



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

Schizosaccharomyces pombe'DE GLUKOZ
METABOLİZMASININ BİYİNFORMATİK VE
TRANSKRİPTOMİK ANALİZİ

Medet TAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Semian KARAER UZUNER

Aralık, 2018

İSTANBUL

Bu çalışma, 14.12.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Dr. Öğr. Üyesi Semian KARAER UZUNER(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Ercan ARICAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Bedi PALABIYIK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Tıp Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 48264 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu çalışmada ve yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Semian KARAER UZUNER'e teşekkür ederim. Tez çalışmamın her aşamasında bilgilerinden yararlandığım Doç. Dr. Bedia PALABIYIK'a teşekkür ederim. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü tüm öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Maya Genetiği ve Biyoteknolojisi Araştırma Laboratuvarı'nda çalışmalarım boyunca yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Merve YILMAZER'e ve çalışmalarım sırasında değerli bilgileriyle yol gösteren Dr. Öğr. Üyesi Çağatay TARHAN'a teşekkür ederim.

Eğitim hayatımda katkıları olan Prof. Dr. Nazlı ARDA'ya, yüksek lisans eğitimime başladığım dönemde bilgi ve desteğini sunan Prof. Dr. Ayşegül SARIKAYA'ya teşekkür ederim.

Aralık, 2018

Medet TAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	v
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	vi
ÖZET	viii
SUMMARY	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	4
2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
2.3. <i>S. cerevisiae</i> 'DA GLUKOZ METABOLİZMASI	5
2.4. <i>S. cerevisiae</i> 'DA GLUKOZ SİNYAL YOLAKLARI	6
2.5. <i>S. cerevisiae</i> 'DA GLUKOZ TRANSPORTERLER	10
2.6. <i>S. pombe</i> 'DE GLUKOZ TRANSPORTERLER	11
2.7. <i>S. cerevisiae</i> RGT1 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ	12
2.8. <i>S. pombe</i> SPCC320.03 TAHMİNİ TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ	13
2.9. BİYOİNFORMATİK	13
3. MALZEME VE YÖNTEM	16
3.1. BİYOİNFORMATİK ANALİZLER	16
3.2. ORGANİZMALAR	16
3.3. GENEL ÇÖZELTİLER	16
3.4. BESİYERLERİ	17
3.5. <i>S. pombe</i> İRKLARININ ÜRETİMİ VE STOKLANMASI	18
3.5.1. Kısa Süreli Stoklar	19
3.5.2. Gliserol Stok	19
3.5.3. Hücre Sayımı	19
3.6. ÜREME EĞRİSİNİN ÇIKARILMASI	19

3.7.	KOLONİ PCR.....	20
3.8.	RNA İZOLASYONU	21
3.9.	RNA MİKTAR TAYİNİ	23
3.10.	RNA'NIN AGARUZ JELDE YÜRÜTÜLMESİ	23
3.11.	TERS TRANSKRİPTAZ İLE RNA'DAN CDNA ELDE EDİLMESİ	24
3.12.	GERÇEK ZAMANLI PCR (RT-PCR).....	24
4.	BULGULAR	26
4.1.	BİYOİNFORMATİK ANALİZLER.....	26
4.1.1.	RGT1 ve SPCC320.03'ün BLAST Analizi	26
4.1.2.	SPCC320.03 GO (“Gene Ontology”) Tahminleri.....	28
4.1.3.	SPCC320.03 Protein Dizisi Domen Tahminleri	29
4.2.	ÜREME EĞRİSİNİN ÇIKARILMASI.....	30
4.3.	RNA İZOLASYONU	31
4.4.	GERÇEK ZAMANLI PCR.....	34
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	40
	KAYNAKLAR.....	42
	ÖZGEÇMİŞ.....	48

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** *S. cerevisia*'da glukoz sinyal yollarının kesişmesi (Kaniak ve diğ., 2004). Yeşil renkle gösterilen bileşenler SNF3/RGT2 sensörlerinden başlayan glukoz sinyaline cevap vermektedir. Kırmızı renkle gösterilenler ise SNF1 kinaz ile başlayan sinyale cevap veren bişenlerdir..... 9
- Şekil 4.1:** *S. pombe* SPCC320.03 ve *S. cerevisiae* RGT1 protein dizileri BLAST analizi: SPCC320.03 (867 bakiye) üstteki, RGT1 (1170 bakiye) alttaki dizidir..... 27
- Şekil 4.2:** *S. pombe* SPCC320.03 ve *S. cerevisiae* RGT1 protein dizileri BLAST analizi: kırmızı bölgeler homoloji gösteren, gri bölgeler karşılık gelmeyen bölgeleri göstermektedir. 28
- Şekil 4.3:** *S. pombe* SPCC320.03 UniProtKB GO (“Gene Ontology”) tahminleri (“<https://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/O59780>”) 28
- Şekil 4.4:** *S. pombe* SPCC320.03 amino asit dizisi UniProtKB domen tahminleri (“<https://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/O59780>”) 29
- Şekil 4.5:** *S. pombe* Δ SPCC320.03 ve SP292 ırklarına ait üreme grafiği: x-ekseni saat, y-ekseni ise OD değerlerini göstermektedir. 31
- Şekil 4.6:** %1’lik agaroz jelde yürütülen total RNA örnekleri: 1: *S. pombe* Δ SPCC320.03 (YEL %3 glukoz); 2: *S. pombe* Δ SPCC320.03 (YEL %3 gliserol + %0.1 glukoz); 3: *S. pombe* SP292 (YEL %3 glukoz); 4: *S. pombe* SP292 (YEL %3 gliserol + %0.1 glukoz) 33
- Şekil 4.7:** %1’lik agaroz jelde yürütülen total RNA örnekleri: 1: *S. pombe* Δ SPCC320.03 (YEL %3 glukoz); 2: *S. pombe* Δ SPCC320.03 (YEL %3 gliserol + %0.1 glukoz); 3: *S. pombe* SP292 (YEL %3 glukoz); 4: *S. pombe* SP292 (YEL %3 gliserol + %0.1 glukoz); M: Marker (1 kb “DNA Ladder”) 33
- Şekil 4.8:** *S. pombe* SP292 ırkının yüksek glukoz ve glukozsuz besiyerinde heksoz transporter genlerinin relatif anlatımları..... 35
- Şekil 4.9:** *S. pombe* Δ SPCC320.03 ırkının yüksek glukoz ve glukozsuz besiyerinde heksoz transporter genlerinin relatif anlatımları..... 36
- Şekil 4.10:** *S. pombe* Δ SPCC320.03 ve SP292 ırklarının yüksek glukoz ve glukozsuz besiyerlerinde heksoz transporter genlerinin relatif anlatımları. 37
- Şekil 4.11:** *S. pombe* Δ SPCC320.03 ve SP292 ırklarının yüksek glukoz besiyerinde heksoz transporter genlerinin relatif anlatımları..... 38
- Şekil 4.12:** *S. pombe* Δ SPCC320.03 ve SP292 ırklarının glukozsuz besiyerinde heksoz transporter genlerinin relatif anlatımları..... 39

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan ırklar.....	16
Tablo 3.2: Besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılan malzemeler.....	17
Tablo 3.3: Koloni PCR’da kullanılan cihaz ve malzemeler.....	20
Tablo 3.4: Koloni PCR programı.....	20
Tablo 3.5: RNA İzolasyonunda kullanılan cihaz ve malzemeler.....	21
Tablo 3.6: Agaroz jelin hazırlanmasında ve görüntülenmesinde kullanılan cihaz ve malzemeler.....	23
Tablo 3.7: RNA'dan cDNA eldesi için kullanılan cihaz ve malzemeler.....	24
Tablo 3.8: Gerçek zamanlı PCR için kullanılan cihaz ve malzemeler.....	25
Tablo 3.9: Gerçek zamanlı PCR programı.....	25
Tablo 4.1: Üreme eğrisi çıkarılan <i>S. pombe</i> ırkları ve üretildikleri besiyerleri.....	30
Tablo 4.2: RNA izolasyonu yapılan <i>S. pombe</i> ırkları ve üretildikleri besiyerleri (0-12 saat)....	32
Tablo 4.3: RNA izolasyonu yapılan <i>S. pombe</i> ırkları ve üretildikleri besiyerleri (12-16 saat)...	32

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler

Açıklama

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
dk	: Dakika
g	: Gram
L	: Litre
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
µL	: Mikrolitre
Zn	: Çinko

Kısaltmalar

Açıklama

BLAST	: “Basic Local Alignment Search Tool”
cAMP	: Siklik adenosin monofosfat
cDNA	: Komplementer DNA
Ct	: Eşik döngü
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleosid trifosfat
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EtBr	: Etidyum bromür
GHT	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> heksoz transporter
GO:	: “Gene Ontology”
GPCR	: G-protein bağlı reseptör
HXT	: <i>Schizosaccharomyces pombe</i> heksoz transporter
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MMA	: Minimal agar besiyeri
OD	: Optik yoğunluk
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
RT-PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
TAE	: Tris EDTA Tamponu
UV	: Ultraviyole
YEA	: Maya özütü agar besiyeri
YEL	: Maya özütü sıvı besiyeri



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Schizosaccharomyces pombe'DE GLUKOZ METABOLİZMASININ BİYOİNFORMATİK VE TRANSKRİPTOMİK ANALİZİ

Medet TAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Semian KARAER UZUNER

Glukoz çoğu organizmada tercih edilen bir karbon kaynağı olarak kullanılmasının yanı sıra, çeşitli metabolik aktivitelerin, bölünme ve büyüme gibi farklı süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar. Mayalarda şekerler ile farklı yapı ve işleve sahip uyarı moleküllerinin algılanması ve uygun sinyal iletiminin oluşturulması, genel olarak heterotrimerik G-proteini ile G proteinine bağlı hücre yüzey reseptörlerinden oluşan bir sistem aracılığıyla yapılır. Glukozun algılanmasıyla birlikte cAMP/Protein kinaz A (cAMP/PKA) sinyal iletim yolu aktif hale geçer. Daha sonra, glukozun hücre içine alınması hücre membranında bulunan heksoz taşıyıcı proteinler aracılığıyla yapılmaktadır. Sitoplazmada glukoz, karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere heksokinazlar tarafından fosforile edilerek glikolize yönlendirilir.

Glukozun algılanması ve sinyal iletimi ile ilgili yollar *Saccharomyces cerevisiae*'da ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkarılmıştır. Ancak *Schizosaccharomyces pombe*'de bu yollara ilişkin ayrıntılı bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışma ile *S. cerevisiae*'da heksoz transportunu düzenleyen *RGT1* transkripsiyon faktörü geninden yola çıkarak *S. pombe*'de glukoz algılanması ve glukoz sinyaliyle ilgili yolların biyoinformatik yaklaşımlarla araştırılması, benzerlik ve farklılıkların açığa çıkarılması, gerçek zamanlı PCR tekniğiyle bu genin *S. pombe*'deki gen anlatım profillerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

S. cerevisiae RGT1 ve *S. pombe* ortoloğu SPCC320.03 tahmini transkripsiyon faktörü üzerinde yapılan biyoinformatik çalışmalar ile, bu iki genin dizi benzerliği yanında, fonksiyonel ortolog olabileceklerine dair bulgular elde edildi. Önce RGT1 ile *S. pombe* SPCC320.03 proteinlerinin BLAST analizi yapıldı. RGT1'in DNA bağlayan domeni (46-76 amino asitleri) dahil protein dizisinin tamamının SPCC320.03'de oldukça korunmuş olduğu saptandı. SPCC320.03 proteininin GO ("Gene Ontology") anotasyonu ve domen tahmini analizinde SPCC320.03'ün transkripsiyon faktörü olduğuna dair bulgular desteklendi.

Elde edilen biyoinformatik bulguları desteklemek üzere SPCC320.03'ün, *S. pombe* heksoz transporter genleri (*GHT*) üzerindeki etkisi, gerçek zamanlı PCR ile incelendi. *S. pombe* SPCC320.03 geninin delesyonunun, *GHT1* ve *GHT2* derepresyonunda artışa, *GHT3* ve *GHT4* derepresyonunda ise düşmeye sebep olduğu gösterildi. *S. pombe* SPCC320.03'ün *S. cerevisiae* RGT1'in fonksiyonel ortoloğu olduğu ve *GHT1*, *GHT2*, *GHT3* ve *GHT4* heksoz transporter genlerinin anlatımlarını glukoz varlığına bağlı olarak düzenlediği sonucuna varıldı.

Aralık 2018, 62 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, Glukoz metabolizması, Biyoinformatik, Transkriptomik, RGT1, SPCC320.03, GHT, HXT

SUMMARY

M.Sc. THESIS

BIOINFORMATICS AND TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF GLUCOSE METABOLISM IN *Schizosaccharomyces pombe*

Medet TAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Asst. Prof. Semian KARAER UZUNER

Glucose as well as being a preferred carbon source in most organisms, is also involved in the regulation of various metabolic activities and different processes such as growth and cell division. In yeasts, detection of sugars and stimulant molecules with diverse structures and functions, and subsequent signal transduction are done through a system consisting of heterotrimeric G-protein and G protein-coupled cell surface receptors. As glucose is detected, cAMP / protein kinase A (cAMP / PKA) signal transduction pathway is activated. Then, glucose is transported into cell by hexose transporters located in cell membrane and is phosphorylated by hexokinases in cytoplasm and is directed to glycolysis for use as a carbon and energy source.

Although glucose sensing and signaling pathways are revealed in detail in *Saccharomyces cerevisiae*, there is no detailed data on these pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. With this study, we aimed to investigate glucose sensing and glucose signaling pathways in *S. pombe* using bioinformatics approaches, with the help of *RGT1* transcription factor gene, the regulator of hexose transporters in *S. cerevisiae*, and to reveal homologies, differences, and to analyze gene expression profiles of this gene in *S. pombe* with real time PCR technique.

By performing bioinformatics studies on *S. cerevisiae* RGT1 and its *S. pombe* orthologue, a putative transcription factor SPCC320.03, we obtained findings that these two genes as well as having sequence similarity might be functional orthologs. BLAST analysis of RGT1 and SPCC320.03 proteins were performed first. The entire protein

sequence including the DNA binding domain of RGT1 (amino acids 46-76) was found to be highly conserved in SPCC320.03. The findings of GO (Gene Ontology) annotation and domain prediction analysis of SPCC320.03 protein, supported the findings that SPCC320.03 is a transcription factor.

The effect of SPCC320.03 on *S. pombe* hexose transporter genes (*GHT*) was investigated by real-time PCR to support the bioinformatics findings obtained. Deletion of *SPCC320.03* gene in *S. pombe*, was shown to cause increased derepression of *GHT1* and *GHT2*; and reduced level of derepression of *GHT3* and *GHT4*. It is concluded that *S. pombe* SPCC320.03 is a functional ortholog of *S. cerevisiae* RGT1, and regulates expression of *GHT1*, *GHT2*, *GHT3* and *GHT4* hexose transporter genes in response to glucose.

December 2018, 62 pages.

Keywords: *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, Glucose metabolism, Bioinformatics, Transcriptomics, RGT1, SPCC320.03, SP292, GHT, HXT

1. GİRİŞ

Glukoz $C_6H_{12}O_6$ moleküler formüllü, 6 karbon atomu, 12 hidrojen atomu ve 6 oksijen atomundan oluşan basit bir şekerdir. Bileşik bir şeker olmadığı için glukoz bir monosakkarittir ve 6 karbon içermesi sebebi ile bir monosakkarit alt grubu olan heksozlar altında sınıflandırılır. Aldehit grubu ($-CHO$) bulundurduğu için aldoheksoz olarak da tanımlanır.

Glukoz D-izomeri dekstroz olarak da adlandırılır; D-glukoz hemen hemen tüm canlılarda en temel enerji ve karbon kaynağıken, L-glukoz heksokinazlar tarafından fosforlanmadığından bazı bakteriler hariç enerji kaynağı olarak kullanılamaz (Ken-Ichi ve Anthony, 1979). Glukozun en çok kullanılan heksoz olmasının sebeplerinden biri, kararlı bir siklik yapıya sahip olması, dolayısı ile proteinlerin amin gruplarına “nonspesifik” bağ (glükasyon ya da nonenzimatik glikozilasyon) yapma ihtimalinin diğer aldoheksozlara göre daha düşük olmasıdır (Bunn ve Higgins, 1981).

İnsanda glukoz transporterler (“glucose transporter”) iki aileye ayrılır: Na^+ -glukoz simporterler (“symporter”) veya kotransporterler (“cotransporter”) olarak tanımlanan SGLT’ler ve kolaylaştırılmış difüzyon sağlayan transporterler (GLUT’lar). SGLT’ler ince bağırsak ve böbreklerde özelleşmiş epitel hücrelerde bulunur ve aktif taşıma ile glukozun hücre içine alınmasını sağlarlar. Na^+K^+ ATPaz (sodyum potasyum pompası) aktivitesi sonucu, hücre içinde Na^+ konsantrasyonu bağırsak ve böbrek lümeninden düşük tutulur. SGLT’ler Na^+ taşınması ile glukoz taşınmasını eşleştirerek glukozu yüksek verimlilikle hücre içine taşır (Scheepers ve diğ., 2003).

