* hücrelerinin hiç üremediklerinin saptanmasıyla doğrulandı. 2-DOG seleksiyon tekniğiyle, UV ışığının belirlenen sürelerde kullanılmasıyla yapılan uygulamalarda 4 ayrı denemede toplam yaklaşık 160.000 hücre tarandı fakat, büyük olasılıkla UV uygulamasının çok fazla sayıda hücreyle gerçekleştirilememesine bağlı olarak glukoz baskılamasına dirençli invertaz mutanları elde edilemedi.

EMS kullanılarak yapılan mutasyon çalışmalarında ise % 3'lük EMS'nin belirlenen sürelerde kullanıldığı 3 ayrı denemede 2-DOG seleksiyon tekniğiyle toplam yaklaşık $5,3 \times 10^8$ hücre tarandı. Elde edilen sonuçlara ait sayısal değerler Tablo III.7.'de verildi.

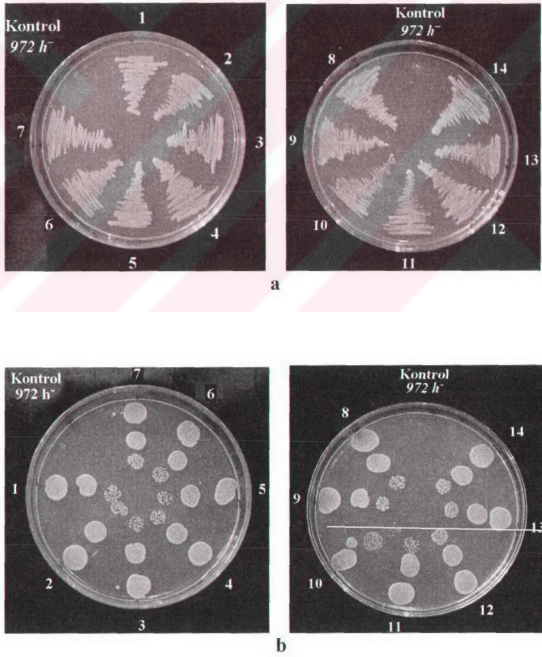
Tablo III.7. EMS uygulaması ile glukoz baskılamasına dirençli invertaz mutantlarının seleksiyonuna ilişkin sayısal değerler

EMS Uygulama Süresi (dakika)	Taranan Hücre Sayısı	Mutant Sayısı	Mutasyon Frekansı
60	$2,6 \times 10^8$	6	2×10^{-7}
60	$2,3 \times 10^8$	8	$2,75 \times 10^{-7}$
120	4×10^7	-	-
	Toplam: $5,3 \times 10^8$	14	

Tablodaki değerlerden de anlaşıldığı gibi, EMS uygulamasıyla glukoz baskılamasına dirençli olan toplam 14 adet konstitütif invertaz mutanları, baskılayıcı konsantrasyonda 2-DOG içeren ortamda invertaz sentezleyebilme yeteneklerine göre, izole edildi. Mutantların tümü yaklaşık % 60 öldürücü etki gösteren EMS dozunun kullanılmasıyla (60 dakikalık uygulamada) elde edildi. Buna karşılık, EMS'nin yaklaşık % 95'lik öldürücü etki gösterdiği saptanan 120 dakikalık uygulamasıyla yapılan denemede, büyük olasılıkla canlı hücre sayısındaki azalma nedeniyle, mutant izole edilemedi.

2-DOG baskılamasına dirençli olmalarıyla seçilen 14 koloniden elde edilen kültürlerdeki hücrelerin, glukoz baskılamasına dirençli olduklarının kesinleştirilmesi amacıyla seleksiyonda kullanılan besi ortamında (% 3 sukroz ve 250 µg/ml 2-DOG içeren YEA) üreme durumları izlendi. Bu amaçla, mutantlara ve yabani tipe ait hücreler, çizgi ve damla (spot) ekim yöntemleriyle petrilere ekildi.

Kontrol olarak kullanılan yabani tipe ait hücrelerin bu seçici ortamda, özellikle en yoğun damla ekiminde (10^5) bile ürememesine karşılık, mutantların hepsinin kullanılan tüm hücre yoğunluklarında üredikleri gözlemlendi (Şekil III.8). Buna göre, mutantların hepsinin glukoz baskılamasına dirençli oldukları tam olarak doğrulandı.



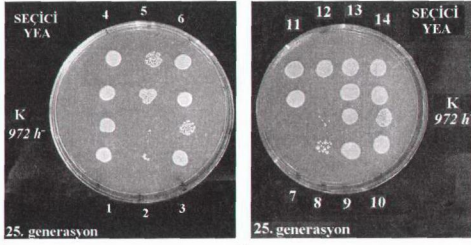
Şekil III.8. Mutantların 2-DOG ve sukroz içeren YEA ortamındaki üreme durumları (a, çizgi ekim ; b, damla ekim. Damla ekiminde, petrinin dışından ortasına doğru sırasıyla 10^5 , 10^4 ve 10^3 sayıda hücre ekimi yapılmıştır)

III.3. Glukoz baskılamasına dirençli invertaz mutantlarının analizi

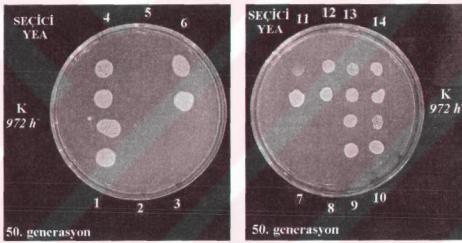
EMS mutagenezi sonucunda ve 2-DOG seleksiyonuyla elde edilen glukoz baskılamasına dirençli 14 adet invertaz mutan t ı *gdi1* – *gdi14* (glukoz-baskılamasına dirençli invertaz mutan t ı) olarak adlandırıldı. Bu mutanlarda morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve genetik bazı analizler yapıldı.

III.3.1. Direnç özelliğinin stabilitesi

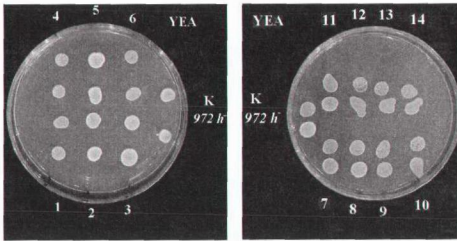
Uzun süreli deneysel uygulamaların güvenilirliği ve sağlıklı hücre stoklarının hazırlanması açısından, glukoz baskılamasına dirençli oldukları saptanan invertaz mutanlarında bu özelliğın sürekliliğı izlendi. Bu amaçla, 14 mutan t ın glukoz baskılamasına dirençlilik durumları seçici olmayan zengin besi ortamında yaklaşık 50 generasyon boyunca izlendi. Bölüm II.10.1.' de açıklanan yöntem kullanılarak elde edilen sonuçlara göre, mutanlardan 9'unun (*gdi1*, *gdi4*, *gdi6*, *gdi9-14*) direnç özelliklerini 50. generasyonun sonuna kadar sürdürdükleri belirlendi. Bununla beraber, *gdi2* ve *gdi7* mutanlarında 25. generasyon sonunda; *gdi3*, *gdi5* ve *gdi8*'de ise 50. generasyon sonunda direnç özelliklerinin kaybolduğı saptandı (Şekil III.9a).