Çoğu dokuda bulunan, kolaylaştırılmış difüzyon ile glukoz taşınmasını sağlayan GLUT’lar ise enerji gerektirmeden glukozu iki yönlü taşıyabilir. İnsanda SGLT ailesinden 12, GLUT ailesinden 14 gen vardır (Zhao ve Keating, 2007).

Mayalarda hücre dışındaki glukoz konsantrasyonu, glukoz sensörlerinin başlattığı sinyal ile hücre içine glukoz alımını sağlayan glukoz transporter genlerinin anlatımını indükler ya da baskılar. *S. cerevisiae*'da 20 kadar gen glukoz transporter benzeri protein kodlar (Boles ve Hollenberg, 1997). *HXT1-17* heksoz transporter genleridir; *GAL2* aynı zamanda glukozda taşıyabilen bir galaktoz transporter kodlar; *SNF3* ve *RGT2* heksoz transporterlere homolog glukoz sensörlerini kodlar. *S. pombe*'de *S. cerevisiae* ile homolog 8 heksoz transporter vardır (*GHT1-8*); *S. pombe* glukoz sensörü *GIT3* ise *S. cerevisiae* glukoz sensörleri ile homoloji göstermez.

GHT1, *GHT2*, *GHT5* ve *GHT6* genlerinin glukoz transport edemeyen *S. cerevisiae* irkında heterolog ekspresyonu yaptırıldığında glukoz transport yeteneğinin geri kazandırıldığı görülmüştür (Heiland ve diğ., 2000). Yüksek glukoz konsantrasyonu içeren besiyerinde üreyen *S. pombe* hücrelerinde *GHT2*, *GHT5* ve *GHT6*'nın anlatımı yapılırken, *GHT1*, *GHT3* ve *GHT4* repress edilir; düşük glukoz konsantrasyonunda ise *GHT5*'in anlatımı daha da artar, *GHT3* ve *GHT4* ise dereprese edilir (Heiland ve diğ., 2000).

S. cerevisiae'da *RGT1* transkripsiyon faktörü heksoz transporterlerinin anlatımını repress eder. Glukoz varlığında *RGT1*, *PKA* tarafından fosforillenerek DNA'ya bağlanma aktivitesi baskılanır, dolayısıyla heksoz transporter genleri dereprese edilmiş olur. *RGT1* regülatörü *MTH1* *RGT1* fosforilasyonunu engeller. Ekstrasellüler glukoz ile indüklenen *SNF3* ve *RGT2* membran proteinleri *MTH1* ve *STD1* (*MTH1* homoloğu) proteinlerinin fosforillenmesini sağlayan sinyali başlatır. Fosforillenerek işaretlenen *MTH1* ve *STD1* proteozom tarafından degrade edilir. *MTH1* degradasyonu ile *RGT1* *PKA* tarafından fosforillenir ve heksoz transporter genleri dereprese olur (Rolland ve diğ., 2002).

Bu çalışmada *S. cerevisiae* *RGT1* geni ile DNA BLAST analizinde homoloji gösteren *S. pombe* *SPCC320.03* tahmini transkripsiyon faktörü geninin *S. pombe* heksoz transporter genleri üzerindeki etkisi üzerine araştırma yapıldı. Bioneer'den *S. pombe* Δ *SPCC320.03* (*ade6-M216* *Aura4* *leu1-32* Δ *SPCC320.03*) ırkı satın alma yolu ile temin edildi; kontrol olarak *SP292* (*S. pombe* *ade6-M216* *Aura4* *leu1-32*) ırkı kullanıldı.

Her iki ırk yüksek glukoz besiyerinde üretildi; üretilen hücreler santrifüj ile çöktürölüp besiyerinden ayrıldı. Hücrelerin yarısı kontrol grubu olarak taze yüksek glukoz besiyerine ekilirken, diğer yarısı deney grubu olarak gliserol besiyerine ekildi. Yeni besiyerlerinde üremeye bırakılan hücrelerden total RNA izolasyonu yapıldı. RNA örnekleri oligo-dT ve rastgele primer karışımı içeren, ticari bir ters transkripsiton kiti ile cDNA'ya çevrilip -20 °C'de saklandı.



2. GENEL KISIMLAR

2.1. *Schizosaccharomyces pombe*

Fizyon mayası *Schizosaccharomyces pombe* çubuk şekilli, tek hücreli *Ascomycetes* sınıfından bir mantardır. *S. cerevisia* normal koşullarda haploid ve diploid olarak üreyebilirken, *S. pombe* normal koşullarda haploiddir (h^+ ve h^- ve homotallik h90 eşey tipleri). Besin açlığında veya oksidatif stres ile DNA hasarına sebep olabilecek hidrojen peroksit (H_2O_2) maruz bırakıldığında karşıt eşeyli hücreler birleşip diploid zigotu oluştururlar. Zigotun mayoz bölünmeye uğraması ile dört haploid spor içeren ascus oluşur. Haploid hücrelerde mitoz ortadan bölünme şeklinde gerçekleşir, yavru hücrelerde *S. cerevisiae* gibi görünür bir asimetri gözlemlenirse de makromoleküllerin asimetrik paylaşımı ve replikatif yaşlanma görülür (Barker ve Walmsley, 1999).

S. pombe'nin üç kromozoma ayrılmış, rDNA hariç 12.57 Mbp'lik genomu 4981 protein ve 1538 ncRNA için gerekli genetik kodu taşır (Wood ve diğ., 2012). Mayaların genomu, yüksek ökaryotlara göre oldukça küçüktür. Laboratuvar koşullarında kolay ve hızlı üreyebilmesi, kolay mutant elde edilebilmesinin dışında *S. pombe*, metazoalar ile birçok önemli süreçte benzerlikler gösterir: büyük kromozom yapısı, sentromer yapısı; heterokromatik histon metilasyonu, kromodomen heterokromatin proteinleri, heterokromatin yapısının siRNA ile düzenlenebilmesi; G2/M hücre döngüsü, sitokinez; sinyalozum ("signalosome") ve splisozom. Bu özellikler *S. cerevisiae*'de ya yoktur ya da oldukça farklılaşmıştır. Genellikle *S. pombe* ile metazoalar arasındaki ortolog genler metazoalar ile diğer mayalar arasında olduğundan daha fazla benzerdirler (Wood ve diğ., 2002).

S. pombe diğer fizyon mayaları *S. octosporus*, *S. cryophilus* ve *S. japonicas* ile beraber Ascomycota sınıfının bazal bir dalını oluşturur (Rhind ve diğ., 2011). Bu organizmaların genom dizisinin çıkarılması ile beraber ilk defa *S. pombe* ile yüksek derecede benzerlik gösteren mayaların karşılaştırılması mümkün olmuştur. Örneğin

Rhind ve arkadaşları (2011) bu çalışmalarında *S. pombe*'nin 34 geninin horizontal gen transferi ile bakterilerden geldiğini öne sürmüşlerdir.

2.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Tomurcuklanan maya olarak bilinen, genetik, biyokimya ve sistem biyolojisi çalışmaları için model organizma olan *Saccharomyces cerevisiae*, genomu dizilenen ilk ökaryottur (Goffeau ve diğ., 1996). Asimetrik hücre bölünmesi sonucu ana hücre ile yavru hücrenin ayırt edilebilmesi sebebi ile hücre bölünmesi, yaşlanma ve kalori kısıtlaması; ayrıca glukoz ve diğer besinlerin algılanması, glukoz sinyal iletimi ve glukoz metabolizması üzerine en çok çalışılmış organizmalardan biridir (Longo ve diğ., 2012).

2.3. *S. cerevisiae*'DA GLUKOZ METABOLİZMASI

Memeliler, açlık durumunda kandaki düşük glukoz düzeyini glukagon ve epinefrin hormonları ile glukoneogenezi aktive edip yükselterek ve gıda tüketimi sonrasında heksoz transporterler ile ince bağırsaklardan kana taşınan glukozun, kandaki glukoz düzeyini yükseltmesine cevap olarak, insülin ile kandaki glukoz düzeyini düşürerek, kandaki glukoz düzeyini sabit tutmaya çalışır (kan şekeri homeostazı). Tümör hücreleri, oksijen varlığında dahi yüksek miktarda glukozu laktik asit fermentasyonu ile metabolize eder (Warburg, 1956). Bu Warburg etkisi olarak adlandırılır. Tümör tespiti için kullanılan PET ("Positron emission tomography") görüntüleme yönteminde, tümör dokularındaki yüksek glukoz tüketimi özelliğinden yararlanır.

Glukoz varlığında *S. cerevisiae*, tümör hücrelerindeki benzer şekilde, oksijen varlığında da etanol fermentasyonu yapar (Diaz-Ruiz ve diğ., 2009). Bu sebeple *S. cerevisiae* fakültatif anaerobdur ve *S. cerevisiae*'da glukozun oksijenli solunumu baskılamasına, ya da farklı bir deyişle *S. cerevisiae*'nin aerobik etanol fermentasyonu yapmasına Crabtree etkisi denir (Lagunas, 1979).

Warburg Etkisi

Warburg etkisi gösteren, normalden daha fazla miktarda glukoz tüketen, yüksek glikoliz aktivitesi gösteren kanser hücreleri, ATP üretimini, genellikle yalnızca glikolizden

karşılıklı olarak ortaya çıkan pirüvatı fermentasyon ile laktik aside indirir. Oksijenli solunum, glikolizden çok daha fazla ATP sağlarken, kanser hücrelerinde bölünme için gerekli yüksek miktarda enerji, glukoz transporter genlerinin ve glikoliz enzimlerinin anlatımının (“up-regulation”) artmasıyla sağlanır (Diaz-Ruiz ve diğ., 2011). Diaz-Ruiz ve arkadaşlarının (2011) belirttiği gibi, kanser hücrelerindeki aerobik fermentasyon Crabtree-pozitif mayalardaki aerobik fermentasyona oldukça benzerlik gösterir. Mayalarda aerobik fermentasyonun evrimi araştırmaları da, kanser hücrelerinin nasıl aerobik fermentasyon yeteneği kazandığına (somatik evrim) dair araştırmalara ışık tutabilir.

Aerobik fermentasyonun evrimi

Pişkur ve arkadaşları (2006) mayalarda aerobik fermentasyona olanak sağlayan ortamın yaklaşık 125 milyon yıl önce bitkilerde meyvenin evrimi ile ortaya çıktığını söylemişlerdir (Pişkur ve diğ., 2006). Meyveler yüksek miktarda basit şeker kaynağı olduklarından, bakteriler ve mayalar için uygun üreme ortamı sağlarlar. Bakterilerin atasal mayadan daha hızlı bölündüğü düşünülürse, mayalar etanol gibi bir toksik madde salgılayarak bakteriler ile rekabet olanağı kazanmışlardır (Pişkur ve diğ., 2006). Etanol hücre dışına salgılandığından, biyokütle olarak kullanılabilir pirüvat miktarı da düştüğünden, Crabtree-pozitif mayalar glukoz transportu ve glikoliz aktivitesini artırmışlardır (Dashko ve diğ., 2014).

2.4. *S. cerevisiae*'DA GLUKOZ SİNYAL YOLAKLARI

S. cerevisiae'da glikoliz hızını sınırlayan adım genel olarak hücre içine glukoz transportu olduğundan ve fermentasyon ile enerji üretimi verimsiz olduğundan, *S. cerevisiae* glukoz transporter genlerinin anlatımını artırarak, hücre içine yüksek miktarda glukoz taşınmasını sağlar (Ozcan ve Johnston, 1999). *S. cerevisiae*, ürediği ortamdaki değişken glukoz konsantrasyonlarına uygun cevap verebilir. Örneğin ortamdaki glukoz konsantrasyonuna en uygun *HXT* genlerinin anlatımı yapılır. Düşük afinite glukoz transporterleri *HXT1*'in yüksek glukoz konsantrasyonunda (> ~1%) anlatımı yapılırken, yüksek afinite glukoz transporterleri *HXT2* ve *HXT4*'ün düşük glukoz konsantrasyonunda (~0.2%) anlatımı yapılır. Orta düzeyde glukoz afinitesi

gösteren *HXT3*'ün ise hem düşük hem yüksek glukoz konsantrasyonunda anlatımı yapılır. (Ozcan ve Johnston, 1995).

S. cerevisiae'da glukoz sinyalinde rol oynadığı gösterilen beş yolak vardır: RAS/PKA (cAMP-PKA), GPR1/GPA2, SCH9, SNF1 ve RGT2/SNF3-RGT1. Bunlardan RGT2/SNF3, GPR1/GPA2 ve RAS/PKA hücre içine glukoz ve diğer heksozların taşınmasını sağlayan heksoz transporter genlerinin (*HXT*'ler) anlatımını doğrudan etkileyen yollardır (Zaman ve diğ., 2009).

PKA ve SCH9

SNF1 ve RGT2/SNF3-RGT1 sinyal yolları glukozla, özelleşmiş ancak sınırlı bir cevap vermektedir (Zaman ve diğ., 2009). Glukoz ile indüklenen değişimlerin %90'ından PKA'nın (protein kinaz A) aktive edilmesi veya SCH9'un (insan PKB homoloğu) indüklenmesi sorumludur (Zaman ve diğ., 2009). SCH9 sinyal yolağının bloklanması glukoz cevabını etkilemezken, PKA sinyalinin bloklanması glukoz cevabını etkiler (Zaman ve diğ., 2009). PKA ve SCH9 her biri farklı besinlerin varlığına bağlı olarak (SCH9 glukozla duyarsız, PKA ise duyarlı) büyümeyi teşvik eden transkripsiyon programını regüle ederler (Shadia Zaman ve diğ., 2009). PKA'nın aktive edilmesi, herhangi bir büyüme ya da metabolizma artışı olmadan dahi transkripsiyonel büyüme programını indükler, bu da büyüme programının metabolik olarak değil, ortamdaki besinlerin algılanması ile kontrol edildiğini göstermektedir (Zaman ve diğ., 2008).

SNF1

S. cerevisiae *SNF1* geni ökaryotlarda oldukça korunmuş, bir serin/teronin kinazdır. Memelilerdeki homoloğu AMPK ("AMP-activated kinase") gibi, *S. cerevisiae* SNF1 protein kinaz (AMPK α katalitik alt birimi ortoloğu), SNF4 (AMPK γ regülatör alt birimi ortoloğu) ve SIP1/SIP2/GAL83 (AMPK β alt birimi ortoloğu) proteinlerinden biri ile beraber heterotrimerik bir kompleks oluşturur (Carlson ve diğ., 1981; Amodeo ve diğ., 2007). Memelilerde AMPK intrasellüler AMP ile regüle edilirken, SNF1 intrasellüler ADP konsantrasyonuna bağlı olarak regüle edilir.

SNF1/AMPK protein kinazlar, ökaryotlarda enerji homeostazında temel rol oynar. Hücrede enerji düşüşü (AMP veya ADP artışı) ile aktive olur, ATP üretimi sağlayan

yolakları indükler ve ATP tüketilen yolakları baskılar. *S. cerevisiae*'da SNF1 kompleksi de, hücre içine glukoz transportu azaldığında oluşan hücrenin düşük enerji durumunda indüklenerek, başlıca glukoz derepresyonunda rol oynar (Wilson ve diğ., 1996).

S. cerevisiae'da, besi ortamında glukoz azaldığında ya da glukoz yerine gliserol ve etanol gibi alternatif karbon kaynakları bulunduğunda, SNF1 “upstream” kinazlar tarafından fosforillenerek aktif hale gelir ve MIG1 transkripsiyon represörünü inaktive ederek, CAT8 ve ADR1 transkripsiyon aktivatörlerini ise aktive ederek gen anlatımını düzenler (Woods ve diğ., 1994;). Glukoz varlığında REG1/GLC7 (“protein phosphatase 1 complex”) SNF1'i defosforile ederek inaktive eder (Sanz ve diğ., 2000). *S. cerevisiae* yabani ve $\Delta SNF1$ ırklarının gen anlatımı karşılaştırıldığında SNF1'in 500 kadar genin anlatımını etkilediği gösterilmiştir (Tachibana ve diğ., 2005).

GRPR1/GPA2

S. cerevisiae GPR1/GPA2 sinyal transdüksiyon yolağı memelilerde olduğu gibi PKA'yı aktive eder. GPR1/GPCR (“G protein-coupled receptor 1”), glukoz sensörüdür; glukoz varlığında GPA2 (“G protein alpha subunit”) aracılığı ile adenilat siklazı aktive eder. Adenilat siklaz ATP'yi, bir sinyal molekülü olan cAMP'ye dönüştürür. Artan cAMP konsantrasyonu, cAMP bağımlı protein kinaz olarak da adlandırılan PKA'yı aktive eder (Kubler ve diğ., 1997). Kubler ve arkadaşları, *S. cerevisiae* GPR1/GPA2 yolağının glukozla bağılı hücresel büyüme-bölünme programını etkilediğini, ancak glukozla hızlı (akut) transkripsiyonel cevap sağlamadığını göstermişlerdir.

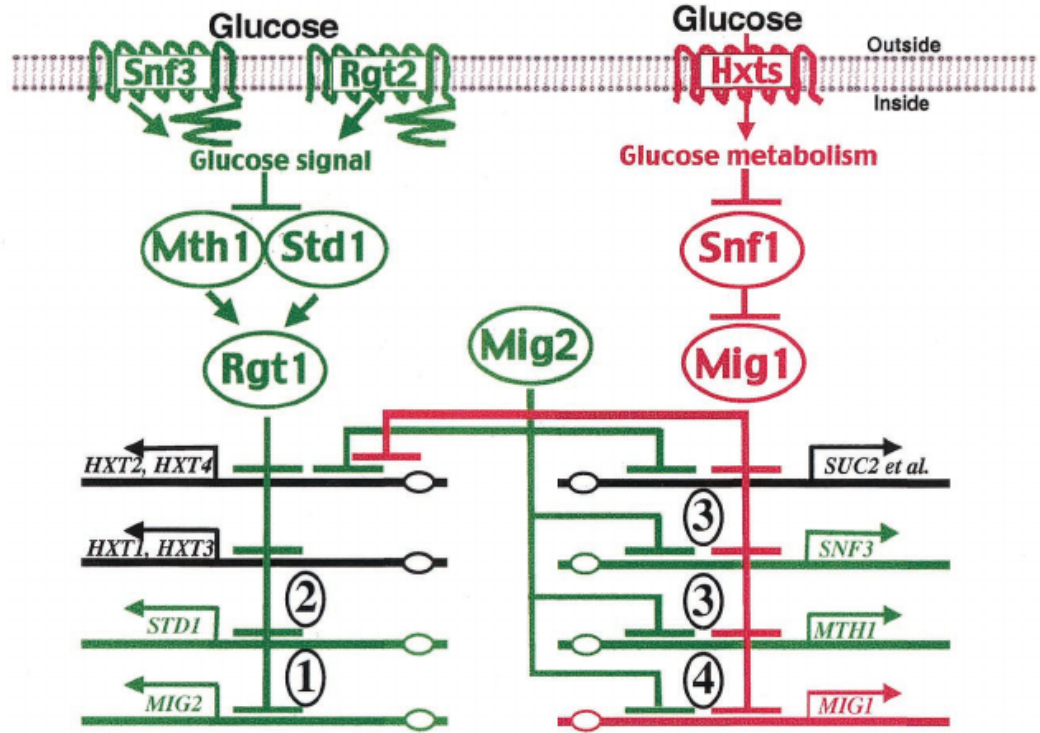
S. cerevisiae'da, cAMP yolağının glukoz veya sukroz ile hızlıca aktivasyonunun GPR1 varlığına bağımlı olduğu gösterilmiştir (Lemaire ve diğ., 2004). Ayrıca aynı çalışmada glukoz ve sukrozun GPR1 ile doğrudan etkileşime geçen ligandlar olduklarına dair bulgular sistein tarama mutagenezi ve SCAM (substituted cysteine accessibility method) yöntemleri ile elde edilmiştir.

RGT2/SNF3

S. cerevisiae RGT2 ve SNF3 membran proteinleri, HXT'lere homolog, heksoz transport yeteneklerini yitirmiş glukoz sensörleridirler (Özcan ve diğ., 1998). SNF3, yüksek afiniteli glukoz sensörüdür, düşük konsantrasyonda glukozu algılayabilir ve heksoz

transporter genlerinin anlatımını indükler. Hücre içinde bulunan C-terminal ucu yokluğunda sinyal başlatılamaz (Dietvorst ve diğ., 2010). Glukoz dışında fruktoz ve mannoz da algılayabilir. (Lewis ve Bisson, 1991). RGT2, SNF3 ile homologdur; yüksek konsantrasyonda glukozu algılayabilen, düşük afiniteli glukoz sensörüdür (Özcan ve diğ., 1998).

Ekstrasellüler glukoz RGT2 ve SNF3 ile algılandığında, membrana bağlı YCK1 ve YCK2 kazein kinazları aktive olur. Bu kinazların, MTH1 ve STD1 regülör proteinleri doğrudan fosforilleyerek, proteozom tarafından degrade edilmelerini sağladığı düşünülürken, Pasula ve arkadaşları MTH1'in nükleusta degrade edildiğini, membrana bağlı YCK1/2 ile doğrudan etkileşimi önünde lokalizasyon engeli olduğunu göstermişlerdir (Pasula ve diğ., 2010).



Şekil 2.1: *S. cerevisia*'da glukoz sinyal yollarının kesişmesi (Kaniak ve diğ., 2004).

Yeşil renkle gösterilen bileşenler SNF3/RGT2 sensörlerinden başlayan glukoz sinyaline cevap vermektedir. Kırmızı renkle gösterilenler ise SNF1 kinaz ile başlayan sinyale cevap veren bileşenlerdir.

Glukoz varlığında, yani MTH1 ve STD1 proteinleri degrade edilmişken, MIG1 *MTH1* geninin anlatımını baskılar, ancak STD1'in anlatımını artırır. Bunun glukoz tükendiğinde

hızlı bir transkripsiyonel cevap verebilmek için olduğu düşünülmüştür (Kim ve Johnston, 2006). MTH1 ve STD1, RGT1 transkripsiyon represörüne bağlanarak, RGT1'in PKA tarafından fosforlanıp deaktive edilmesini engellerler. Glukoz hem PKA'nın nukleusa translokasyonunu hem de MTH1 ve STD1'in degrade edilmesini indükleyerek, RGT1'in PKA tarafından hiperfosforlizasyonunu sağlar (Griffioen et al. 2000; Kim and Johnston 2006; Roy et al. 2013, 2014). Hiperfosforlanan RGT1 represörü DNA'dan kopar, RGT1 tarafından baskılanan glukoz transporter genlerinin (HXT) anlatımı gerçekleşir (Palomino ve diğ., 2006). Glukoz tükendiğinde MTH1 ve STD1, RGT1 ile etkileşime girerek, PKA aktivitesine inhibe eder, ve RGT1'in promotor bölgelere bağlı kalmasını, *HXT* genlerin anlatımının baskılanmasını sağlar (Flick ve diğ., 2003).

PKA dışında SNF1'in de RGT1'i fosforilleyebildiği ve RGT1'in DNA'ya bağlanma aktivitesini etkilediği, SNF1 ve RGT1 arasındaki bu etkileşimin *HXT* genlerinin anlatımının kademeli olarak dereprese edilmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (Palomino ve diğ., 2006).

RGT1 delesyonlu *S. cerevisiae* ırklarında *HXT* genlerinin devamlı ekspresyonu gerçekleşir, SNF3 ve RGT2 sensörlerinin delesyonunda ise glukoz *HXT* genlerinin anlatımını indükleyemez (Ozcan ve Johnston, 1995).

2.5. *S. cerevisiae*'DA GLUKOZ TRANSPORTERLER

S. cerevisiae'da 20 kadar gen glukoz transporter benzeri protein kodlar (Boles ve Hollenberg, 1997). *HXT1-17* heksoz transporter genleridir; *GAL2* aynı zamanda glukozda taşıyabilen bir galaktoz transporter kodlar; *SNF3* ve *RGT2* heksoz transporterlere homolog glukoz sensörlerini kodlar.

HXT1 düşük afiniteli glukoz transporteridir; fruktoz, galaktoz ve mannoz da taşıyabilir (Reifenberger ve diğ., 1997); ekspresyonu glukoz varlığında *HXK2* tarafından indüklenir, glukoz açlığında RGT1 ile baskılanır (Rodríguez ve diğ., 2001). RGT1 delesyonunda, glukoz *HXT1* anlatımını tamamıyla indükleyemez (Mosley ve diğ., 2003). *HXT1* ve *HXT6* genleri paralogdur (Byrne ve Wolfe, 2005).

HXT2 yüksek afiniteli glukoz transporteridir; fruktoz ve mannoz da transport edebilir (Reifenberger ve diğ., 1997); anlatımı glukoz açlığında indüklenir, yüksek glukoz varlığında repress edilir.

HXT3 düşük afiniteli glukoz transporteridir; fruktoz ve mannoz transportu da yapabilir (Reifenberger ve diğ., 1997). Düşük ve yüksek glukoz varlığında da anlatımı gerçekleşir. (Ozcan ve Johnston, 1999). *HXT3* ve *HXT5* genleri paralogdur (Byrne ve Wolfe 2005). *HXT5* orta düzeyde afiniteli glukoz transporteridir ve fermente edilemeyen karbon kaynakları varlığında anlatımı indüklenir (Diderich, 2001).

HXT4 yüksek afiniteli glukoz transporteridir ve çeşitli heksozları taşıyabilir (Reifenberger ve diğ., 1997), *HXT2* gibi anlatımı glukoz açlığında indüklenir, yüksek glukoz varlığında repress edilir (Ozcan ve Johnston, 1999). *HXT7* ile paralogdur (Byrne ve Wolfe, 2005).

HXT6 ve *HXT7* yüksek afiniteli glukoz transporteridirler; fruktoz, galaktoz ve mannoz transport aktivitesine de sahiptirler (Reifenberger ve diğ., 1997). Diğer *HXT* genlere göreceli olarak bazal düzeyde anlatımları yüksektir. Glukoz ile repress olur (Ozcan ve Johnston, 1999).

HXT8, *HXT9* ve *HXT10* genlerinin anlatımı glukoz düzeyine bağlıdır, *HXT* genlere benzer protein kodlarlar. Ancak işlevleri henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. *HXT11* glukoz, fruktoz, mannoz ve galaktoz taşıyabilen bir transporterdir (Ozcan ve Johnston, 1999).

2.6. *S. pombe*'DE GLUKOZ TRANSPORTERLER

S. pombe'de *S. cerevisiae* ile homolog 8 heksoz transporter benzeri gen vardır (*GHT1-8*). *GHT1*, *GHT2*, *GHT5* ve *GHT6* genlerinin glukoz transport edemeyen *S. cerevisiae* ırkında heterolog ekspresyonu yaptırıldığında glukoz transport yeteneğinin geri kazandırıldığı görülmüştür (Heiland ve diğ., 2000). Yüksek glukoz konsantrasyonu içeren besiyerinde üreyen *S. pombe* hücrelerinde *GHT2*, *GHT5* ve *GHT6*'nın anlatımı yapılırken, *GHT1*, *GHT3* ve *GHT4* repress edilir; düşük glukoz konsantrasyonunda ise *GHT5*'in anlatımı daha da artar, *GHT3* ve *GHT4* ise derepress edilir (Heiland ve diğ., 2000).

GHT1 yüksek afiniteli glukoz ve fruktoz transport edebilmesine rağmen, anlatımı yalnızca glukonat ve maltoz ile indüklenir (Heiland ve diğ., 2000). GHT2 afinitesi belirsiz glukoz ve fruktoz transporteridir; glukoz açlığında ekspresyonu düşer (Saitoh ve diğ., 2015).

Glukonat varlığında ekspresyonu en yüksek heksoz transporterler GHT3 ve GHT4'tür. GHT3 glukonat taşıyıcısıdır; GHT3 ile GHT4 proteinlerinin dizileri oldukça benzer olmasına rağmen GHT4 glukonat taşıyamaz (Heiland ve diğ., 2000). GHT3 ve GHT4'ün anlatımları glukoz açlığında artar (Saitoh ve diğ., 2015).

GHT5 yüksek afiniteli glukoz ve fruktoz transporteridir. *S. pombe*'nin ana glukoz taşıyıcısıdır, glukoz açlığında anlatımı daha da artar (Saitoh ve diğ., 2015).

GHT6 fruktoz afinitesi glukoz afinitesinden daha yüksek bir glukoz ve fruktoz transporteridir (Heiland ve diğ., 2000); anlatımı glukoz açlığında artar (Saitoh ve diğ., 2015).

GHT7'nin ekspresyonu anlamlı düzeyde değildir, tek hücre düzeyinde mRNA miktarı 0.012-0.022 aralığındadır (Marguerat ve diğ., 2012). GHT8 afinitesi bilinmeyen bir heksoz taşıyıcı benzeri proteindir (Heiland ve diğ., 2000); glukoz açlığında anlatımı artar (Heiland ve diğ., 2000).

2.7. *S. cerevisiae* RGT1 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ

RGT1, ekstrasellüler glukozun hücre içine alımını sağlayan *HXT* genlerinin anlatımını glukoz varlığına duyarlı biçimde düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Glukoz yokluğunda *HXT* genlerinin anlatımını bastırır, glukoz varlığında ise *HXT1*'in anlatımını aktive eder (Ozcan ve diğ., 1996).

RGT1 transkripsiyon faktörü domenleri Polish ve arkadaşları tarafından deneysel olarak tespit edilmişlerdir. RGT1 dört fonksiyonel domen bulundurmaktadır (Polish ve diğ., 2005):

- DNA-bağlayan “zinc cluster” domeni (46-76 amino asitleri),
- Transkripsiyon baskılaması için SSN6 korepresör ile etkileşim gösteren domen (210-250),

- Transkripsiyon aktivasyonu (320-380),
- Ve bu aktiviteyi düzenleyen bölge (310-320 ve 400-410),
- Glukoz varlığında transkripsiyon baskılama aktivitesini DNA-bağlayan domene bağlanıp molekülü DNA'dan ayırarak inhibe eden domen (520-830 ve 80-90) – bu domenler arası etkileşim Mth1 ile inhibe edilir.

2.8. *S. pombe* SPCC320.03 TAHMİNİ TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ

Schizosaccharomyces pombe SPCC320.03 tahmini transkripsiyon faktörü, RGT1 ortoloğudur. Ancak SPCC320.03'ün genetik etkileşim ve protein-protein etkileşimi gösterdiği tahmin edilen genler ve proteinler listesinde *S. pombe* heksoz transporterler (GHT) yoktur:

- Pierre R. Bushel ve arkadaşlarının microarray çalışmaları sonucu, *S. pombe*'de tahmin ettikleri gen regülasyon ağına göre genetik etkileşimler (Bushel ve diğ., 2009): SPAP7G5.06(PER1), SPAC26H5.07C, SPBC13A2.03, SPAC3G9.05(SPA2), SPAC29A4.16(HAL4), SPCC1393.06C(IPI1), SPAC6F6.03C,
- Biogrid (Chatr-Aryamontri ve diğ., 2013) protein ve genetik etkileşim veritabanına göre genetik etkileşimler: SPBC354.05C(SRE2) (Stewart ve diğ., 2011), SPCC162.11C, SPAC29A4.18(PRW1), SPAC6B12.12(TOM70), SPAC23H4.08(IWR1), RPL160, SPAC23H4.17C(SRB10, CDK8, PRK1), SPBC428.08C(CLR4), SPCC895.06(ELP2), SPAC25A8.01C(FFT3, SNF2SR), SPBC947.08C(HIP4) (Ryan ve diğ., 2012),
- Biogrid protein ve genetik etkileşim veritabanına göre fiziksel etkileşimler: SPCC736.08(CBF11) (Pancaldi ve diğ., 2012),
- StringDB (Franceschini ve diğ., 2012) protein-protein etkileşim veritabanına göre: SPCC1393.08, SPBC25B2.11(POF2), SPBC23E6.09(SSN6), SPCC191.01, SPCC1322.08(SRK1), SPCC1020.10(OCA2), SPCP1E11.05C, SPCC757.11C, SPCC794.04C.

2.9. BİYOİNFORMATİK

Frederick Sanger'in insülin amino asit dizisini çıkarmasından (Sanger, 1952) sonra yaygınlaşan protein dizilerinin karşılaştırılması zorluğunu aşmak için bilgisayar

kullanımı temel bir yöntem oldu. RNA dizilemenin öncülerinden Min Jou ve arkadaşları, 1972'de ilk defa bir genin dizisini çıkardılar (Min Jou ve diğ., 1972); 1976'da ise Bakteriofaj MS2'nin RNA genomunun tümünü dizileyerek başka bir ilki başarmışlardır (Fiers ve diğ., 1976). Dizilenen ilk DNA genomu, Frederick Sanger ve arkadaşları tarafından, bacteriophage ϕ X174 genomu olmuştur (Sanger ve diğ., 1977).

İnsan Genom Projesi'nin başlaması ve DNA dizileme yöntemlerindeki gelişmeler biyolojik verilerin hızla artmasına, biyoinformatiğin gelişmesine sebep olmuştur. Günümüzde genomik (genom anotasyonu), transkriptomik, proteomik, protein-protein etkileşimleri, protein-DNA etkileşimleri, metabolik yollar, sinyal transdüksiyonu, taksonomik veritabanları gibi çeşitli veritabanları biyolojik verilerin hem saklanması hem de analiz edilebilmesini sağlar.

Genom anotasyonu, genomda genlerin konumları, işlevleri, mRNA'daki intron ve ekzon bölgeleri, promotor bölgeleri, mRNA dizileri ("alternatif splicing"), protein dizileri, ncRNA dizileri gibi bilgilerin elde edilmesini sağlar. Bir organizmanın genom dizisi çıkarıldığında, ilk yapılan BLAST (Altschul ve diğ., 1990) gibi yöntemlerle gen tahmini yapılmasıdır. Tahmini protein dizileri protein veritabanlarında aratılarak, protein domenleri, aktif bölge ya da motifler bulunabilir. Protein-protein etkileşimleri ve metabolik yollar veritabanlarından yararlanılarak gen işlevi ve genetik etkileşim tahminleri yapılabilir (Wang ve diğ., 2004). Daha sonra deneysel çalışmalarla bu etkileşimler doğrulanabilir.