a



b

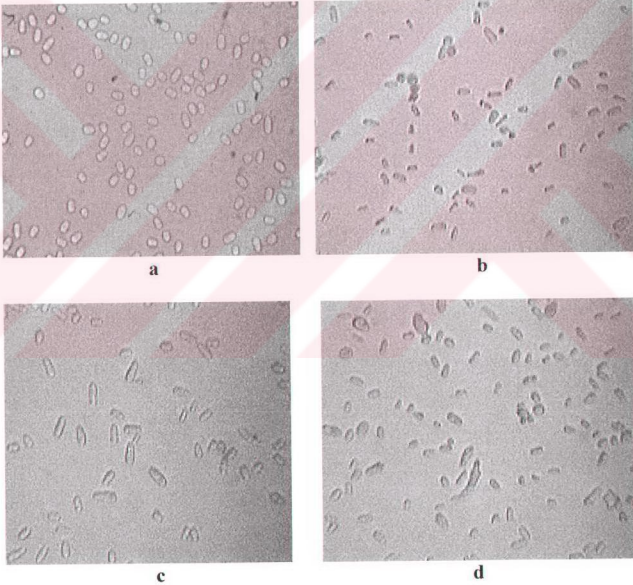


c

Şekil III.9. Mutantların seçici YEA ortamında (a) 25. generasyon sonunda, (b) 50. generasyon sonunda, (c) seçici olmayan YEA' da (kontrol) 50. generasyon sonunda üreme durumları

III.3.2. Hücre morfolojileri

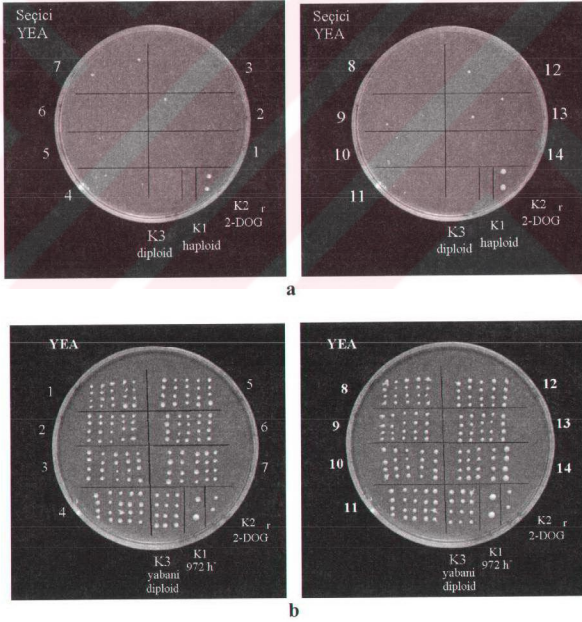
Glukoz baskılamasına dirençli invertaz mutantlarına ait hücrelerin mikroskopik incelemelerinde, mutantların büyük çoğunluğunda (*gdi1*, *gdi2*, *gdi4-8*, *gdi13*) hücre morfolojilerinin yabani tipteki hücrelere benzer biçimde olduğu gözlemlendi (**Şekil III.10a.**). Bununla beraber, *gdi3* ve *gdi14*'e ait hücrelerin kontrol grubuna göre daha küçük (**Şekil III.10b.**), *gdi11* ve *gdi12*'ye ait hücrelerin ise oldukça iri (**Şekil III.10c.**) oldukları saptandı. *gdi9* ve *gdi10*'da ise şekil bozukluklarının ve yalancı hif benzeri oluşumların sıklığının oldukça yüksek olduğu belirlendi (**Şekil III.10d.**).



Şekil III.10. Yabani tipe göre hücre morfolojilerinde farklılık gösteren mutantlara ait hücrelerin mikroskop altında görünüşleri (**a**, yabani tip 972h (kontrol); **b**, *gdi3* **c**, *gdi11* **d**, *gdi9* mutantları) (büyütme x400)

III.3.3. Resesiflik/dominantlık kontrolü

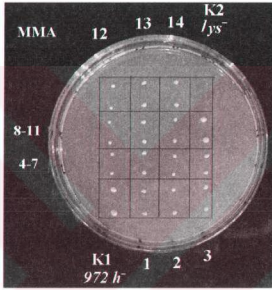
Glukoz baskılamasına karşı dirence yol açan mutasyonun (ya da mutasyonların) yabancı tipteki allel(ler)e göre resesiflik/dominantlık durumunun saptanması amacıyla, **Bölüm II.10.6.**'da açıklandığı şekilde, yabancı tipteki alleller ile mutant alleller stabil diploid hücrelerde bir araya getirildi. Her bir mutant tip ile meiB102 soyu arasındaki çaprazlamaların sonucunda rastgele seçilen diploid koloniler 2-DOG içeren seçici besi ortamlarına aktarıldılar. Negatif kontrol olarak glukoz baskılamasına duyarlı olan yabancı tip, pozitif kontrol olarak da glukoz baskılamasına dirençli olan mutant soylar kullanıldı. 3-5 günlük inkübasyon sonunda, büyük olasılıkla magdala kırmızısı içeren ortamdaki hatalı seçim sonucunda haploid mutant hücrelerden oluşan birkaç koloninin dışında, diploidlerde hiç üreme olmadığı saptandı (**Şekil III.11.**). Buna göre glukoz baskılamasına dirençli invertaz mutantlarındaki mutant allellerin hepsinin yabancı tipe göre resesif özellikle olduğu belirlendi.



Şekil III.11. *gdi1-14* x *meiB102* çaprazlamasıyla elde edilen diploidlerin **a**, seçici YEA ortamında ; **b**, kontrol olarak YEA'daki üremeleri (çaprazlamaların sonucunda her bir mutant için 20'şer adet farklı koloniden ekim yapılmıştır).

III.3.4. Oksotrofi kontrolü

Glukoz baskılamasına dirençli invertaz mutantlarının ayrıca biyosentez yollarına ilişkin başka mutasyon(lar) da taşıyıp taşımadıklarının ortaya çıkartılması amacıyla prototrofluk kontrolleri yapıldı. Minimal besi ortamına aktarılan mutantların, *S. pombe*'nin prototrof olan yabani tipteki hücreleri ve bir lizin oksotrofu olan *lys7* mutanlığı ile karşılaştırmalı olarak üremeleri izlendi. **Şekil III.12.**'deki fotoğrafta da gösterildiği gibi, mutantların MMA'da yabani tipe benzer şekilde üredikleri gözlemlendi. Buna göre, mutantların hepsinin prototrof özellikte oldukları belirlendi.



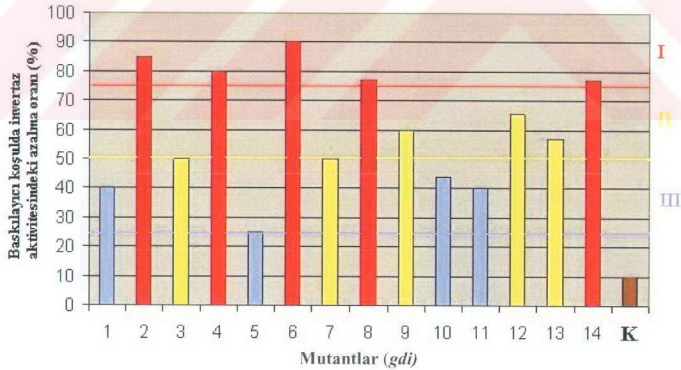
Şekil III.12. Mutantların MMA'daki üreme durumları

III.3.5. Kantitatif invertaz aktiviteleri

2-DOG'un baskılayıcı konsantrasyonlarındaki sukrozu kullanma yeteneklerine göre seçilen mutantların, karbon kaynağı olarak glukoz içeren ortamdaki bu yetenekleri açısından davranışlarının incelenmesi amaçlandı. Buna göre, mutantlarda baskılama yapan (% 2) ve yapmayan (% 0.1) glukoz konsantrasyonlarındaki invertaz aktiviteleri kantitatif olarak değerlendirildi. **Bölüm II.7.**'de açıklandığı şekilde yapılan ölçümlerden elde edilen değerler **Tablo III.8.**'de verildi. Tabloda verilen invertaz aktivitesine ait % cinsinden baskılanma değerleri, baskılanmanın olmadığı koşuldaki aktivite % 100 kabul edilerek hesaplandı. Ek olarak mutantlardaki % cinsinden invertaz aktivitelerinin baskılanma değerlerine göre çizilen histogram **Şekil III.13.**'de gösterildi.