Benzer organizmaların genomlarını karşılaştırılması (karşılaştırılmalı genomik) ile genom evrimi hakkında tahminlerde bulunulabilir. Gen insersiyonu, gen delesyonu, gen mutasyonu, gen duplikasyonu, transpozonlar, ekzon karışması, tüm genom duplikasyonu, poliploidizasyon, horizontal gen transferi, "de novo" gen evrimi gibi çeşitli süreçler tahmin edilebilir (Papp ve diğ., 2011).

Genom düzeyinde ilişkilendirme çalışmaları ("GWAS — Genome-wide association studies") fenotip ile birden fazla gen, düzenleyici bölge ve/veya SNP ("Single nucleotide polymorphism") gibi faktörler arasında ilişki kurmayı amaçlar. Örneğin tarım bitkilerinde verimlilik, kuraklık direnci; insanda diyabet ve kanser gibi karmaşık

fenotip ve hastalıklar genetik varyasyonlarla ilişkilendirilebilir (Wang ve diğ., 2017), (Sud ve diğ., 2017).

Mikroarray ve RNA dizileme gibi çalışmalarla elde edilen transkriptom datası gen küme zenginleştirme yöntemi (“GSEA — Gene set enrichment analysis”) ile analiz edilir. GWAS’a benzer şekilde, GSEA ile gen anlatım değişimlerinin fenotip ve hastalıklarla bağlantısı açığa çıkartılabilir (Subramanian ve diğ., 2005). Reactome gibi yolak görüntüleme ve analiz araçları ile gen anlatımı datasının yolak analizi yapılabilir (Croft ve diğ., 2014).



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BİYOİNFORMATİK ANALİZLER

S. pombe'de glukoz transportunu sağlayan *GHT* genlerinin anlatımını etkileyen yolların aydınlatılması için, *S. cerevisiae*'de *HXT* genlerini etkileyen RGT1 transkripsiyon faktöründen yararlanıldı.

S. cerevisiae RGT1 ve *S. pombe* SPCC320.03 amino asit dizi benzerliği analizi BLAST ile yapıldı. SPCC320.03'ün biyolojik aktivite, moleküler fonksiyon ve hücrel kompartıman tahminleri UniProtKB'de yapıldı. SPCC320.03 amino asit dizisi domen tahmini UniProtKB ile yapıldı.

3.2. ORGANİZMALAR

Bu çalışmada kullanılan *S. pombe* Δ SPCC320.03 ırkı Bioneer firmasında satın alma yolu ile temin edildi; diğer ırklar İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonlarından sağlandı.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan ırklar.

İrklar	Açıklama
<i>S. pombe</i> SP292	ade6-M216 Δ ura4 leu1-32, haploid
<i>S. pombe</i> Δ SPCC320.03	ade6-M216 ura4-D18 leu1-32 Δ SPCC320.03, haploid

3.3. GENEL ÇÖZELTİLER

PBS (Phosphate-buffered saline) (1 L): 8g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄ 800 mL distile suda çözdürüldü. pH 7.2 – 7.4 aralığında olacak şekilde HCl eklenerek ayarlandı. Son hacim 1000 mL olacak şekilde distile su eklendi.

Stok A₁ (1 L): 0.5 g H₃BO₄, 0.04 g CuSO₄.5H₂O, 0.1 g KCl, 0.2 g FeCl₃, 0.53 g MnSO₄.4H₂O, 1.95 g Na₂SO₄.2H₂O ve 0.4 g ZnSO₄.7H₂O 800 mL distile suda çözdürüldü; son hacim 1000 mL olacak şekilde distile su eklendi.

Stok A₂ (1 L): 10g KH₂PO₄ 1g, 5 g MgSO₄.7H₂O, 1 g NaCl, 1.5 g CaCl₂.6H₂O, 50g (NH₄)₂SO₄ ve 10 mL Stok A1 800 mL distile suda çözdürüldü; son hacim 1000 mL olacak şekilde distile su eklendi.

Stok 3a (1L): 1 g Kalsiyum pantotenat (Vitamin B5 – kalsiyum tuzu), 10g Nikotinik asit (Niasin veya Vitamin B3) ve 1 g mezo-inositol 800 mL distile suda çözdürüldü; son hacim 1000 mL olacak şekilde distile su eklendi.

Stok 3b (1L): 0.01 g Biotin (Vitamin B7) 800 mL %50'lik etanolde çözdürüldü; son hacim 1000 mL olacak şekilde %50'lik etanol eklendi.

TAE (Tris EDTA Tamponu): 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0

3.4. BESİYERLERİ

Tablo 3.2'de listelenen malzemelerle minimal besi ortamı (MMA), zengin besi ortamı (YEA), Zengin sıvı besi ortamı (YEL) gibi çeşitli besiyerleri hazırlandı.

Tablo 3.2: Besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılan malzemeler.

Malzemeler
Maya özütü,
Agar,
Distile su,
Glukoz,
Gliserol,
Adenin, Lösin, Urasil (oksotrofik markerlar)
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O
Stok A ₂ ,
Stok 3a,
Stok 3b

Besiyerleri:

Minimal besi ortamı (MMA) (1 L): 1 L MMA için, 10 g glukoz ve 1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ bir miktar distile suda çözdürüldü; 100 mL Stok A₂, 1 mL Stok 3a ve 1 mL Stok 3b eklendi; son hacim 1000 mL olacak şekilde distile su eklendi; son olarak 20 g Agar çözdürülmeden eklendi ve 1 atm basınç, 120 °C sıcaklık altında, 20 dakika otoklavlanarak steril edildi.

Besiyerleri yaklaşık 50 °C olduğunda, oksotrofik marker olarak kullanılan adenin, lösin ve urasil çeşitli kombinasyonlarda, konsantrasyonları 50 mg/L olacak şekilde, 0.22 µm por filtreden geçirilerek steril halde besiyerine eklendi.

Zengin besi ortamı (YEA) (1 L): Bu çalışmada kullanılan *S. pombe* ırklarının üretimi ve stoklanmasında kullanıldı. 1 L YEA için, 30 g glukoz ve 5g maya özütü bir miktar distile suda çözdürüldü; son hacim 1000 mL olacak şekilde distile su eklendi; son olarak 20 g Agar çözdürülmeden eklendi ve 1 atm basınç, 120 °C sıcaklık altında, 15 dakika dakika otoklavlanarak steril edildi.

YEA + genetisin: YEA besiyerine 50 mg/L olacak şekilde genetisin eklendi.

Zengin sıvı besi ortamı (YEL) %3 glukoz: YEL sıvı besiyeri YEA besiyeri ile aynı şekilde hazırlandı, ancak besiyerinin katılaşmasını sağlayan agar eklenmedi.

Zengin sıvı besi ortamı (YEL) %3 gliserol + %0.1 glukoz: YEL besiyerinden glukoz yerine gliserol kullanılarak türetildi. Bu çalışmada glukozsuz besiyeri olarak tanımlandı. %0.1 glukoz *S. pombe*'nin bölünmeye devam etmesi için gereklidir. Hazırlanması YEA besiyeri gibidir, ancak agar ve glukoz eklenmez. Glukoz besiyeri otoklavlandıktan sonra, 0.22 µm por filtreden geçirilerek steril halde besiyerine eklendi.

3.5. *S. pombe* IRKLARININ ÜRETİMİ VE STOKLANMASI

S. pombe ırklarının üretimi ve stoklanmasında Gutz ve ark. (1974)'nin önerdikleri standart yöntemler kullanıldı. Irklardan +4 °C'de eğri besi ortamında (YEA) saklanan stoklardan öze ile YEA besiyeri içeren petrilere, tek koloniye düşürmek için ekim yapıldı. Gliserol ve silika jelde saklanan stoklardan canlandırmak için petrilere ekim

yapılıp 30 °C’de 3 gün bekletildi; daha sonra üreyen kolonilerden, tek koloniye düşürmek için azaltma yöntemi ile petrilere tekrar ekim yapıldı. Stokların genotipinde bir değişim olup olmadığı her ay seçici besi yerlerine ekim yapılarak kontrol edildi.

RNA izolasyonu amacıyla, *S. pombe* üretimi için ise YEL besiyerlerine 10⁶ hücre/mL olacak şekilde ekim yapıldı.

3.5.1. Kısa Süreli Stoklar

Eğri YEA besiyerinde üretilen *S. pombe*, 4 °C sıcaklıkta 2 aya kadar canlılığını korur ve tekrar üreyebilir. Stokların kurumasını engellemek için hava almasını engelleyecek şekilde parafilm ile bantlanarak 4 °C’de saklandı.

3.5.2. Gliserol Stok

Stoklanacak *S. pombe* ırkları YEL besiyerinde, 30 °C sıcaklıkta 2 gün üretildi; %50 gliserol olacak şekilde besiyeri ve gliserol kriyojenik tüplere dökülüp karıştırıldı ve -80 °C sıcaklıkta saklandı.

3.5.3. Hücre Sayımı

Hücre sayımı yapılacak stoklar mikrosantrifüj tüplerde disitile su ile 10X veya 100X sulandırıldı. Thoma lamları ve saydam lamlar her sayım öncesi %70’lik etanol ile temizlendi. Sulandırılan örnekler Malassez lamının iki ayrı kısmına ayrı ayrı birkaç damla aktarıldı. Malassez lamının üzerine saydam lam kapatıldı ve preparat mikroskop tablasına yerleştirilerek 40x objektif ile her karedeki hücreler ayrı ayrı sayıldı ve aşağıdaki formülle stok hücre konsantrasyonu hücre/mL birimi cinsinden hesaplandı:

Hücre konsantrasyonu (hücre/mL) = Kare başına ortalama hücre sayısı x Dilüsyon katsayısı x 10⁵

3.6. ÜREME EĞRİSİNİN ÇIKARILMASI

Üreme eğrisi çıkarılacak *S. pombe* ırkları YEA besiyerinde 30 °C sıcaklıkta üretildi; bu taze stoklardan YEL besiyerine hücre konsantrasyonu 10⁶ hücre/mL olacak şekilde ekim yapıldı; çalkalamı etüvde 30 °C sıcaklıkta üremeye bırakılan hücreler 24 saat boyunca 2

saatte aralıklarla mikroskopta hücre sayımı, spektrofotometrede ise 600 nm dalga boyunda optik yoğunluğu (OD) ölçüldü.

3.7. KOLONİ PCR

Bioneer'den temin edilen Δ SPCC320.03 ırkında Kanamycin direnç geni varlığını doğrulamak için KanMX4 primerleri ile koloni PCR yapıldı.

Tablo 3.3: Koloni PCR'da kullanılan cihaz ve malzemeler.

Cihaz ve malzemeler	Miktar
“Biorad T100 Thermal Cycler” PCR cihazı	
Çift otoklavlanmış distile su	12.5 μ L
PCR tamponu	4 μ L
MgCl ₂	1 μ L
DMSO	0.6 μ L
dNTP	0.4 μ L
KanMX4 primerleri (R, F)	0.5 μ L
Kalıp, Δ SPCC320.03 kolonisinden elde edilen süspansiyon	1 μ L

Tablo 3.4: Koloni PCR programı

Açıklama	Sıcaklık	Süre
Başlangıç denatürasyonu	98 °C	30 sn
35 döngü	98 °C	10 sn
	53 °C	30 sn
	72 °C	1 dk
	72 °C	5 dk
Bitiş primer uzaması	72 °C	5 dk
Saklama	4 °C	

10 μ L distile su bulunan mikrosantrifüj tüpe, YEA besiyerinden iğne ucu ile alınan hücreler bırakıldı. Mikrosantrifüj tüpte hücreler homojen dağılacak şekilde vortekslenip

süspanse edildi. Toplam hacim 20 μ L olacak şekilde yukarıdaki malzemeler ve hücre süspanasyonu PCR tüpüne eklendi. PCR tüpü yukarıdaki programa göre PCR cihazında inkübe edildi. PCR sonucu elde edilen ürün, bekletilmeden agaroz jelde yürütülerek, KanMX4 modülüne ait bant gözlemlendi.

3.8. RNA İZOLASYONU

RNA izolasyonu için cam boncuk ile mekanik parçalama yöntemi ve “Roche High Pure RNA Isolation Kit” ticari kiti kullanıldı.

Tablo 3.5: RNA İzolasyonunda kullanılan cihaz ve malzemeler.

Cihaz ve malzemeler	Miktar
“Sartorius Mikro Dismembrator” hücre parçalayıcı	
“Roche High Pure RNA Isolation Kit” ticari kiti	
Soğutmalı santrifüj	
Masaüstü santrifüj	
Cam boncuk	3 g
PBS tamponu	200 μ L

RNA izolasyonu yapılacak *S. pombe* ırkları YEA besiyerinde 30 °C sıcaklıkta 2 gün üremeye bırakıldı; elde edilen taze stok steril su ile mikrosantrifüj tüpe aktarılıp süspanse edildi; süspanasyonun hücre konsantrasyonu mikroskopta hücre sayımı ile hesaplandı; hücre konsantrasyonu 10⁶ hücre/mL olacak şekilde YEL besiyerine ekim yapıldı; hücreler YEL besiyerinde, 30 °C’de çalkalamalı etüvde 12 saat üremeye bırakıldı.

YEL besiyerinde üreyen hücreler 7000 g’de 5dk santrifüj edilerek çökertilip besiyerinden ayrıldı; çökelti steril su ile yıkanıp tekrar santrifüj ile çökertildi. Hücreler YEL %3 glukoz (kontrol grubu) ve YEL %3 gliserol + %0.1 glukoz (deney grubu) besiyerlerine aktarılıp 4 saat boyunca 30 °C’de çalkalamalı etüvde üremeye bırakıldı.

YEL %3 glukoz ve YEL %3 gliserol + %0.1 glukoz besiyerlerinde 4 saat üreyen hücrelerin sayımı yapıp konsantrasyonu belirlendi, 5 dk 7000 g'de soğutmalı santrifüj kullanılarak çökertildi; çökelti steril su ile yıkanıp tekrar santrifüj ile çökertildi.

Hücre parçalama: Yaklaşık 10^8 hücre için Pellete 200 μ L PBS eklenip steril mikrosantrifüj tüpe aktarıldı. Toplam 0.5 mL olacak şekilde veya 0.3 g cam boncuk eklendi. Çalışma boyunca buzda bekletilen örnekler, 5 defa 30 saniye 3000 rpm'de hücre parçalayıcısı kullanılarak hücre membranlarının parçalanması sağlandı. Mikrosantrifüj tüp kızgın iğne ile delinip sıvı faz yeni bir steril mikrosantrifüj tüpe aktarıldı. Mikrosantrifüj tüp 5 dk 7000 g'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Süpernatant steril mikrosantrifüj tüp aktarıldı.

RNA izolasyon kiti: Bu aşamada kullanılan malzemeler ve prosedür ticari kite aittir, ancak bazı adımları tarafımızdan değiştirildi. Çalışmalar oda sıcaklığında yapılmıştır. Süpernatantın aktarıldığı mikrosantrifüj tüpe 400 μ L "Lysis/-Binding Buffer" eklendi örnek 15 saniye elde karıştırıldı. Kite bulunan bir "High Pure Filter" tüp başka bir "Collection" tüpün içine koyuldu. Örnek maksimum 700 μ L olacak şekilde "High Pure Filter" tüpe pipet ile aktarıldı. Tüpler masaüstü santrifüjde 1 dk 8000 g'de santrifüj edildi. "Collection" tüpe geçen sıvı kısım döküldü ve tüpler tekrar birleştirildi. Steril bir mikrosantrifüj tüpe 90 μ L "DNase Incubation Buffer" ve 40 μ L DNaz eklenip karıştırıldı; DNaz karışımı "High Pure Filter" tüpüne pipet ile bırakıldı; 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. "High Pure Filter" tüpüne 500 μ L "Wash Buffer I" eklendi; tüpler 1 dk 8000 g'de santrifüj edildi; "Collection" tüpe geçen sıvı kısım döküldü, tüpler tekrar birleştirildi. "High Pure Filter" tüpüne 500 μ L "Wash Buffer II" eklendi; tüpler 1 dk 8000 g'de santrifüj edildi; "Collection" tüpe geçen sıvı kısım döküldü, tüpler tekrar birleştirildi. "High Pure Filter" tüpüne tekrar 200 μ L "Wash Buffer II" eklendi; tüpler 1 dk 13000 g'de santrifüj edildi; "Collection" tüpe geçen sıvı kısım döküldü, "Collection" tüp atıldı; "High Pure Filter" tüp steril bir mikrosantrifüj tüpün içine koyuldu; "High Pure Filter" tüpe 100 μ L "Elution Buffer" pipet ile bırakıldı; tüpler 1 dk 8000 g'de santrifüj edildi. Mikrosantrifüj tüpe geçen sıvı total RNA içermektedir.

3.9. RNA MİKTAR TAYİNİ

Örneklerin RNA konsantrasyonlarını belirlemek ve saflıklarını tespit etmek üzere “Thermo Scientific Nanodrop 2000c” UV-Vis spektrofometre kullanıldı. Her RNA ölçümü öncesi, örneklerin koyulduğu alt ölçüm ayağı “Elution Buffer” ile temizlendi. Referans solüsyon olarak 1.5 µL “Elution Buffer” okutuldu; daha sonra örnekler 1.5 µL miktarda okutuldu.

3.10. RNA'NIN AGAROZ JELDE YÜRÜTÜLMESİ

RNA izolasyonun başarılı olduğunu total RNA'nın yaklaşık %85'ini oluşturan büyük ve küçük ribozomal RNA alt birimlerini gözlemleyerek anlayabiliriz. Bunun için örnekler 40 mL %1'lik agaroz jelde yürütüldü.

Tablo 3.6: Agaroz jelin hazırlanmasında ve görüntülenmesinde kullanılan cihaz ve malzemeler.

Cihaz ve malzemeler
Mikrodalga fırın
UV jel görüntüleme sistemi
Elektroforez
TAE tamponu
EtBr (“Ethidium Bromide”)
Bromfenol mavisi
1 kb “DNA Ladder”

0.4 g agaroz ve 40 mL TAE erlene koyuldu; mikrodalgada kaynatılıp çözülmesi sağlandı, agaroz tamamen çözüldükten sonra soğumaya bırakıldı. Yaklaşık 50 °C sıcaklığa geldiğinde 2 µL EtBr eklendi ve iyice karıştırıldı. Elektroforez kasetine tarak yerleştirildi; karışım elektroforez kasetine döküldü ve oda sıcaklığında polimerize olması için yaklaşık 15 dk beklendi. Jel katılınca tarak söküldü; elektroforez kaseti jel ile beraber elektroforez tankına yerleştirildi; jelin üzerini örtecek seviyeye gelene dek elektroforez tankına TAE tamponu döküldü. Her bir örnek için 2 µL bromfenol mavisi ve 10 µL örnek bir parafilm üzerinde pipetaj ile karıştırılıp jeldeki kuyulara bırakıldı;

bir kuyuya 2 μ L 1 kb'lik "DNA Ladder" marker olarak bırakıldı. Elektroforez cihazı 70 V'da 15 dakika çalıştırıldı; jel görüntüleme cihazında görüntülendi.

3.11. TERS TRANSKRİPTAZ İLE RNA'DAN CDNA ELDE EDİLMESİ

DNA RNA'dan daha kararlı bir molekül olduğu için, örnekler saklanmadan önce "Qiagen QuantiTect Reverse Transcription Kit" ticari kiti kullanılarak cDNA'ya çevrildi.

Tablo 3.7: RNA'dan cDNA eldesi için kullanılan cihaz ve malzemeler.

Cihaz ve malzemeler
"Biorad T100 Thermal Cycler" pcr cihazı
"Qiagen QuantiTect Reverse Transcription Kit"

Kullanılan ticari kitin önerdiği protokole göre örnekler 1000 ng RNA içerecek miktarda kullanıldı. Çalışmalar buz üzerinde yapıldı. Genomik DNA eliminasyonu için steril pcr tüpüne 2 μ L "gDNA Wipeout Buffer 7x" ve 1 μ g RNA içerecek hacimde örnek eklendi. Son hacim 14 μ L olacak şekilde "RNase free" su eklendi. Pcr tüpleri 42 °C'de 2 dk PCR cihazında inkübe edildi; hemen sonra tekrar buza koyuldu. Ters transkripsiyon için steril PCR tüpüne 1 μ L "Quantiscript Reverse Transcriptase", 4 μ L "Quantiscript RT Buffer 5x" ve 1 μ L "RT Primer Mix" eklendi; bir önceki adımda elde edilen genomik DNA eliminasyonu yapılmış, kalıp RNA'ları içeren 14 μ L karışım eklendi. Son hacim 20 μ L olan PCR tüpü, PCR cihazında 42 °C'de 15 dk inkübe edildi. Son olarak ters transkriptazın inaktivasyonu için 95 °C'de 3 dk inkübe edildi. Elde edilen cDNA örnekleri -20 °C'de saklandı.

3.12. GERÇEK ZAMANLI PCR (RT-PCR)

Gerçek zamanlı PCR için "Roche FastStart Essential DNA Green Master" ticari kiti kullanıldı. Tüm örnekler için referans gen olarak *GPD3* ("glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase") kullanıldı.

Anlatımları incelenmek istenen *GHT1*, *GHT2*, *GHT3*, *GHT4*, *GHT5*, *GHT6* ve *GHT8* hedef genleri; *FBP1* ve *HXX2* kontrol genleri; ve *GPD3* referans geninin primer dizileri ve Tm değerleri için önceki çalışmalardan (Kına, 2016) yararlanıldı.

Tablo 3.8: Gerçek zamanlı PCR için kullanılan cihaz ve malzemeler.

Cihaz ve malzemeler
“Roche Light Cycler 480 Instrument II” PCR cihazı
“Roche FastStart Essential DNA Green Master” gerçek zamanlı PCR kiti

Tablo 3.9: Gerçek zamanlı PCR programı

Açıklama	Sıcaklık	Süre
Başlangıç denatürasyonu	98 °C	30 sn
35-40 döngü	98 °C	10 sn
	55-60 °C	30 sn
	72 °C	1 dk
Bitiş primer uzaması	72 °C	5 dk
Saklama	4 °C	

Örnekler 20X sulandırılarak 1 ng/ μ L cDNA konsantrasyonuna getirildi. Çalışılacak her gen için kuyu başına 10 μ L “SYBR green master mix”, 1 μ L sol primer, 1 μ L sağ primer, 3 μ L “Water PCR grade” su olmak üzere steril tüpte karışım oluşturuldu. Karışımdan “plate“ kuyucuklarına son hacim 20 μ L olmak üzere 15 μ L karışım ve üzerine 5 μ L (5 ng) cDNA örneği eklendi; Negatif kontrol amacıyla kullanılan kuyulara, cDNA örneği yerine 5 μ L “Water PCR grade” su eklendi. “Plate” şeffaf folyo ile kapatılıp 30 sn 1500 g’de santrifüj edildi. PCR işlemi yukarıdaki programa göre “Roche Light Cycler 480 Instrument II” cihazında gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada kontrol grubu olarak kullanılan ve *S. pombe* SP292 ve deney grubu olarak kullanılan *S. pombe* ΔSPCC320.03 ırklarının, yüksek glukoz içeren “YEL %3 glukoz” ve glukozsuz “YEL %3 gliserol + %0.1 glukoz” besiyerlerinde, heksoz transporter genlerinin anlatımları incelendi. Bunun için her iki ırk, önce yüksek glukoz içeren besiyerinde üretildi. Daha sonra üreyen hücrelerden yarısı glukozsuz besiyerine taşınırken, diğer yarısı yüksek glukoz içeren taze besiyerine aktarıldı. İki farklı ırk ve iki farklı besiyerinden oluşan örneklerin gen anlatım profilleri incelenmek üzere, sırasıyla RNA izolasyonu, ters transkriptaz ile cDNA sentezi ve relatif gerçek zamanlı PCR çalışmaları yapıldı.

4.1. BİYOİNFORMATİK ANALİZLER

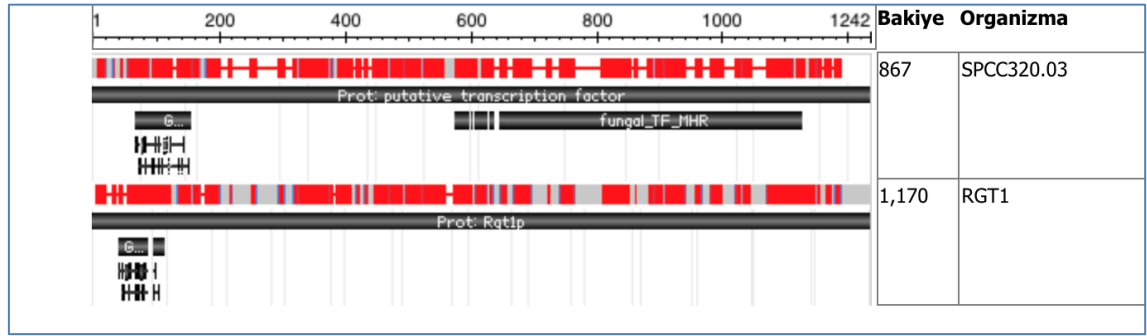
S. cerevisiae RGT1 ve *S. pombe* SPCC320.03 üzerinde yapılan biyoinformatik çalışmalar ile, bu iki genin dizi benzerliği yanında, fonksiyonel ortolog olabileceklerine dair bulgular elde edildi.

4.1.1. RGT1 ve SPCC320.03'ün BLAST Analizi

S. cerevisiae RGT1 ve *S. pombe* SPCC320.03 amino asit dizileri oldukça korunmuştur. SPCC320.03 proteini 867, RGT1 proteini 1170 amino asit bakiyesi barındırır. Şekil 4.1 ve 4.2'de iki proteinin amino asit dizilerinin BLAST analizi gösterildi. BLAST analizinde RGT1'in DNA bağlayan domeni (46-76 amino asitleri) dahil protein dizilerinin oldukça korunmuş olduğu saptandı.

1	MDLNTLPFHSINSVNVSSAPTVERNERSYPFLLLDASAGVSGFNPVVSSEPKKARMKYKKNSTSPNMDVKSRRKVSACDFCR	80
1	-----MNELNTVSTNSSDSTK-----NGGTS-----NSPDDM-----DSAAAASHAIKKRTKASRACDQCR	51
81	QKKIRCDMDQSPRPGNACINCRKHHLDNCFTRTPLKRGPAKGFNRNA-----DEKQKRASGSAKSSSPAVNGSVF-	150
52	KKKIKCDYKDEK--GVCNQCQRNGDRCSFDRVPLKRGPSKGYTRSTSHPRTNEIQDHNNRSRYNTFDNSNNTLNNNTGN	128
151	SGNEASPSRRAPSITPVDSVNTTTSIAIQVPSVTLTAPAPLGVDQK-----ISQDQ-----	200
129	SGDNGINSNTVPS-TP-----SRNSVLLPPLTYIYIPQAGGIPPSFQNPATQSTMPAGNIGQQQFWKVPYHEFHQRKGS	202
201	-----KPDSWLTYNA-----QFAQNSPQLAP-----	221
203	IDSLSQSDISVRTLNPNEQLSYNTVQQSPIITNKHTNDSGNANGSVTSGSASGSGGYWFSFIRTSGLLAPTDHNGEQTRRS	282
222	-SIPSPMKLSPANQQAMPYPQMLGPGSISSTYNSNLGSPAGFRPPTFFSSPSPQPYSGPILASTAPTLDGSYLSNPSNS	300
283	SSIPSLLR-NTSNLLGGQPQLPPPQQSQPQAHQKQLQQGNLYSYSQFSQQPYN-PSISSF-----GQFAANGFHS	355
301	NPAVMSLSSNFSPPK-----PNNPVYLP-----PRGNPTV-----NDRVSNVLPISITFDSSVTTVPSNSPATLNS	362
356	RQGSVASEAMSPSAPAMFTSTSTNPVNVAQQTQRPPQQQVQFSSSELDGNKRRQSAPVSVTLSTRDLNNGENNN-GEINN	434
363	YTTSPVSGMSRHPMLNPS--TPEPSLGVNSPLRPLQSLNNVQNSYRVASTQAPPPHPLRNYTSDAESISMRSKSTQAS	440
435	NNGSNNSGSSKDTSQHSQESVTPPAALEASSPGSTPQRSTKRRKRSY-VSKKTKPKRDSISISITSKDSAHPMTTSTTIAY	513
441	DAATPREVEQLYQENVEWDDAAIDRYLLIHSTLPILHHSKARLKSEL---EKAPINLRSSCLHAIYSLVN---RPPFAT	514
514	GQIS-----DVDLIDTYEYEFIHVGFPIIPLNKTTLSDDLVLVNTQPI---SNIHEVNSYVILWFRNSLEL	575
515	L-----GHVFHNTPMKAI-----GLLNLCISNVQDLSNRILHLQTMILLAIES-----	557
576	LVRVALKQKPGKFFDNIVGVALSPSNDNNKAGFTTATARDDAEKTRRDSHNEVDTLLEVQSVFIAALNECFQKIVDIHP	655
558	-----DQRGPTT-----ITGRNGLPQGMWLGAAIGLACNMRL-----	589
656	KFRENDQISPKIKVIYLSSTFILLNYILAFVGYDNSFVLGMSVTIFNEFKLYKLLFPDPDINDVKPPVDEEVSTGNGNT	735
590	-----HIQSHLSLQSIONEDMSDEALCRRAWVLVLDLRWHSMTCSPLFL-----PETF-----	639
736	KTSEFEIGSESAGHMNPSNSPNSMDENISHYSVLFKRLYVLLSVFDSLQSCAFGGPKLLNISIQGSTERFFSNDLGSKWC	815
640	-----INLTIQDQKLLGTFPSQLVRLSLIV-GHISDVFQSPDPTDRQSPIVTQQLRSEIDAFRQSV-----	699
816	LEQSQLRLKSVLQSLKL-GELMSELTRNRISMNGNRKPGFDITNSSSLLSEYVETQPLSVAQLFCLLIGKHNFINCLLS	894
700	--DVVWGMNLLTL-----AVTHVKVLELCLINARPSTVL-----VPAMKMATILSS-S	745
895	LYDSEAGVYSDLTLDLSSKIADSLCSLISIIQLVTLILRLNPTNSIDFNYPNPPANNPTVQEGPSAMGSSPVAGNLS	974
746	STPMTPLNHFFS-----LATCVLIGVFDLPELQNEARRGLEHIRECIEKRRDIVSREDHED	802
975	AAPPSEGNPDFYKLLGLKQDTGTILSDLCRGIISPFAAILHEVYNITELVKQMPTSLISIMMTATTTQNTQDTKKSQD	1054
803	WDYIVLKLINAKMQGMPINSDPSPHPVPPSSAFAYS-NQEMDS-----ATFKDAYLYTR---LCNLGYLGFLI----	867
1055	---LVMKLSNSMNEVVQITS---VLTMIKPFKIFEHELNKPIMSLTGGLSSTTRNDVMWPKSGQGLRESSVMKTLLEDERR	1128
1129	-----	
1129	TSGTQPTTAPVAAEEPRELLENVALENFVSIQWKLDDSELGWY	1170

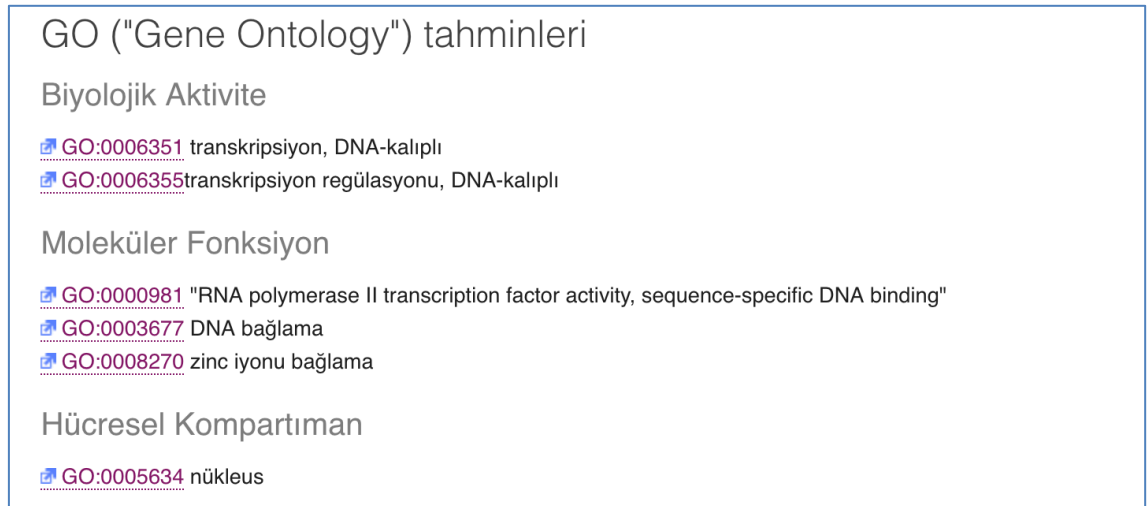
Şekil 4.1: *S. pombe* SPCC320.03 ve *S. cerevisiae* RGT1 protein dizileri BLAST analizi: SPCC320.03 (867 bakiye) üstteki, RGT1 (1170 bakiye) alttaki dizidir.



Şekil 4.2: *S. pombe* SPCC320.03 ve *S. cerevisiae* RGT1 protein dizileri BLAST analizi: kırmızı bölgeler homoloji gösteren, gri bölgeler karşılık gelmeyen bölgeleri göstermektedir.