Tablo III.8. Glukoz baskılamasına dirençli invertaz mutantlarında glukozun baskılayıcı ve baskılama yapmayan konsantrasyonunda invertaz aktiviteleri

Mutantlar	OD ₆₀₀		OD ₅₄₆		İnvertaz Aktivitesi (μ M glukoz/dak./300 μ l hücre süspansiyonu)		Baskılanma (%)
	Glukoz (% 01)	Glukoz (% 2)	Glukoz (% 01)	Glukoz (% 2)	Glukoz (% 01)	Glukoz (% 2)	
<i>gdi1</i>	0.455	0.445	0.358	0.133	5.293	2.010	62.1
<i>gdi 2</i>	0.426	0.520	0.286	0.312	4.769	4.036	15.9
<i>gdi 3</i>	0.600	0.420	0.396	0.140	4.440	2.242	49.5
<i>gdi 4</i>	0.648	0.382	0.440	0.189	4.567	3.627	20.6
<i>gdi 5</i>	0.440	0.494	0.291	0.082	4.479	1.169	73.9
<i>gdi 6</i>	0.494	0.560	0.430	0.435	5.666	5.057	10.6
<i>gdi 7</i>	0.538	0.371	0.620	0.215	7.502	3.772	49.7
<i>gdi 8</i>	0.506	0.569	0.400	0.355	5.146	4.004	22.3
<i>gdi 9</i>	0.366	0.428	0.285	0.206	5.158	3.133	39.2
<i>gdi 10</i>	0.650	0.662	0.250	0.120	2.503	1.180	52.8
<i>gdi 11</i>	0.648	0.538	0.337	0.109	2.900	1.200	58.6
<i>gdi 12</i>	0.319	0.345	0.328	0.233	6.070	3.980	34.4
<i>gdi 13</i>	0.304	0.306	0.352	0.220	7.051	4.145	41.2
<i>gdi 14</i>	0.265	0.289	0.233	0.194	5.053	3.942	21.9
Kontrol (yabani soy)	0.608	0.604	0.295	0.025	2.700	0.240	91.1



Şekil III.13. Mutantlardaki invertaz aktivitelerinin glukoz tarafından baskılanma dereceleri ve mutantların bu ölçüte göre gruplandırılması

Özellikle Şekil III.13.'de verilen histogramdaki verilerin değerlendirilmesi sonucunda mutantların, glukoz baskılamasına karşı invertaz düzeyinde verdikleri yanıtlara göre 3 fenotipik grup altında toplanabileceği sonucuna varıldı. Baskılamamanın olmadığı koşuldaki invertaz aktivitesi % 100 kabul edilerek, baskılayıcı konsantrasyonda invertaz aktivitesinin % 0-25 arasında baskılandığı mutantlar I. grup, % 25-50 arasında baskılananlar II. grup ve % 50-75 arasında baskılananlar III. grup olarak belirlendi (Tablo III.9.).

Tablo III.9. Mutantların glukoz baskılamasına direnç özelliklerine göre gruplandırılması

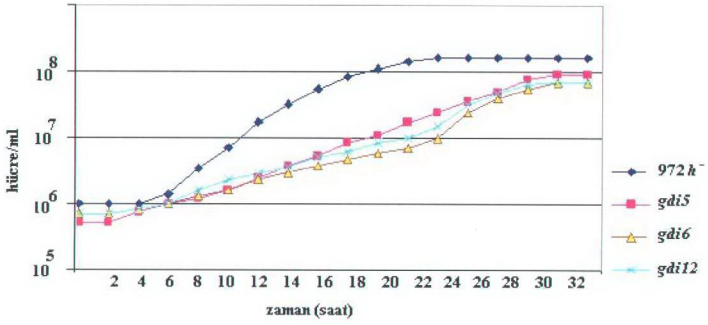
Grup	Mutantlar (<i>gdi</i>)	Baskılanma oranı (%)
I	2,4,6,8,14	0-25
II	3,7,9,12,13	25-50
III	1,5,10,11	50-75
Kontrol	Yabani tip (972 <i>h</i>)	90

III.3.6. Üreme özellikleri

Glukoz baskılamasına dirençli mutantların 3 fenotipik grubundan birer örnek seçilerek (I. gruptan *gdi6*, II. gruptan *gdi12* ve III. gruptan *gdi5*) hücrelerin, zengin (YEL) ve glukoz yerine % 1 sukroz içeren minimal (MML) ortamlardaki zamana bağlı üremeleri yabani tipteki *S. pombe* ile karşılaştırmalı olarak izlendi. Deneyler Bölüm II.5.'de açıklandığı şekilde yapıldı; elde edilen ölçüm değerleri Tablo III.10. ve 11'de verildi. Bu sayısal değerlerden yararlanılarak çizilen grafikler Şekil III.14. ve 15'da gösterildi.

Tablo III.10. Mutantlardan seçilen örneklerde (*gdi5*, *6vc12*) ve yabani tipte (*972h*) YEL'deki zamana bağlı üremenin izlenmesi

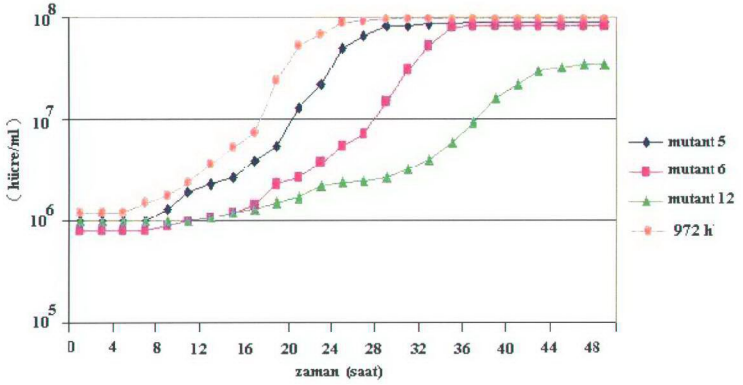
zaman (saat)	hücre/ml			
	<i>gdi 12</i>	<i>gdi 5</i>	<i>gdi 6</i>	<i>972h</i>
0	0.7×10^6	0.6×10^6	0.7×10^6	1.0×10^6
2	0.7×10^6	0.6×10^6	0.7×10^6	1.0×10^6
4	0.8×10^6	0.7×10^6	0.8×10^6	1.0×10^6
6	1.0×10^6	1.0×10^6	1.0×10^6	1.4×10^6
8	1.6×10^6	1.2×10^6	1.3×10^6	4.0×10^6
10	2.3×10^6	1.6×10^6	1.6×10^6	7.0×10^6
12	3.6×10^6	2.4×10^6	2.3×10^6	1.7×10^7
14	5.0×10^6	3.8×10^6	2.9×10^6	3.2×10^7
16	6.2×10^6	5.3×10^6	3.7×10^6	5.4×10^7
18	8.6×10^6	8.4×10^6	4.8×10^6	8.3×10^7
20	1.0×10^7	1.1×10^7	5.9×10^6	1.1×10^8
22	1.5×10^7	1.7×10^7	7.0×10^6	1.4×10^8
24	2.6×10^7	2.4×10^7	1.0×10^7	1.6×10^8
26	3.9×10^7	3.9×10^7	1.9×10^7	1.6×10^8
28	5.2×10^7	5.7×10^7	3.2×10^7	1.6×10^8
30	6.3×10^6	7.5×10^7	5.1×10^7	1.6×10^8
32	6.9×10^6	9.0×10^7	6.7×10^7	1.6×10^8
34	7.1×10^6	9.0×10^7	7.0×10^7	1.6×10^8



Şekil III.14. Mutantların üç grubundan seçilen örneklerin (*gdi5*, *6* ve *12*) YEL besi ortamındaki üremelerinin yabani tüpe (*972h⁻*) karşılaştırılması

Tablo III.11. Mutantlardan seçilen örneklerde (*gdi5,6ve12*) ve yabani tipte (*972h*) % 1 sukroz içeren MML'deki zamana bağlı üremenin izlenmesi

zaman (saat)	hücre/ml			
	<i>gdi12</i>	<i>gdi5</i>	<i>gdi 6</i>	<i>972h</i>
0	1.0×10^6	1.0×10^6	0.8×10^6	1.2×10^6
2	1.0×10^6	1.0×10^6	0.8×10^6	1.2×10^6
4	1.0×10^6	1.0×10^6	0.8×10^6	1.2×10^6
6	1.0×10^6	1.0×10^6	0.8×10^6	1.5×10^6
8	1.0×10^6	1.3×10^6	0.9×10^6	1.8×10^6
10	1.0×10^6	1.9×10^6	1.0×10^6	2.4×10^6
12	1.1×10^6	2.3×10^6	1.1×10^6	3.6×10^6
14	1.2×10^6	2.7×10^6	1.2×10^6	5.2×10^6
16	1.3×10^6	3.9×10^6	1.4×10^6	7.2×10^6
18	1.5×10^6	5.5×10^6	2.3×10^6	2.3×10^7
20	1.7×10^6	1.3×10^7	2.7×10^6	5.1×10^7
22	2.2×10^6	2.2×10^7	3.8×10^6	6.7×10^7
24	2.4×10^6	5.0×10^7	5.4×10^6	8.5×10^7
26	2.5×10^6	6.5×10^7	7.0×10^6	9.1×10^7
28	2.7×10^6	8.0×10^7	1.5×10^7	9.2×10^7
30	3.2×10^6	8.1×10^7	3.0×10^7	9.2×10^7
32	4.1×10^6	8.3×10^7	5.2×10^7	9.2×10^7
34	5.9×10^6	8.4×10^7	7.6×10^7	9.2×10^7
36	9.0×10^6	8.5×10^7	7.9×10^7	9.2×10^7
38	1.6×10^7	8.5×10^7	8.0×10^7	9.2×10^7
40	2.2×10^7	8.5×10^7	8.1×10^7	9.2×10^7
42	2.9×10^7	8.5×10^7	8.1×10^7	9.2×10^7
44	3.2×10^7	8.5×10^7	8.1×10^7	9.2×10^7
46	3.4×10^7	8.5×10^7	8.1×10^7	9.2×10^7
48	3.4×10^7	8.5×10^7	8.1×10^7	9.2×10^7

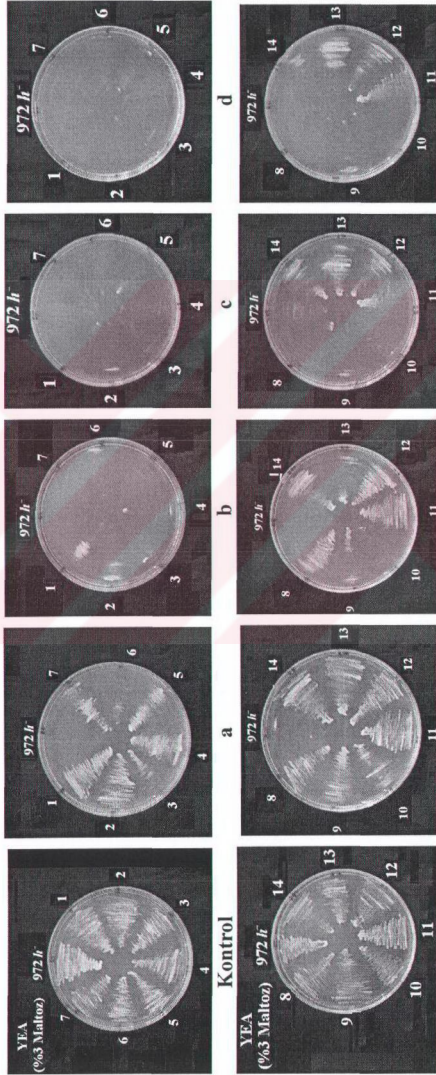


Şekil III.15. Mutantların üç grubundan seçilen örneklerin (*gdi5,6* ve *12*) sukroz (%1) içeren MML besi ortamındaki üremelerinin yabani tipe (*972h*) karşılaştırılması

Belirlenen 3 fenotipik gruptan seçilen örneklere ait hücrelerin karbon kaynağı olarak glukoz bulunan zengin ortamda (YEL) yabani tipe göre daha yavaş üredikleri fakat üreme profilleri bakımından mutantlar arasında önemli bir farklılık olmadığı gözlemlendi. Buna karşılık, mutantların sukroz içeren minimal ortamdaki (MML) üreme profilleri karşılaştırıldığında bunların kendi aralarında ve yabani tipe göre farklılıklar gösterdiği saptandı. Mutant hücre kültürlerinin hepsi yabani tipe (*972h*) göre daha yavaş ürerken *gdi5*'in (III. grup) logaritmik evrenin sonuna *gdi6* (I. grup) ve *gdi12* (II. grup)'den daha kısa sürede ulaştığı gözlemlendi.

III.3.7. Glukoz baskılamasına karşı dirençte pleiotropi kontrolü

Mutantlardaki invertaz sentezi açısından glukoz baskılamasına dirençlilik özelliğinin katabolit represyona ilişkin genel bir yanıt mı olduğu yoksa özel olarak invertaz enzimini şifreleyen gen(ler)in anlatımının düzenlenmesine ilişkin bir süreci mi kapsadığının aydınlatılabilmesi amacıyla mutantlardaki direnç özelliği, sentezi katabolit represyonla düzenlenen bir enzim olan maltaz açısından da değerlendirildi. Bu amaçla mutantların, **Bölüm II.9.3.2.**'de açıklandığı şekilde yapılan denemelerde, 250, 500, 750 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarında 2-DOG ile karbon kaynağı olarak maltoz (% 3) içeren katı zengin besi ortamındaki (YEA) üremeleri 1 hafta boyunca izlendi (**Tablo III.12.** ve **Şekil III.16.**). Kontrol besi ortamı olarak % 3 maltoz içeren (ve 2-DOG içermeyen) YEA kullanıldı.