4.1.2. SPCC320.03 GO (“Gene Ontology”) Tahminleri

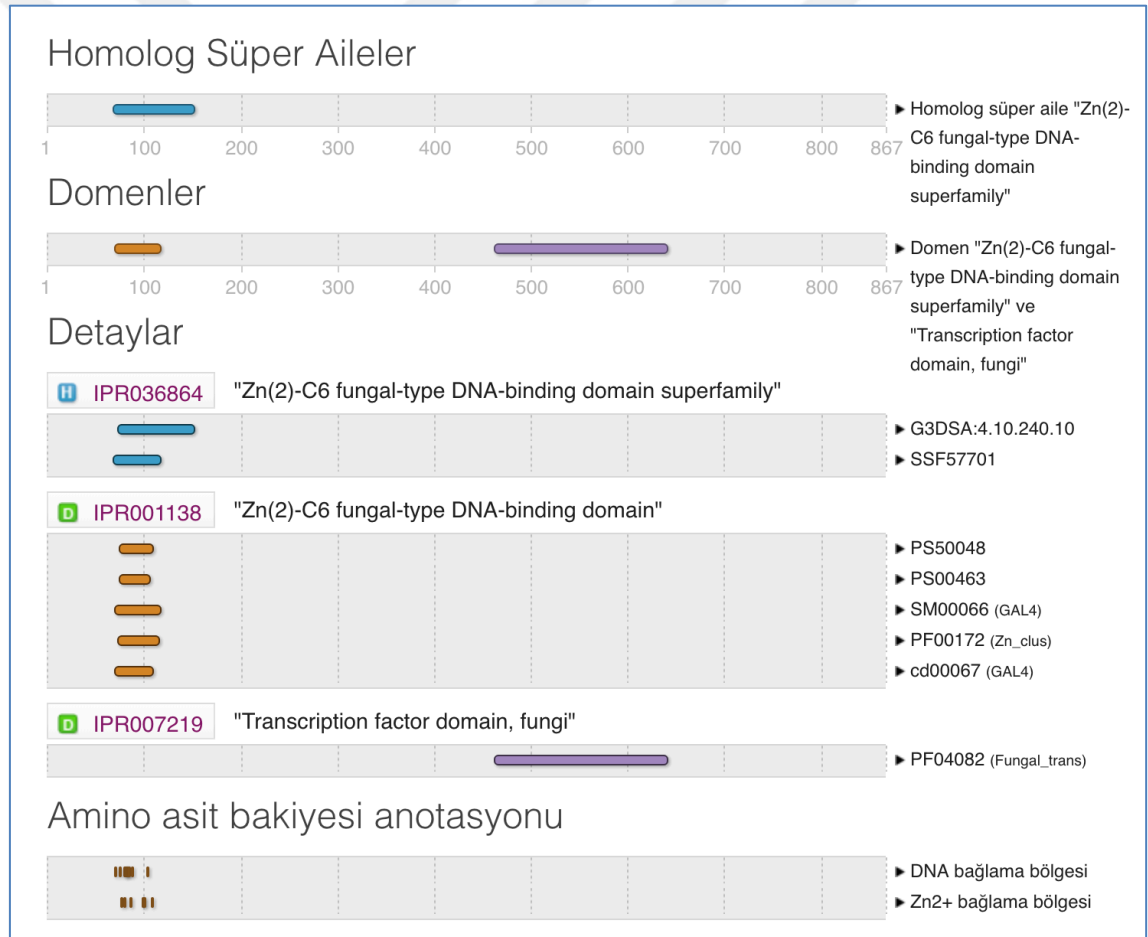
Biyolojik aktivite, moleküler fonksiyon ve hücrel kompartıman tahminleri UniProtKB’de yapıldı. Şekil 4.3’de gösterilen *S. pombe* SPCC320.03 protein dizisinin UniProtKB GO (“Gene Ontology”) analizinde de SPCC320.03’ün transkripsiyon faktörü olduğuna dair bulgular elde edildi. SPCC320.03 biyolojik aktivite tahmini: transkripsiyon, transkripsiyon regülasyonu; moleküler fonksiyon tahmini: RNA polimeraz II transkripsiyon faktörü aktivitesi, DNA bağlama aktivitesi, diziyeye özgü DNA bağlama aktivitesi, çinko (Zn) iyonu bağlama aktivitesi; hücrel kompartıman tahmini: nükleus.



Şekil 4.3: *S. pombe* SPCC320.03 UniProtKB GO (“Gene Ontology”) tahminleri (“<https://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/O59780>”)

4.1.3. SPCC320.03 Protein Dizisi Domen Tahminleri

Şekil 4.4’de gösterilen *S. pombe* SPCC320.03 amino asit dizisi UniProtKB domen tahmini analizi de SPCC320.03’ün transkripsiyon faktörü olduğuna dair bulguları destekledi. Analiz sonucunda SPCC320.03 proteinin sahip olabileceği tahmin edilen domenler ve diğer anotasyonlar Şekil 4.4’de gösterildiği üzere, "Zn(2) C6 fungal-type DNA-binding domain superfamily" homolog süper ailesi; "Zn(2) C6 fungal-type DNA-binding domain superfamily" ve "Fungal transcription factor" domeni; DNA bağlama bölgesi, Zn²⁺ bağlama bölgesi amino asit bakiyesi anotasyonu.



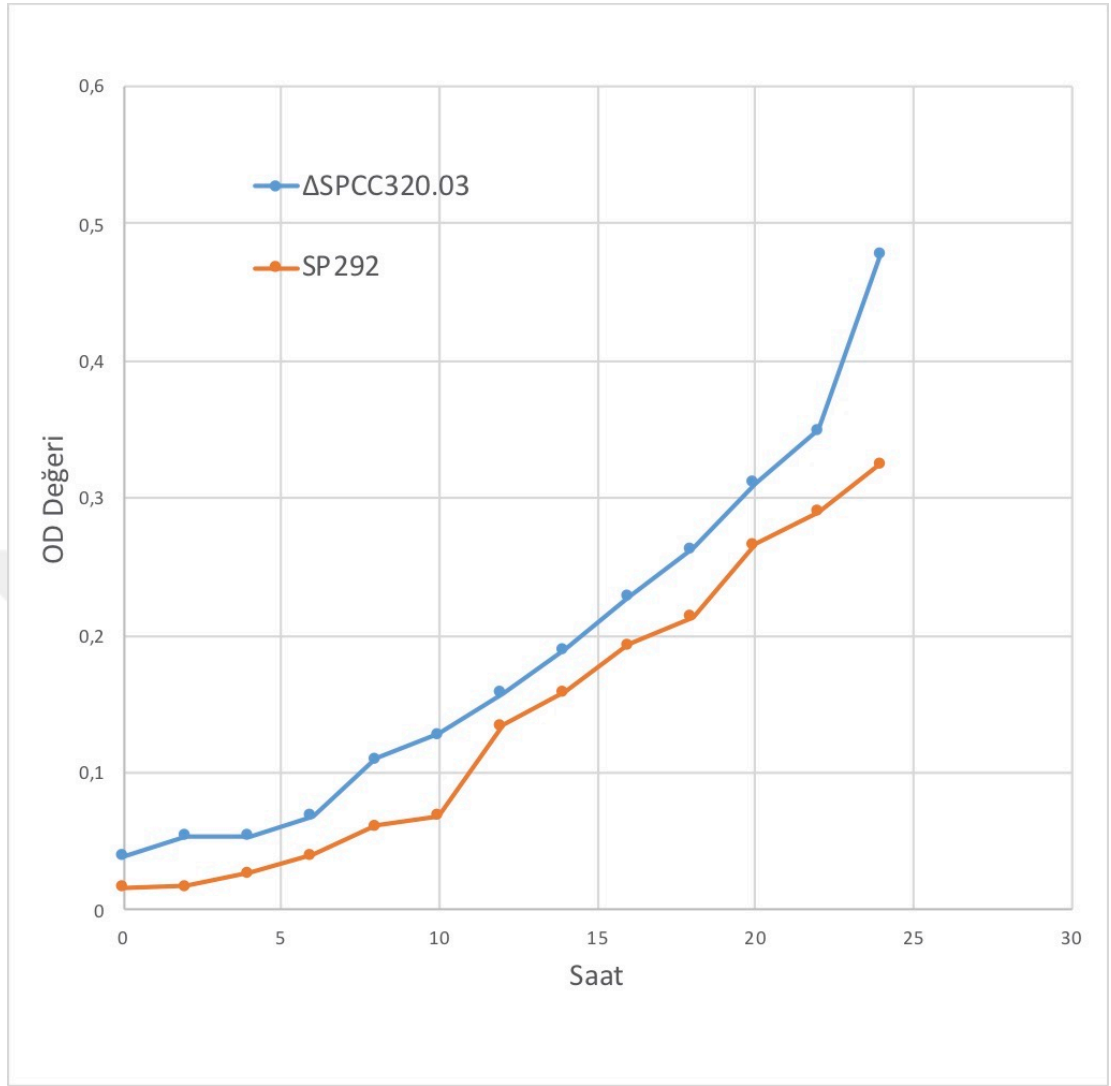
Şekil 4.4: *S. pombe* SPCC320.03 amino asit dizisi UniProtKB domen tahminleri ("https://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/O59780")

4.2. ÜREME EĞRİSİNİN ÇIKARILMASI

Üreme eğrileri çıkarılan *S. pombe* ırkları, kullanılan besiyerleri ve üreme süreleri Tablo 4.1’de verildi; besiyerinde üreyen hücrelerin spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçülen optik yoğunluk grafikleri Şekil 4.5’de görülmektedir. Ölçülen değerlere göre 24 saat sonunda her iki ırk da logaritmik üreme fazını devam ettirmektedirler. Her iki ırk için logaritmik fazın ortası 16 saat olarak saptandı.

Tablo 4.1: Üreme eğrisi çıkarılan *S. pombe* ırkları ve üretildikleri besiyerleri.

İrk	Besiyeri	Üreme süresi
<i>S. pombe</i> ΔSPCC320.03	YEL %3 glukoz	24 saat
<i>S. pombe</i> SP292	YEL %3 glukoz	24 saat



Şekil 4.5: *S. pombe* ΔSPCC320.03 ve SP292 ırklarına ait üreme grafiği: x-ekseni saat, y-ekseni ise OD değerlerini göstermektedir.

4.3. RNA İZOLASYONU

RNA izolasyonu için üretilen *S. pombe* ırkları, kullanılan besiyerleri ve üreme süreleri Tablo 4.2’de ve Tablo 4.3’de verildi: İlk 12 saat Tablo 4.2’deki gibi, %3 glukoz içeren YEL besiyerinde üretilen hücreler, daha sonra Tablo 4.3’deki besiyerlerine taşındılar.

Tablo 4.2: RNA izolasyonu yapılan *S. pombe* ırkları ve üretildikleri besiyerleri (0-12 saat).

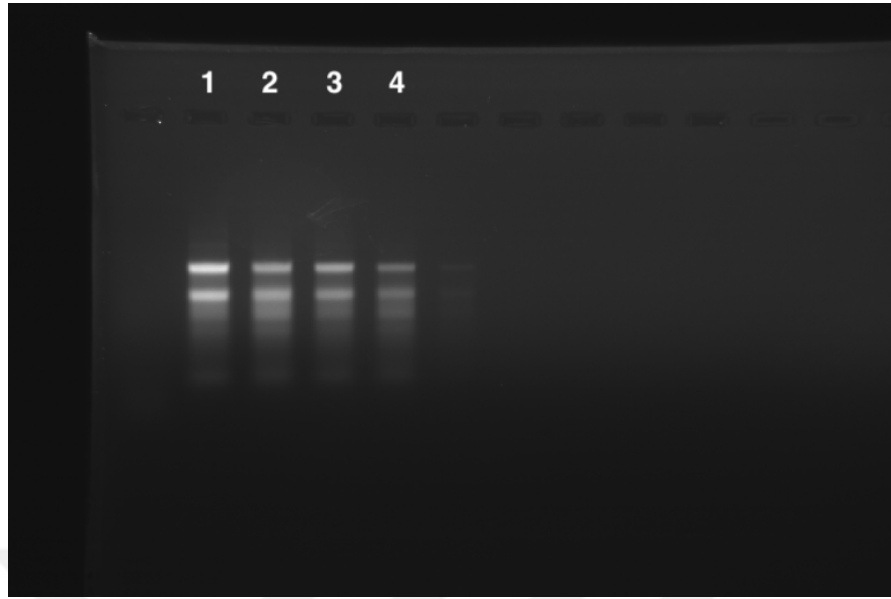
İrk	Besiyeri	Üreme süresi
<i>S. pombe</i> ΔSPCC320.03	YEL %3 glukoz	12 saat
<i>S. pombe</i> SP292	YEL %3 glukoz	12 saat

Tablo 4.3: RNA izolasyonu yapılan *S. pombe* ırkları ve üretildikleri besiyerleri (12-16 saat).

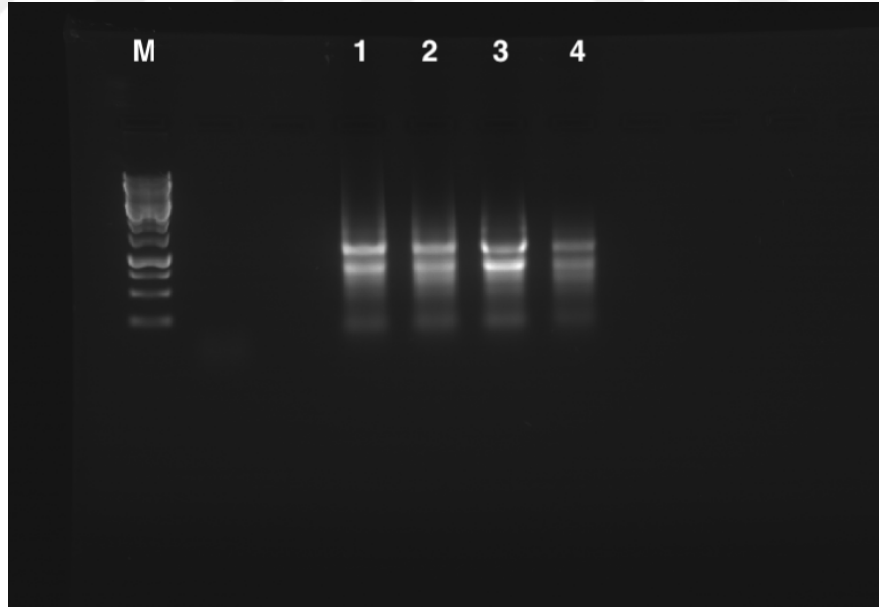
İrk	Besiyeri	Üreme süresi
<i>S. pombe</i> ΔSPCC320.03	YEL %3 glukoz	4 saat
<i>S. pombe</i> ΔSPCC320.03	YEL %3 gliserol + %0.1 glukoz	4 saat
<i>S. pombe</i> SP292	YEL %3 glukoz	4 saat
<i>S. pombe</i> SP292	YEL %3 gliserol + %0.1 glukoz	4 saat

12-16 saat aralığında Tablo 4.3'deki besiyerlerinde üretilen *S. pombe* hücrelerinden, 2 örnek yüksek konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinden (YEL %3 glukoz), 2 örnek glukozsuz besiyerinden (YEL %3 gliserol + %0.1 glukoz) olmak üzere toplam 4 örnek elde edildi.

Üretilen 4 örneğin RNA izolasyonu bölüm 3.8'de açıklandığı şekilde yapıldı. Elde edilen total RNA %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Örneklerin RNA içerdiğine ve RNA'nın yıkıma uğramadığına işaret eden büyük ve küçük ribozomal RNA alt birimlerin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 4.6 ve 4.7'de görülmektedir.