Şekil III.16. Mutantların (*gdi1-14*) karbon kaynağı olarak % 3 maltoz içeren seçici ortamlarda 5. gündeki üreme durumları (a, 250 $\mu\text{g/ml}$ b, 500 $\mu\text{g/ml}$ c, 750 $\mu\text{g/ml}$ ve d, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 2-DOG)

Kontrol olarak kullanılan 2-DOG içermeyen besi ortamında yapılan gözlemlerde mutantların tümünün karbon kaynağı olarak maltozu kullanabildiği ve bazıları (*gdi3*, *gdi5-8*, *gdi9-10* ve *gdi14*) biraz daha yavaş olmakla birlikte 5. günün sonunda hepsinin yabani tipe benzer şekilde üreyebildikleri izlendi. Çeşitli konsantrasyonlarda 2-DOG içeren ortamlarda ise mutantların glukoz baskılamasına karşı gösterdikleri direnç derecelerinin farklı olduğu belirlendi. Glukoz baskılamasına karşı maltoz kullanma yetenekleri açısından gösterdikleri direnç ölçüt alındığında özellikle 4 mutantın (*gdi11-14*) en dirençli grubu oluşturduğu gözlemlendi. Bu mutantların 1000 µg/ml 2-DOG içeren ortamda bile üreyebildikleri saptandı. Buna karşılık, *gdi6* ve *gdi10*'un en duyarlı grupta yer aldığı gözlemlendi. *gdi6*'nın 250 µg/ml, *gdi10*'un ise 500 µg/ml 2-DOG konsantrasyonlarından itibaren üreyemedikleri belirlendi. Kontrol ve 2-DOG'lu ortamlarda 5. günden sonra hücrelerin üreme durumlarında bir değişiklik saptanmadı.

IV. TARTIŞMA VE SONUÇ

Karbon kaynaklarının kullanımına ilişkin genel düzenleme mekanizması olan katabolit represyon, yalnızca glukoz konsantrasyonlarındaki değişimlere bağlı olarak alternatif karbon kaynaklarının kullanımıyla ilişkili bazı genlerin anlatımının baskılanmasında iş görmekle kalmayıp aynı zamanda glukoneogenez ve solunum gibi süreçlerle ilgili diğer birçok genin anlatımının düzenlenmesinde de rol oynamaktadır [38,48]. Bu açıdan bu kontrol mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar, hücre metabolizmasındaki temel süreçlerle ilgili genlerin anlatımlarının düzenlenmesinde rol oynayan mekanizma ve bileşenlerin anlaşılmasında önemli katkılar sağlamaktadır. Bu bağlamda, çeşitli karbon kaynaklarının kullanımında iş gören ve sentezleri katabolit represyonla kontrol edilen enzimlerin (invertaz, maltaz, β -galaktozidaz vb.) aktivitelerinin çeşitli biyokimyasal yöntemlerle kolaylıkla izlenebilmesi bu süreçlerle ilgili düzenleme mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik çalışmalarda önemli üstünlükler sağlamaktadır. Hücrelerin temel enerji kaynağını oluşturmalarının yanı sıra yapısal ve düzenleyici işlevler de üstlenebilen şekerler tüm mayalar için en iyi karbon kaynaklarıdır. *S. cerevisiae*'de şekerlerin kullanımında rol oynayan düzenleyici genler ve proteinler hakkında oldukça fazla bilgi bulunmaktadır. Diğer mayalarda da bu süreçle ilişkin düzenlenmedeki genel yolun benzer şekilde olduğu; bununla beraber, farklı türler arasında bu yolda iş gören bileşenler açısından biyokimyasal ve genetik farklılıkların da bulunduğu sanılmaktadır [18].

Bu araştırmada, *S. pombe*'de henüz fazla bilginin bulunmadığı glukoz baskılamasıyla ilgili olarak, sentezi katabolit represyonla kontrol edilen invertaz enzimini sifreleyen gen(ler)in anlatımının düzenlenmesine yönelik ön bilgiler sağlamayı amaçlayan çalışmalar yapıldı. Genelde, metabolik yollarla ilgili genlerin ve bunların anlatımlarının düzenleme mekanizmalarının aydınlatılmasında mutantlardan geniş çapta yararlandığı için, bu çalışmanın da önemli kısmı katabolit represyona dirençli invertaz mutantlarında gerçekleştirildi. Ön çalışmalarda, yabancı tipteki *S. pombe* hücrelerinde glukozun % 0,1'lik konsantrasyonunun invertaz enzimi sentezini baskılamadığı saptandı. Glukoz konsantrasyonundaki artışla birlikte baskılamının başladığı ve %2'lik konsantrasyonda invertaz aktivitesinin tamamen baskılandığı ancak çok düşük düzeyde aktivitenin devam ettiği (bazal aktivite) belirlendi. Bu bulgular, bazal aktivitenin devamlılığı ve baskılamının olmadığı glukoz konsantrasyonu açısından, *S. pombe*'de bu konuda ilk yapılan çalışmadaki [32] sonuçlarla uygunluk göstermektedir. Bununla birlikte, Mitchison & Creanor (1969) çalışmalarında tam baskılanmanın gerçekleştiği koşul olarak glukoz konsantrasyonunu % 1 olarak belirlemişlerdir[32]. Bu mayada yapılan daha sonraki çalışmalarda ise, baskılayıcı koşul olarak çoğunlukla % 2 veya daha yüksek glukoz konsantrasyonlarının kullanıldığı belirtilmektedir [35].

Endüstriyel uygulamalardaki fermentasyon süreçlerinde verimin artırılması açısından yabancı tipteki hücrelere göre çok daha yüksek düzeyde enzim aktivitesi gösteren ve katabolit represyona dirençli olan maya soyları önem taşımaktadır. Bu tip endüstriyel soyların ise genellikle poliploid hücrelerden oluştuğu bilinmektedir [49]. *S. pombe*'de de gen dozajının invertaz sentezi ve glukoz baskılaması üzerinde etkili olup olmadığının anlaşılması amacıyla, diploid ve haploid soylarda karşılaştırmalı olarak invertaz aktiviteyi tayin edildi. Diploidlerde baskılamının olmadığı koşullardaki, invertaz aktivitesinin haploidlere oranla yaklaşık 1,5 kat daha fazla olduğu belirlendi. Bu konuya ilişkin *S. pombe*'de daha önce yapılmış olan bir çalışma bulunmamakla birlikte *S. cerevisiae*'de endüstriyel amaçlı geliştirilmiş olan poliploid soylarda [49] ve çok kopyalı vektörlerle *SUC* genlerinin aktarılmış olduğu transformantlarda [17] artan kopya sayısı ile birlikte invertaz aktivitesinin yükseldiği gösterilmiştir. Ayrıca, *Pichia anomala*'da invertaz sentezinden sorumlu olan INV1 geninin *S. cerevisiae*'de heterolog anlatımının gerçekleştiği ve genin kopya sayısındaki artışla birlikte konak hücredeki invertaz sentezinin de arttığı belirtilmiştir [20]. Diploid ve haploid soylar arasında invertaz sentezi açısından glukoz baskılamasına verilen yanıtın ise farklı olmadığı saptandı. Buna karşılık *S. cerevisiae*'de, *SUC4* genine ait promotör bölgelerinin çok sayıda kopyasının bulunduğu durumlarda baskılayıcı glukoz konsantrasyonlarında bile invertaz enzimi sentezinin devam ettiği gözlenmiştir [50]. Çalışmamızda yüksek bir ploidiye sahip soy kullanılmamakla birlikte, iki maya türü arasında (invertaz sentezi açısından) katabolit represyona verilen yanıtta, genlerin kopya sayılarının etkisi bakımından farklılık olabileceği düşünülmektedir.

EMS uygulamasıyla gerçekleştirilen mutagenез sonucunda, taranan yaklaşık $5,3 \times 10^8$ hücreden, glukoz baskılamasına dirençli 14 adet konstitütif invertaz mutan (gdil-14) elde edildi. Buna göre çalışmada glukoz baskılamasına dirençli invertaz mutantlarının ortaya çıkma sıklığının yaklaşık $2,5 \times 10^{-7}$ olduğu hesaplandı. Mutantların seleksiyonu, katabolit represyona dirençli soyların seçiminde sıklıkla kullanılan [2] bir glukoz analogu olan 2-DOG ile yapıldı. Daha önce *S. cerevisiae* ile yapılan çalışmalarda EMS uygulaması sonucunda 2-DOG'a dirençli olan mutantların oluşma sıklığının yaklaşık 6×10^{-7} [37], kendiliğinden ortaya çıkma sıklığının ise yaklaşık 3×10^{-8} olduğu [17] bildirilmektedir.

S. pombe'de glukoz baskılamasının aydınlatılmasına yönelik yapılan araştırmalar kapsamında bu konunun incelenmeye başlanmasından itibaren glukoz baskılamasına karşı pleiotropik direnç özelliği gösteren çeşitli mutantlar elde edilmiştir [29]. Daha ayrıntılı çalışmalarda ise özellikle glukozun hücre içine alınmasında kusurlu olan mutant soylar izole edilmiş ve bu mutantların glukozu hücreye alamamasına (ve/veya taşıyamamasına) bağlı olarak glukoz içeren ortamlarda üreyemedikleri belirtilmiştir [14,51]. Genellikle pleiotropik özellikler gösteren bu mutantların aynı zamanda sukrozu da kullanamadıkları bildirilmiştir. Ayrıca, Tanaka ve ark. (1998) [35], bu mayada (glukoz baskılamasının meydana gelmesinde rol oynayan *S. cerevisiae*'deki Mig1 ve *Aspergillus nidulans*'daki CREA'nın homoloğu olarak tanımladıkları) *Ser1* geninin delesyonunun invertaz enziminin konstitütif sentezine yol açtığını göstermişlerdir. Katabolit represyonda baskılayıcı bir proteini şifrelediği anlaşılan bu

genin varlığı dışında, *S. pombe*'de özel olarak invertaz sentezinin düzenlenmesine ilişkin hemen hiç veri bulunmamaktadır.

Bu araştırmada, daha önceki çalışmalardan farklı olarak, özgül olarak invertaz sentezi açısından glukoz baskılamasına dirençli olan (pleiotropik özellikte olmayan) konstitütif mutantların elde edilmesi hedeflendi. Bu amaçla elde edilen mutantların, pleiotrop olup olmadıklarını belirleyecek ve özgül olarak konstitütif invertaz mutantları oldukları saptananlarda da bu enzimi şifreleyen gen(ler)in düzenlenmesinde rol oynayan mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik temel bazı ön bilgileri ortaya koyacak analizler gerçekleştirildi. Mutantların resesiflik/dominantlık kontrolünde, mutant ve yabani tipteki allellerin bir araya getirildiği stabil diploidlerin (*gdi*1-14/*mei*B102) hiçbirinin 2-DOG içeren seçici besi ortamında üremediği gözlemlendi. Buna göre, invertazı şifreleyen gen(ler)in anlatımında katabolit represyona karşı direnç yol açan mutasyonun (ya da mutasyonların) yabani tipe göre resesif olduğu anlaşıldı. Daha önceden *S. cerevisiae*'de yapılan benzer çalışmalarda elde edilen mutantlarda da glukoz baskılamasına direnç yol açan mutant allellerin genellikle resesif özellikte olduğu belirtilmektedir [37,52].

Çalışmamızda elde edilen *gdi* mutantlarının ek olarak biyosentez yollarına ilişkin mutasyonlar da taşıyıp taşımadıklarının saptanması amacıyla minimal ortamdaki üreme yetenekleri gözlemlendiğinde tümünün prototrof özellikte olduğu belirlendi. Mutantların, karbon kaynağı olarak % 1 konsantrasyonda glukoz içeren minimal ortamda, yabani tipe benzer şekilde üreyebilmeleri bunların daha önce *S. pombe*'de 2-DOG seleksiyon tekniği ile izole edilen ve glukozu hücre içine taşıyamayan ("glucose transport deficient") mutantlardan farklı olduklarını göstermektedir. Glukoz taşıma kusurlu olan mutantlar, karbon kaynağı olarak glukoz içeren minimal ortamda yabani tipe göre ya çok zayıf üreme göstermekte [14] ya da hiç üreyememektedirler [51]. Bu veriler, *gdi* mutantlarında glukoz taşınması ile ilgili önemli kusurların bulunmaması ve buna bağlı olarak düşük düzeylerde de olsa taşınmanın gerçekleşmesi olasılığını güçlendirmektedir. Bununla beraber, seçilen 3 mutantın zengin sıvı ortamda yabani tipe göre daha yavaş üremeleri nedeniyle logaritmik evrenin sonuna geç ulaşmaları, en azından bu temsilcilerin glukozu kullanma yeteneklerinin kısıtlı olduğunu (örneğin glukoz alımının biraz daha düşük düzeylerde meydana geldiği) düşündürülebilir. Benzer şekilde Özcan & Johnston (1999) [14], glukoz taşıma kusurlu mutantların bazılarında ortamdaki glukoz alımının çok düşük düzeylerde olabildiğini belirtmişlerdir.

gdi mutantlarının hepsinin resesif allelleri taşımalarına ve prototrof olmalarına karşılık, analiz edilen diğer bazı özellikleri bakımından çeşitlilik gösterdikleri belirlendi. Işık mikroskopuyla yapılan gözlemlerde, hücre morfolojileri bakımından mutantların büyük çoğunluğundaki hücrelerin yabani tiptekilere benzemekle birlikte bazı mutantlara ait hücrelerin yabani tipe göre farklı morfolojilerde oldukları saptandı. Özellikle *gdi9* ve *gdi10* mutantlarında şekil bozukluklarının ve yalancı hif benzeri yapı oluşumu sıklığının oldukça yüksek olduğu belirlendi. Bailey & Woodward (1984)'ün [37] *S. cerevisiae*'de yaptıkları bir çalışmada elde ettikleri glukoz baskılamasına dirençli olan bir mutant soyda uzamış ve kıvrılmış "sosise benzer" hücre morfolojisinin görüldüğü belirtilmektedir. Ayrıca *S. cerevisiae*'de, glukoz baskılamasında da iş gören cAMP'nin, protein kinazlarla birlikte morfojenetik değişim süreçlerinde de rol oynayabildiği saptanmıştır [53]. Gancedo (2001) *S. pombe*'de de belli stres koşulları altında yalancı hif benzeri oluşumların görülebildiğini bildirmekle birlikte bu mayada meydana gelen bu morfolojik değişimlerin oluşum mekanizması hakkında çok az veri bulunmaktadır. Sadece, hücre dışından alınan fizyolojik sinyallerin hedef noktalara iletilmesinde ve yanıt oluşturulmasında rol oynayan MAP kinazlarla (mitojenlerle aktive edilen protein kinazlar) ilgili kusurların hücre morfolojisi anormalliklerinden sorumlu olabildiği gösterilmiştir [53,54]. Bu açıdan çeşitli sinyallerin oluşturulmasında önemli bir aşama olan glukozun algılanmasıyla ilgili kusurların hücre morfolojilerini de etkilemesi beklenir. Buna göre hücre morfolojileri açısından farklılıklar gösteren *gdi* mutantlarındaki mutasyonların, ilk aşamalardaki sinyallerin oluşturulması ve iletimiyle ilgili süreçleri kapsayabileceği düşünülebilir.