Şekil 4.6: %1'lik agaroz jelde yürütülen total RNA örnekleri: 1: *S. pombe* Δ SPCC320.03 (YEL %3 glukoz); 2: *S. pombe* Δ SPCC320.03 (YEL %3 gliserol + %0.1 glukoz); 3: *S. pombe* SP292 (YEL %3 glukoz); 4: *S. pombe* SP292 (YEL %3 gliserol + %0.1 glukoz)



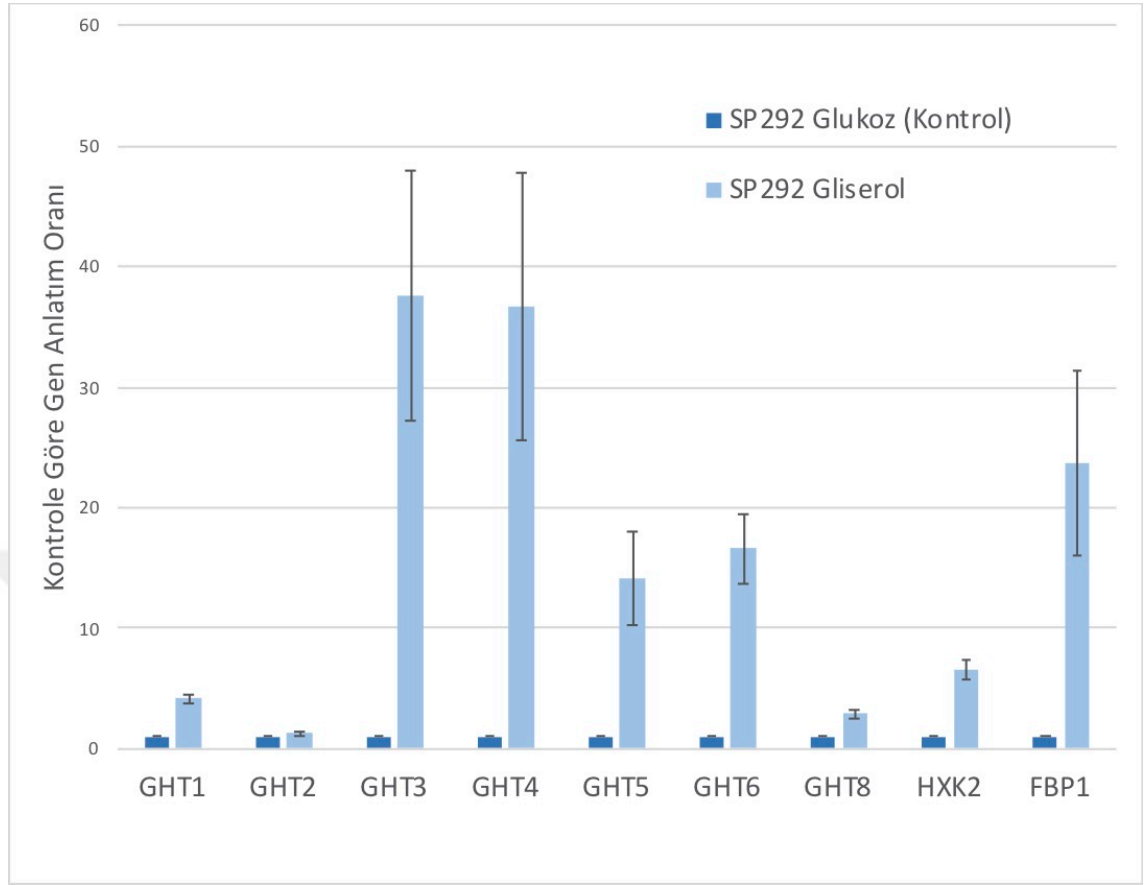
Şekil 4.7: %1'lik agaroz jelde yürütülen total RNA örnekleri: 1: *S. pombe* Δ SPCC320.03 (YEL %3 glukoz); 2: *S. pombe* Δ SPCC320.03 (YEL %3 gliserol + %0.1 glukoz); 3: *S. pombe* SP292 (YEL %3 glukoz); 4: *S. pombe* SP292 (YEL %3 gliserol + %0.1 glukoz); M: Marker (1 kb "DNA Ladder")

4.4. GERÇEK ZAMANLI PCR

SPCC320.03 tahmini transkripsiyon faktörünün anlatımlarını düzenlediği tahmin edilen *GHT1*, *GHT2*, *GHT3*, *GHT4*, *GHT5*, *GHT6* ve *GHT8* heksoz transporter genlerinin anlatım profilleri *S. pombe* SP292 ve Δ SPCC320.03 ırklarında gerçek zamanlı PCR yapıldı. Tablo 4.3'deki örneklerden elde edilen cDNA'lar ile gerçekleştirilen, gerçek zamanlı PCR sonuçları Şekil 4.8 - 4.12'de görülmektedir. Relatif gen anlatımı hesaplamaları $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre yapılmıştır.

Gerçek zamanlı PCR verisinin normalizasyonu için tüm örneklerde, *S. pombe* *GPD3* geni (gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) referans gen olarak kullanıldı. *GPD3* ökaryotlarda oldukça korunmuştur, "housekeeping" sınıfında kabul edilir.

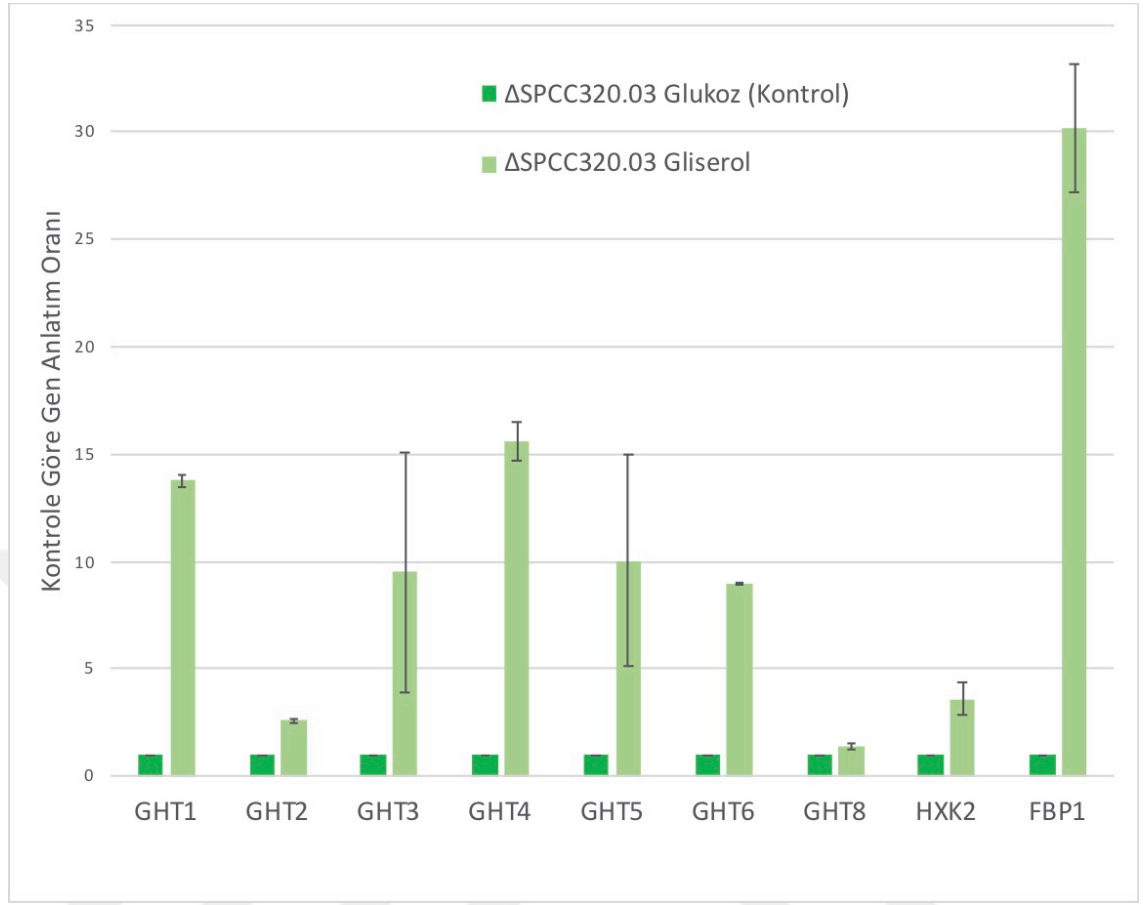
FBP1 ve *HXK2* genleri deneyin doğru yapıldığını anlamak üzere kontrol genleri olarak kullanıldı. *FBP1* (fruktoz-1,6-bifosfataz) ökaryotlarda korunmuş glukoneogenez regülatörü bir enzimdir. *S. pombe*'de *FBP1* anlatımı glukoz açlığında artar (Adachi ve diğ., 2018). *S. pombe* *HXK2* (heksokinaz), transporterler ile hücre içine alınan glukoz ve fruktozu fosforilleyerek glikolize yönlendirir. *HXK2* anlatımı glukoz varlığında azalır (Petit ve diğ., 1996).



Şekil 4.8: *S. pombe* SP292 ırkının yüksek glukoz ve glukozsuz besiyerinde heksoz transporter genlerinin relatif anlatımları.

Şekil 4.8’de kontrol ırkı SP292’nin iki farklı besiyerindeki gen anlatımlarının karşılaştırılması gösterilmektedir. Glukozsuz besiyerinde *GHT1* geni ortalama 4,18 kat artarken, *GHT2* 1,25 kat, *GHT3* 37,62 kat, *GHT4* 36,72 kat, *GHT5* 14,20 kat, *GHT6* 16,60 kat, *GHT8* 2,88 kat, *HXK2* 6,58 kat, *FBP1* ise 23,68 kat artmıştır.

Grafiğe göre *GHT2* geninin anlatımı iki farklı besiyerinde anlamlı bir değişiklik göstermemektedir. Glukozsuz besiyerinde *HXK2* ve *FBP1* kontrol genlerinin anlatımı beklendiği şekilde artmıştır.



Şekil 4.9: *S. pombe* Δ SPCC320.03 ırkının yüksek glukoz ve glukozsuz besiyerinde heksoz transporter genlerinin relatif anlatımları.

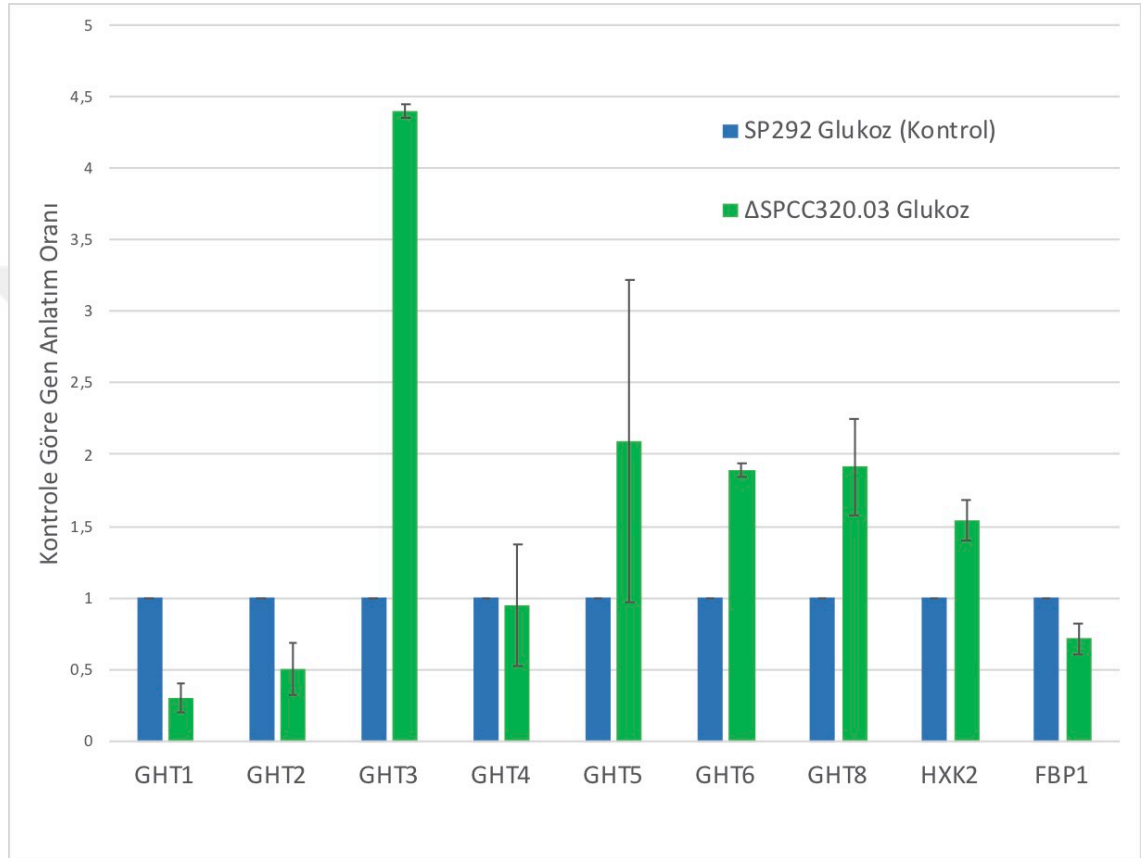
S. pombe Δ SPCC320.03 ırkının iki farklı besiyerinde gen anlatım profili Şekil 4.9'daki gibidir. Glukozsuz besiyerinde *GHT1* geni ortalama 13,74 kat artmıştır; *GHT2* 2,60 kat, *GHT3* 9,49 kat, *GHT4* 15,59 kat, *GHT5* 10,04 kat, *GHT6* 8,97 kat, *GHT8* 1,41 kat, *HXK2* 3,60 kat, *FBP1* ise 30,20 kat artmıştır.

Kontrol genleri *HXK2* ve *FBP1*'in anlatımları, SP292 suşunda olduğu gibi glukozsuz besiyerinde artmıştır. Δ SPCC320.03 ırkında *FBP1* ekspresyonundaki artış SP292'ye göre daha fazla olmuştur. *GHT1*'in anlatımında da benzer şekilde daha belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Glukozsuz besiyerinde, SP292 ırkında *GHT3* ve *GHT4* genlerinin anlatımları yaklaşık 35-40 kat artarken, Δ SPC320.03C ırkında artış yaklaşık 10-15 kat olmuştur.



Şekil 4.10: *S. pombe* Δ SPCC320.03 ve SP292 irklarının yüksek glukoz ve glukozsuz besiyerlerinde heksoz transporter genlerinin relatif anlatımları.

Şekil 4.10 tüm örnekleri bir arada göstermektedir. Kontrol olarak yüksek glukoz besiyerinde üreyen SP292 örneği kullanılmıştır. Her iki ırkta da, tüm genlerin anlatımının glukozsuz besiyerinde arttığı görülmektedir.



Şekil 4.11: *S. pombe* ΔSPCC320.03 ve SP292 ırklarının yüksek glukoz besiyerinde heksoz transporter genlerinin relatif anlatımları.

Şekil 4.11’de her iki ırkın yüksek glukoz besiyerindeki gen anlatımları karşılaştırılmıştır. Kontrol olarak SP292 kullanılmıştır. ΔSPCC320.03 ırkında *GHT1* geninin anlatımı 3,30 kat daha az olmuştur; *GHT2* ise 1,98 kat, *GHT4* 1,05 kat, *FBP1* 1,40 kat daha düşük eksprese edilmiştir; ΔSPCC320.03 ırkında anlatımları daha yüksek olan genlerden *GHT3* 4,39 kat, *GHT5* 2,10 kat, *GHT6* 1,89 kat, *GHT8* 1,92 kat, *HXK2* ise 1,54 kat daha yüksek eksprese edilmiştir.

ΔSPCC320.03 *GHT1* ve *GHT2* genleri, SP292 ile karşılaştırıldığında düşük anlatım gösterdikleri ve *GHT3*’ün anlatımında belirgin bir artış görülmektedir.



Şekil 4.12: *S. pombe* ΔSPCC320.03 ve SP292 ırklarının glukozsuz besiyerinde heksoz transporter genlerinin relatif anlatımları.

Şekil 4.12 ise her iki ırkın glukozsuz besiyerindeki anlatımlarını karşılaştırmaktadır. *GHT4* dışında anlamlı bir değişim görülmemektedir. Glukozsuz besiyerinde *S. pombe* ΔSPCC320.03 ırkının SP292 ırkına göre *GHT4* geninin ekspresyonunda ortalama 2,85 kat düşme görülmüştür.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Schizosaccharomyces pombe, diğer adıyla fizyon mayası *S. cerevisiae*'dan sonra en çok çalışılan mayadır. Metazolar ile daha çok homoloji göstermesi (Wood ve diğ., 2002) sebebi ile DNA onarımı, DNA replikasyonu çalışmalarında önemli bir model organizma olmuştur. Diğer fizyon mayaları *S. octosporus*, *S. cryophilus* ve *S. japonicas*'ın genomları yakın zamanda dizilenmiş ve *S. pombe* ile çok yüksek düzeyde homoloji gösterdikleri anlaşılmıştır (Rhind ve diğ., 2011).

Saccharomyces cerevisiae, genomu dizilenen ilk ökaryottur (Goffeau ve diğ., 1996), yüksek glukoz ortamında etanol fermantasyonu yapar (Diaz-Ruiz ve diğ., 2009). *S. cerevisiae*, ürediği ortamdaki değişken glukoz konsantrasyonlarına en verimli cevabı verir: yüksek glukoz konsantrasyonunda düşük afiniteli glukoz transporterlerin anlatımı yapılır; glukoz tükenmeye başladığında ise düşük afiniteli glukoz transporterlerin anlatımı baskılanır, yüksek afiniteli glukoz transporterlerin anlatımı yapılır.

Pişkur ve arkadaşları mayalarda aerobik fermentasyona olanak sağlayan ortamın yaklaşık 125 my önce bitkilerde meyvenin evrimi ile ortaya çıktığını söylemişlerdir (Pişkur ve diğ., 2006). Mayalarda görülen aerobik fermentasyon, diğer adıyla Crabtree etkisi (Lagunas, 1979), Warburg etkisi gösteren kanser hücrelerine benzerlik gösterir. Yüksek glikoliz aktivitesi gösteren kanser hücreleri, normalden daha fazla miktarda glukoz tüketirler. Glikolizden elde edilen enerji düşük olsa da, elde edilen yan ürünler biyokütle oluşturma ve hızlı bölünme için gereklidir.

Bu çalışmada *S. pombe* glukoz transporter genlerinin düzenlenmesini açıklığa kavuşturmak amacıyla glukoz sinyali, glukoz transportu ve glukoz metabolizması en çok çalışılan model organizmalardan olan *S. cerevisiae*'dan yararlanılmıştır.

S. cerevisiae RGT1 transkripsiyon faktörü, glukoz transport edebilen heksoz transporter genlerinin (*HXT*) anlatımını glukoz varlığına bağlı olarak düzenler. Glukoz yokken, MTH1 RGT1 ile kompleks oluşturur; RGT1-MTH1 kompleksi DNA'da *HXT* genlerinin düzenleyici bölgelerine bağlanır; genel korepresör kompleksi SSN6-TUP1 DNA'ya bağlı

RGT1'e bağlanır ve *HXT* genlerinin anlatımı baskılanır. Glukoz varlığında MTH1 degrade edilir; MTH1 RGT1'e bağlı değilken PKA RGT1'i fosforlar ve bu hem SSN6-TUP1'in RGT1'e bağlanmasını engeller, hem de RGT1'in DNA'dan kopmasını sağlar; *HXT* genleri dereprese edilmiş olurlar.

S. cerevisiae RGT1 ve *S. pombe* ortoloğu SPCC320.03 tahmini transkripsiyon faktörü üzerinde yapılan biyoinformatik çalışmalar ile, bu iki genin dizi benzerliği yanında, fonksiyonel ortolog olabileceklerine dair bulgular elde edildi. Önce RGT1 ile *S. pombe* SPCC320.03 proteinlerinin BLAST analizi yapıldı. RGT1'in DNA bağlayan domeni (46-76 amino asitleri) dahil protein dizisinin tamamının SPCC320.03'de oldukça korunmuş olduğu saptandı. SPCC320.03 proteininin GO ("Gene Ontology") anotasyonu ve domen tahmini analizinde SPCC320.03'ün transkripsiyon faktörü olduğuna dair bulgular desteklendi.

Elde edilen biyoinformatik bulguları desteklemek üzere SPCC320.03'ün, *S. pombe* heksoz transporter genleri (*GHT*) üzerindeki etkisi, gerçek zamanlı PCR ile incelendi. *S. pombe* SP292 ırkında, glukoz açlığında *GHT3*, *GHT4*, *GHT5* ve *GHT6* genlerinin anlatımları artarken; *GHT1*, *GHT2* ve *GHT8* genlerinde belirgin bir değişim gözlemlenmedi. *S. pombe* Δ SPCC320.03 ırkında ise, glukoz yokluğunda *GHT1* geninin anlatımında belirgin bir artış gözlemlendi; *GHT3*, *GHT4*, *GHT5* ve *GHT6* genlerinin ekspresyonundaki artış oransal olarak SP292'ye göre daha düşük olduğu gözlemlendi.

S. cerevisiae'da *RGT1* delesyonu *HXT1* ekspresyonunun glukoz ile indüklenmesinde düşüşe, diğer *HXT* genlerinin ise devamlı ekspresyonuna sebep olur. *S. pombe* SPCC320.03 geninin delesyonu, glukoz yokluğunda *GHT1* ve *GHT2* genlerinin derepresyonunda artışa, *GHT3* ve *GHT4* genlerinin derepresyonunda ise azalmaya sebep olduğu gösterildi. *S. pombe* SPCC320.03'ün *S. cerevisiae* RGT1'in fonksiyonel ortoloğu olduğu ve *GHT1*, *GHT2*, *GHT3* ve *GHT4* heksoz transporter genlerinin anlatımlarını glukoz varlığına bağlı olarak düzenlediği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

- Adachi, A., Senmatsu, S., Asada, R., Abe, T., Hoffman, C.S., Ohta, K., Hirota, K., 2018, Interplay between chromatin modulators and histone acetylation regulates the formation of accessible chromatin in the upstream regulatory region of fission yeast *FBP1*, *Genes & Genetic Systems*, 92(6), 267–276.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E., W., Lipman, D.J., 1990, Basic local alignment search tool, *J Mol Biol.* 215(3):403-10.
- Amodeo, G., A., Rudolph, M.J., Tong, L., 2007, Crystal structure of the heterotrimer core of *Saccharomyces cerevisiae* AMPK homologue SNF1, *Nature*, 449(7161), 492–495.
- Argos, P., Kamer, G., Nicklin, M.J.H. ve Wimmer, E., 1984, Similarity in gene organization and homology between proteins of animal picomaviruses and a plant comovirus suggest common ancestry of these virus families, *Nucleic Acids Res.* 12, 7251–7267.
- Barker, M.G. ve Walmsley, R.M., 1999, Replicative ageing in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Yeast* 15, 1511–1518.
- Boles, E., Hollenberg, C.P., 1997, The molecular genetics of hexose transport in yeasts, *FEMS Microbiology Reviews*, 21(1), 85–111.
- Byrne, K.P. ve Wolfe, K.H., 2005, The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species, *Genome Research*, 15(10), 1456–1461.
- Bunn, H.F., Higgins, P.J., 1981, Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance, *Science*, 213(4504), 222–224.
- Bushel, P.R, Heard, N.A., Gutman, R., Liu, L., Peddada, S.D. ve Pyne, S., 2009, Dissecting the fission yeast regulatory network reveals phase-specific control elements of its cell cycle. *BMC Syst. Biol.* 3, 93.
- Carlson, M., Osmond, B.C., Botstein, D., 1981, Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics*, 98(1), 25–40.
- Chatr-Aryamontri, A., Breitkreutz, B.J., Heinicke, S., Boucher, L., Winter, A., Stark, C. ve Tyers, M., 2013, The BioGRID interaction database: 2013 update, *Nucleic Acids Research*, 4 D816-23.
- Croft, D., Mundo, A.F., Haw, R., Milacic, M., Weiser, J., Wu, G., Caudy, M., Garapati, P., Gillespie, M., Kamdar, M.R., Jassal, B., Jupe, S., Matthews, L., May, B.,

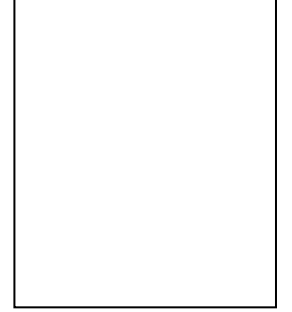
- Palatnik, S., Rothfels, K., Shamovsky, V., Song, H., Williams, M., Birney, E., Hermjakob, H., Stein, L., D'Eustachio, P., 2014, The Reactome pathway knowledgebase, *Nucleic Acids Res.*, 42(Database issue), D472-7.
- Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C., Piškur, J., 2014, Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Research*, 14(6), 826–832.
- Diaz-Ruiz, R., Uribe-Carvajal, S., Devin, A., Rigoulet, M., 2009, Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1796(2), 252–265.
- Diaz-Ruiz, R., Rigoulet, M., Devin, A., 2011, The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807(6), 568–576.
- Diderich, J.A., Schuurmans, J.M., Van Gaalen, M.C., Kruckeberg, A.L. ve Van Dam, K., 2001, Functional analysis of the hexose transporter homologue HXT5 in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast (Chichester, England)*, 18(16), 1515–1524.
- Dietvorst, J., Karhumaa, K., Kielland-Brandt, M.C., Brandt, A., 2010, Amino acid residues involved in ligand preference of the Snf3 transporter-like sensor in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast (Chichester, England)*, 27(3), 131–138.
- Flick, K.M., Spielwoy, N., Kalashnikova, T.I., Guaderrama, M., Zhu, Q., Chang, H.C., Wittenberg, C., 2003, Grr1-dependent inactivation of Mth1 mediates glucose-induced dissociation of Rgt1 from HXT gene promoters, *Molecular Biology of the Cell*, 14(8), 3230–3241.
- Franceschini, A., Szklarczyk, D., Frankild, S., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A. ve Jensen, L.J., 2012, STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration, *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D808–D815.
- Fiers, W., Contreras, R., Duerinck, F., Haegeman, G., Iserentant, D., Merregaert, J., Min Jou, W., Molemans, F., Raeymaekers, A., Van den Berghe, A., Volckaert, G., Ysebaert, M., 1976, Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene, *Nature*; 260(5551):500-7.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H. ve Oliver, S.G., 1996, Life with 6000 genes, *Science* 274(5287), 546, 563–567.
- Griffioen, G., Anghileri, P., Imre, E., Baroni, M.D., Ruis, H., 2000, Nutritional control of nucleocytoplasmic localization of cAMP-dependent protein kinase catalytic and regulatory subunits in *Saccharomyces cerevisiae*, *The Journal of Biological Chemistry*, 275(2), 1449–1456.
- Heiland, S., Radovanovic, N., Höfer, M., Winderickx, J., Lichtenberg, H., 2000, Multiple hexose transporters of *Schizosaccharomyces pombe*, *Journal of Bacteriology*, 182(8), 2153–2162.

- Kaniak, A., Xue, Z., Macool, D., Kim, J.H., Johnston, M., 2004, Regulatory network connecting two glucose signal transduction pathways in *Saccharomyces cerevisiae*, *Eukaryotic Cell*, 3(1), 221–231.
- Kellis, M., Patterson, N., Endrizzi, M., Birren, B. ve Lander, E.S., 2003, Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements, *Nature* 423, 241–54.
- Ken-Ichi, S. ve Anthony, J.S., 1979, Oxidation of l-glucose by a Pseudomonad, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA), Enzymology* 571.
- Kına, Ü.Y., 2016, *Schizosaccharomyces pombe*'de heksoz taşıyıcılarının anlatım düzeylerinin araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- Kim, J.H., Johnston, M., 2006, Two glucose-sensing pathways converge on Rgt1 to regulate expression of glucose transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *The Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26144–26149.
- Kübler, E., Mösch, H.U., Rupp, S., Lisanti, M.P., 1997, Gpa2p, a G-protein alpha-subunit, regulates growth and pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent mechanism, *The Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20321–20323.
- Lagunas, R., 1979, Energetic irrelevance of aerobiosis for *S. cerevisiae* growing on sugars, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 27(3), 139–146.
- Lemaire, K., Van de Velde, S., Van Dijck, P., Thevelein, J.M., 2004, Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*, 16(2), 293–299.
- Lewis, D.A., Bisson, L.F., 1991, The HXT1 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* is a new member of the family of hexose transporters. *Molecular and Cellular Biology*, 11(7), 3804–3813.
- Longo, V.D., Shadel, G.S., Kaeberlein, M. ve Kennedy, B., 2012, Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*, *Cell Metab.* 16, 18–31.
- Min Jou, W., Haegeman, G., Ysebaert, M., Fiers, W., 1972, Nucleotide sequence of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein, *Nature*; 237(5350):82-8.
- Mosley, A.L., Lakshmanan, J., Aryal, B.K. ve Ozcan, S., 2003, Glucose-mediated phosphorylation converts the transcription factor Rgt1 from a repressor to an activator, *The Journal of Biological Chemistry*, 278(12), 10322–10327.
- Ozcan, S., Johnston, M., 1995, Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose, *Molecular and Cellular Biology*, 15(3), 1564–1572.

- Ozcan, S., Leong, T., Johnston, M., 1996, Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription, *Molecular and Cellular Biology*, 16(11), 6419–6426.
- Ozcan, S., Dover, J., Johnston, M., 1998, Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *The EMBO Journal*, 17(9), 2566–2573.
- Ozcan, S., Johnston, M., 1999, Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 63(3), 554–569.
- Palomino, A., Herrero, P., Moreno, F., 2006, Tpk3 and Snf1 protein kinases regulate Rgt1 association with *Saccharomyces cerevisiae* HXK2 promoter, *Nucleic Acids Research*, 34(5), 1427–1438.
- Pancaldi, V., Saraç, Ö.S., Rallis, C., McLean, J.R., Převorovský, M., Gould, K. ve Bähler, J., 2012, Predicting the fission yeast protein interaction network, *G3: Genes|Genomes|Genetics*, 2(4), 453–467.
- Papp, B., Notebaart, R.A., Pál, C., 2011, Systems-biology approaches for predicting genomic evolution, *Nat Rev Genet.*; 12(9):591-602.
- Pasula, S., Chakraborty, S., Choi, J.H., Kim, J.H., 2010, Role of casein kinase 1 in the glucose sensor-mediated signaling pathway in yeast, *BMC Cell Biology*, 11(1), 17.
- Petit, T., Blázquez, M. A., Gancedo, C., 1996, *Schizosaccharomyces pombe* possesses an unusual and a conventional hexokinase: biochemical and molecular characterization of both hexokinases, *FEBS Letters*, 378(2), 185–189.
- Piškur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A., Compagno, C., 2006, How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in Genetics*, 22(4), 183–186.
- Polish, J.A., Kim, J.H. ve Johnston, M., 2005, How the Rgt1 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by glucose. *Genetics* 169, 583–94.
- Reifenberger, E., Boles, E., Ciriacy, M., 1997, Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *European Journal of Biochemistry*, 245(2), 324–333.
- Rhind, N., Chen, Z., Yassour, M., Thompson, D.A., Haas, B.J., Habib, N. ve Nusbaum, C., 2011. Comparative functional genomics of the fission yeasts. *Science*, 332(6032), 930–936.
- Rodríguez, A., De La Cera, T., Herrero, P., Moreno, F., 2001, The hexokinase 2 protein regulates the expression of the *GLK1*, *HXK1* and *HXK2* genes of *Saccharomyces cerevisiae*, *The Biochemical Journal*, 355(Pt 3), 625–631.

- Rolland, F., Winderickx, J., Thevelein, J.M., 2002, Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast, *FEMS Yeast Research*, 2(2), 183–201.
- Roy, A., Shin, Y.J., Cho, K.H., Kim, J.H., 2013, Mth1 regulates the interaction between the Rgt1 repressor and the Ssn6-Tup1 corepressor complex by modulating PKA-dependent phosphorylation of Rgt1, *Molecular Biology of the Cell*, 24(9), 1493–1503.
- Roy, A., Jouandot, D., Cho, K.H., Kim, J.H., 2014, Understanding the mechanism of glucose-induced relief of Rgt1-mediated repression in yeast, *FEBS Open Bio*, 4(1), 105–111.
- Ryan, C.J., Roguev, A., Patrick, K., Xu, J., Jahari, H., Tong, Z. ve Krogan, N.J., 2012, Hierarchical modularity and the evolution of genetic interactomes across species. *Molecular Cell*, 46(5), 691–704.
- Saitoh, S., Mori, A., Uehara, L., Masuda, F., Soejima, S., Yanagida, M., 2015, Mechanisms of expression and translocation of major fission yeast glucose transporters regulated by CaMKK/phosphatases, nuclear shuttling, and TOR. *Molecular Biology of the Cell*, 26(2), 373–386.
- Sanger, F., 1952, The arrangement of amino acids in proteins, *Adv. Enzymol.* 1: 63–98. *Protein Chem.* 7: 1–66.
- Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, C.A., Hutchison C.A., Slocombe, P.M., Smith, M., 1977, Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA, *Nature*; 265(5596):687-95.
- Santangelo, G.M., 2006, Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 253–282.
- Sanz, P., Alms, G.R., Haystead, T.A., Carlson, M., 2000, Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase, *Molecular and Cellular Biology*, 20(4), 1321–1328.
- Scheepers, A., Joost, H.G., Schürmann, A., 2004, The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function, *JPEN. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 28(5), 364–371.
- Stewart, E.V., Nwosu, C.C., Tong, Z., Roguev, A., Cummins, T.D., Kim, D.U. ve Espenshade, P.J., 2011, Yeast SREBP cleavage activation requires the Golgi Dsc E3 ligase complex. *Molecular Cell*, 42(2), 160–171.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., Mesirov, J.P., 2005, Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles, *Proc Natl Acad Sci USA*.

- Sud, A., Kinnersley, B., Houlston, R.S., 2017, Genome-wide association studies of cancer: current insights and future perspectives, *Nat Rev Cancer.*;17(11):692-704.
- Tachibana, C., Yoo, J.Y., Tagne, J.B., Kacherovsky, N., Lee, T.I., Young, E.T., 2005, Combined global localization analysis and transcriptome data identify genes that are directly coregulated by Adr1 and Cat8, *Molecular and Cellular Biology*, 25(6), 2138–2146.
- Wang H., Qin, F., 2017, Genome-wide association study reveals natural variations contributing to drought resistance in crops, *Front Plant Sci.*; 8:1110
- Wang, Z., Chen, Y., Li, Y., 2004, A brief review of computational gene prediction methods, *Genomics Proteomics Bioinformatics*; 2(4):216-21.
- Warburg, O., 1956, On the origin of cancer cells, *Science*, 123(3191), 309–314.
- Wilson, W.A., Hawley, S.A., Hardie, D.G., 1996, Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio, *Current Biology : CB*, 6(11), 1426–1434.
- Wood, V., Harris, M.A., McDowall, M.D., Rutherford, K., Vaughan, B.W., Staines, D.M. ve Oliver, S.G., 2012, PomBase: a comprehensive online resource for fission yeast. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D695–D699.
- Woods, A., Munday, M.R., Scott, J., Yang, X., Carlson, M., Carling, D., 1994, Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo, *The Journal of Biological Chemistry*, 269(30), 19509–19515.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A. ve Cerrutti, L., 2002, Erratum: The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 415(6874), 871–880.
- Zaman, S., Lippman, S.I., Zhao, X. ve Broach, J.R., 2008, How *Saccharomyces* responds to nutrients, *Annu. Rev. Genet.* 42, 27–81.
- Zaman, S., Lippman, S.I., Schnepfer, L., Slonim, N., Broach, J.R., 2009, Glucose regulates transcription in yeast through a network of signaling pathways, *Molecular Systems Biology*, 5(245), 245.
- Zhao, F.Q., Keating, A.F., 2007, Functional properties and genomics of glucose transporters, *Current Genomics*, 8(2), 113–128.

ÖZGEÇMİŞ**Kişisel Bilgiler**

Adı Soyadı	Medet TAN
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	06.11.1985, Gerger
E-mail	medettan@gmail.com

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü / Moleküler Biyoloji ve Genetik	2019
Lisans	İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Bilgisayar Mühendisliği	2009
Lise	Dede Korkut Anadolu Lisesi	2004