gdi mutantlarının glukoz baskılamasına verdikleri yanıt açısından farklılıklar gösterdikleri saptandı. Buradan gidilerek, mutantlar direnç derecelerine göre 3 grup altında toplandı (Bölüm III.5.). Bu gruplardan seçilen örneklerin (*gdi5*, *gdi6* ve *gdi12*), farklı fizyolojik özellikler gösterebilecekleri düşünülerek, zengin sıvı besi ortamındaki üreme profilleri izlendiğinde mutantların üçünün de üreme eğrilerinin birbirine benzediği bununla birlikte, yabani tipe göre üremelerinin daha yavaş olduğu gözlemlendi. Elde edilen bulgular doğrultusunda, katı minimal ortamdaki normal üreme durumları da dikkate alındığında, mutantlarda glukoz alımıyla ilgili önemli bir kusur olmadığı ancak, glukozun hücre içine alınması hızının mutantlarda yabani tipe göre daha yavaş olabileceği düşünüldü. Bu konuya ilişkin daha kesin sonuçların ortaya koyulabilmesi için *gdi* mutantlarındaki glukoz tüketiminin kantitatif olarak değerlendirilmesi gerekmektedir.

Mutant grupları arasında zengin besi ortamındaki üreme profilleri bakımından önemli bir fark görülmemesine karşılık sukroz içeren minimal besi ortamında mutantların üreme özelliklerinin kendi aralarında değişkenlik gösterdiği saptandı (Bölüm III.3.6.). Thevelein (1995) [55] pleiotropik fenotipe sahip olan maya mutantlarının glukoz, fruktoz veya sukroz gibi karbon kaynaklarını içeren besi ortamlarında üreyemediklerini belirtmektedir. Bu açıdan, *gdi* mutantlarının karbon kaynağı olarak sukroz veya glukozun bulunduğu ortamlarda oldukça iyi üreyebilmeleri karbon kaynaklarının kullanımındaki genel bir düzenlemeden çok özgül olarak invertaz enzimi sentezinin düzenlenmesine ilişkin mutasyonların meydana gelmesi olasılığının

yüksek olduğunu düşündürmektedir. Özellikle sukrozun kullanımı açısından gözlenen farklılık bu mutantların özgül olarak invertaz sentezinin düzenlenmesine ilişkin mutasyonları taşıma olasılığını güçlendirmektedir.

Özgül olarak invertaz sentezi açısından katabolit represyona dirençli konstitütif mutantların elde edilmesinin hedeflendiği bu çalışmada, seleksiyon 2-DOG'a dirençlilik ölçütü temel alınarak yapıldığı için mutantların katabolit represyona dirençleri bakımından pleiotropik fenotipte olma olasılıkları göz önünde bulunduruldu. Bu bağlamda, *gdi* mutantları katabolit represyonla kontrol edilen diğer bir enzim olan maltaz açısından da değerlendirildi. Baskılamanın olmadığı koşullarda tüm *gdi* mutantlarının maltozu etkin bir şekilde kullanabildiği buna karşılık 2-DOG'un artan konsantrasyonlarında (baskılayıcı koşullarda), sukrozun kullanımında olduğu gibi, maltoz kullanımı bakımından da glukoz baskılamasına verdikleri yanıtların farklı olduğu gözlemlendi. Ayrıca, maltoz ve sukrozun kullanımındaki katabolit represyona direnç derecelerinin paralellik göstermediği, bu özelliklerin birbirinden bağımsız olarak farklı mutantlarda ortaya çıktığı belirlendi. Bu bulgular, *gdi* mutantlarındaki katabolit represyona direnç özelliğinin pleiotropik etkili olmaması olasılığını kuvvetlendirmektedir. Diğer taraftan, maltaz ve invertaz açısından daha sağlıklı değerlendirmenin yapılabilmesi açısından tüm mutantlardaki maltaz aktivitesinin (baskılamanın olduğu ve olmadığı koşullarda) kantitatif olarak tayin edilmesi yarar sağlayacaktır. Ayrıca, pleiotropik direnç özelliğine sahip mutantların genellikle glikojen sentaz ile ilgili düzenlenme süreçlerinde de değişiklikler olduğu belirtilmektedir [55]. Bu açıdan, *gdi* mutantlarındaki glikojen düzeylerinin karşılaştırılması da bu mutantların analizinde katkılar sağlayabilir.

gdi mutantlarının çalışmada araştırılan çeşitli fenotipik özellikleri açısından aralarında bazı farklılıklar olması, invertazı şifreleyen gen(ler)in anlatım(lar)ının düzenlenmesinde rol oynayan düzenleyici genlerde birden fazla mutasyonun meydana geldiği düşüncesini ortaya çıkarmaktadır. Bu yönden, mutantlara ait komplementasyon gruplarının belirlenmesi bu noktaya genetik açıdan daha net açıklamalar getirecektir.

Sonuç olarak, çalışmada elde edilen *gdi* mutantlarında gerçekleştirilen bazı analizlerden elde edilen bulgular, mayalarda katabolit represyonla kontrol edilen farklı karbon kaynaklarının kullanılması süreçlerinde rol oynayan düzenlenme mekanizmalarının farklı yollardan oluştuğuna ilişkin görüş ve bilgilerle uyumaktadır.

KAYNAKLAR

1. VOET D., VOET G.J., PRATT W.C. (1999). Fundamentals of Biochemistry. John Wiley and Sons. New York. ISBN: 0-471-58650-1, (195-219)
2. ROLLAND F., WINDERICKX J., THEVELEIN J.M. (2001). Glucose sensing mechanisms in eukaryotic cell. Trends Biochem. Sci. 26:5:310-317
3. BRUCKNER R., TITGEMEYER F. (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. FEMS Microbiology Letters. 209:2:141-148
4. (<http://www.sugaralliance.org/faqs/index.htm>)
5. (http://cwx.prenhall.com/petrucci/medialib/media_portfolio/text_images/FG28_19.JPG)
6. (<http://us.expasy.org/cgi-bin/sprot-search-de?invertase>)
7. FOYER C., KINGSTON-SMITH A., POLLOCK C. (1997). Sucrose and invertase, an uneasy alliance. Iger Innovations. 18-21 (www.iger.bbsrc.ac.uk/igdev/IGER_Innovations/in97/Ch3.pdf)
8. (<http://www.sbu.c.uk/biology/enztech/sucrose.html>)
9. SHEEN J., ZHOU L., JANG J. (1999). Sugars as signaling molecules. Curr. Opin. Plant Biol. 2: 410-418
10. STURM A., TANG G. (1999). The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. Trends. Plant Sci. 4:10:401-407
11. WEBER H., ROITSCH T. (2000). Invertases and life beyond sucrose cleavage. Trends. Plant Sci. 5:2: 47-48
12. (<http://www.vh.org/pediatrics/provider/pediatrics/PedsGIDisease/GIDisease.htm>)
13. WILSON W.A., HAWLEY S.A., HARDIE D.G. (1996). Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 Protein kinase activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. Curr. Biol. 6 (11):1426-1434
14. ÖZCAN S., JOHNSTON M. (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. Microbiol. Mol.Biol. R. 63(3):554-569

15. ROLLAND F., WINDERICKX J., THEVELEIN J.M. (2002). Glucose sensing and signaling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res.* 2:2:183-201
16. (<http://www.glue.umd.edu/~nsw/ench485/lab14.htm>)
17. RINCON A.M., CODON A.C., CASTREJON F., BENITEZ T. (2001). Improved properties of baker's yeast mutants resistant to 2-deoxy -D-glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(9):4279-4285
18. FLORES C.L., RODRIGUEZ C., PETIT T., GANCEDO J.M. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 507-529
19. ZARATE V., BELDA F. (1996). Characterization of the heterologous invertase produced by *Schizosaccharomyces pombe* from the *SUC2* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Bacteriol.* 80:45-52
20. PEREZ J.A., RODRIGUEZ J., RUIZ T. (2001). Expression of *Pichia anomala* INV1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in two different active forms of hypoglycosylated invertase. *Arch. Microbiol.* 175: 189-197
21. TABUCHI M., OSAMU I., YOSHIHIKO O., NOBUHIRO O., SAKURAI J., MORITA T., IWAHARA S., TAKEGAWA K. (1997). Vacuolar protein sorting in fission yeast: cloning, biosynthesis, transport and processing of carboxypeptidase Y from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* 179(13): 4179-4189
22. ROTHE C., LEHLE L. (1998). Sorting of invertase signal peptide mutants in yeast dependent and independent on the signal-recognition particle. *Eur. J. Biochem.* 252:16-24
23. CARLSON M., BOTSTEIN D. (1982). Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell* 28:145-154
24. CARLSON M., CELENZA J.L., ENG F.J. (1985). Evolution of the dispersed *SUC* gene family of *Saccharomyces* by rearrangement of chromosome telomeres. *Mol. Cell. Biol.* 5(11): 2894-2902
25. CARLSON M., BOTSTEIN D. (1983). Organization of the *SUC* gene family in *Saccharomyces*. *Mol. Cell. Biol.* 3:351-359
26. CARLSON M., TAUSSIG S. K., BOTSTEIN D. (1983). The secreted form of invertase in *Saccharomyces cerevisiae* is synthesized from mRNA encoding a signal sequence. *Mol. Cell. Biol.* 3:439-447

27. NASIM A., YOUNG P., JOHNSON F.B. (1989). Molecular Biology of the Fission Yeast. Academic Press Inc. ISBN: 0-12-514085-1 (33)
28. ZHAO Y., LIEBERMAN H.B. (1995). *Schizosaccharomyces pombe* : A model for molecular studies of eukaryotic genes. DNA Cell Biol. 14(5): 359-371
29. GUTZ. H., HESLOT H., LEUPOLD U., LOPRIENO N. edit. KING R.C. (1974). Handbook of Genetics. Plenum Press. 1:395-446
30. WOOD V., GWILLIAM R., RAJANDREAM M.A, ve ark. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. Nature. 415:871-879
31. WALKER G.M. (1988). Yeast Physiology and Biotechnology. John Wiley and Sons, New York, (203-227) ISBN: 0-471-964468
32. MITCHISON J.M., CREANOR J.(1969). Linear synthesis of sucrase and phosphatases during the cell cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. J.Cell.Sci. 5: 373-391
33. MORENO S., RUIZ T., SANCHEZ Y., VILLANUEVA J.R., RODRIGUEZ L. (1985). Subcellular localization and glycoprotein nature of the invertase from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Arch.Microbiol. 142:370-374
34. MORENO S., SANCHEZ Y., RODRIGUEZ L. (1990). Purification and characterization of the invertase from *Schizosaccharomyces pombe*. Biochem J. 267:697-702
35. TANAKA N., OHUCHI N., MUKAI Y., OSAKA Y., OHTANI Y., TABUCHI M., BHUIYAN M.S.A.,FUKUI H. (1998). Isolation and characterization of an invertase and its repressor genes from *Schizosaccharomyces pombe*. Biochem. Biophy. Res. Com. 245:246-253
36. (<http://www.genedb.org/gened/pombe/index.jsp>)
37. BAILEY R.B., WOODWARD A. (1984). Isolation and characterization of a pleiotropic glucose repression resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. 193:507-512
38. CARLSON M. (1998). Regulation of glucose utilization in yeast. Curr. Opin. Gen. Dev. 8: 560-564
39. SANCHEZ Y., MORENO S., RODRIGUEZ L. (1988). Synthesis of *Saccharomyces cerevisiae* invertase by *Schizosaccharomyces pombe*. FEBS Lett. 234(1): 95-99
40. EGEL R. (1973). Commitment to meiosis in fission yeast. Mol. Gen. Genet. 121:277-284

41. BOYD R.F. (1984). General Microbiology, Phd. Witz, Virginia
42. MOAT A.G. (1979). Microbial Physiology, John Wiley and Sons, New York
43. GOLDSTEIN A., LAMPEN O.J. (1975). β -D- Fructofuranoside fructohydrolase from yeast. Methods. Enzymol. 42:504-511
44. GALLI A., SCHIESTL RH. (1995). On the mechanism of UV and γ -ray-induced intrachromosomal recombination in yeast cells synchronized in different stages of the cell. Mol. Gen. Genet. 248:301-310
45. BURKE D., DAWSON D., STEARNS T. (2000). Methods In Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press , ISBN: 0-87969-588-9 (159,160)
46. PARAVICINI G., HORAZDOVSKY B.F., EMR S.D. (1992). Alternative pathways for the sorting soluble vacuolar proteins in yeast: A *vps35* null mutant missorts and secretes only a subset of vacuolar hydrolases. Mol. Biol.Cell. 3:415-427
47. HASSAN S.K., JEFFRIES T.W. (1999). 2-Deoxyglucose as a selective agent for derepressed mutants of *Pichia stipitis*. Appl. Biochem. Biotech. 77-79:211-222
48. CARLSON M. (1999). Glucose repression in yeast. Curr. Opin. Microbiol. 2: 202-207
49. CODON A.C., BENITEZ T., KORHOLA M. (1998). Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49:154-163
50. GOZALBO D. (1992). Multiple copies of *SUC4* regulatory regions may cause partial derepression of invertase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet. 21:437-442
51. MILBRADT B., HOFER M. (1994). Glucose-transport deficient mutants of *Schizosaccharomyces pombe*: phenotype, genetics and use for genetic complementation. Microbiol. 140:2617-2623
52. NEIGEBOERN L., CARLSON M. (1987). Mutations causing constitutive invertase synthesis in yeast: genetic interactions with *snf* mutations. Genetics. 115:247-253
53. GANCEDO J. M. (2001). Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Reviews 25:107-123

54. ESTRUCH F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiology Reviews* 24:469-486
55. THEVELEIN J. M., HOHMAN S. (1995). Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast ? *TIBS* 20:3-10

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Cenk KIĞ
Doğum Tarihi: 06.04.1975
Unvanı: Araştırma Görevlisi
Öğrenim Durumu:

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	İstanbul Üniversitesi	2000

Yayınlar

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Temizkan G, Günel T, Kığ C, Karaer S. Regulation of the Expression of ade2 Gene in Fission Yeast. XXth International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, 26-31 Ağustos 2001 Prag, Çek Cumhuriyeti, Yeast 18, 2001.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Akman G, Kığ C., Tarhan Ç., Yavuz İ., Topal Sarıkaya A.(2001) "Mayada Ağır Metal Duyarlılığı Üzerine pH'nın Etkileri" XII. Biyoteknoloji Kongresi 17-21 Eylül Ayvalık, Balıkesir 2001, 132 : PT 12

Kığ C., Türkel S., Temizkan G., (2002) "Çeşitli Koşulların *Schizosaccharomyces pombe*' de İnvertaz Aktivitesi Üzerine Etkileri" s.86 , XVI. Ulusal Biyoloji Kongresi, 4-7 Eylül 2002 / Malatya