

**BİYOMETAL İYONLARININ *GPD1* GENİ
TRANSKRİPSİYONUNA VE HÜCRE DÖNGÜSÜNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Günay İBRAHİMOVA





T. C
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİYOMETAL İYONLARININ *GPD1* GENİ TRANSKRİPSİYONUNA VE
HÜCRE DÖNGÜSÜNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Günay İBRAHİMOVA
ORCID 0000-0003-1709-5758

Prof. Dr. Sezai TÜRKEK
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA-2021
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİYOMETAL İYONLARININ *GPD1* GENİ TRANSKRİPSİYONUNA VE HÜCRE DÖNGÜSÜNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Günay İBRAHİMOVA

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

Danışman: Prof. Dr. Sezai TÜRKEK

Hücrel faaliyetlerin gerçekleştirilebilmesi için çeşitli metal iyonları gereklidir. Fakat metal iyonlarının hücrelere fazla alınması veya toksik metal iyonlarının hücreye taşınması çeşitli hücrel faaliyetleri engelleyebilir, çeşitli sitotoksik ve bazı genotoksik etkiler de gösterebilir. Bu araştırmada bakır, demir, çinko ve magnezyum iyonlarının *S. cerevisiae* hücrelerinde hücre döngüsüne etkileri ve *GPD1* geni transkripsiyonuna etkileri incelendi. Metal iyonları çözünür bileşikler olarak letal seviyenin altında olan konsantrasyonlarda maya kültürlerinin üreme ortamına ilave edildi. Bu araştırmada elde edilen sonuçlar bakır ve kalsiyum iyonlarının *GPD1* geni transkripsiyonunu baskıladığını göstermektedir. Bu metal iyonlarının glukoz repres şartlarda *GPD1* transkripsiyonunda yaklaşık %30 kadar azalmaya neden olduğu tayin edildi. Buna karşın, magnezyum ve demir iyonlarının ise *GPD1* transkripsiyonunu düşük seviyede aktive ettiği belirlendi. *GPD1* geni transkripsiyonunun metal iyonları ile kontrolünde stres ile aktive edilen transkripsiyon faktörleri olan Msn2p ve Yap1p'nin herhangi bir işlevi olmadığı da gösterildi. Msn2p'nin *GPD1* transkripsiyonu için normal şartlarda gerekli olduğu, stres yanıtı için ise gerekli olmadığı tayin edildi. *GPD1*'in metal stresi ile kontrolü için çok fonksiyonlu ve genel bir protein kinaz olan Snf1p'nin gerekli olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Biyometal, Hücre döngüsü, Maya, Transkripsiyon.

2021, XII + 47 sayfa

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF BIOMETAL IONS ON THE TRANSCRIPTION OF *GPD1* GENE AND CELL CYCLE

Gunay IBRAHIMOVA

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

Supervisor: Prof. Dr. Sezai TÜRKEK

Various metal ions are required to perform cellular activities. However, excessive absorption of metal ions into cells or the transport of toxic metal ions into the cell can interfere with various cellular activities, and may exhibit various cytotoxic and some genotoxic effects. In this study, the effects of copper, iron, zinc and magnesium ions on cell cycle in *S. cerevisiae* cells and their effects on *GPD1* gene transcription were investigated. Metal ions as soluble compounds to the growth medium of the yeast cultures at concentrations below the toxic levels were added. The results obtained in this research show that copper and calcium ions represses *GPD1* gene transcription. It was determined that these metal ions caused approximately 30% repression in *GPD1* transcription under glucose repression conditions. In contrast, magnesium and iron ions were found to activate *GPD1* transcription at a low level. It has also been shown that stress-activated transcription factors Msn2p and Yap1p have no function in the control of *GPD1* gene transcription with metal ions. It was determined that Msn2p was required for *GPD1* transcription under normal conditions and not for stress response. It was determined that Snf1p, a multifunctional and general protein kinase, is required for the control of *GPD1* with metal stress.

Key words: Biometals, Cell cycle, Transcription, Yeast.

2021, XII + 47 pages

TEŞEKKÜR

Başta, yüksek lisans eğitimim boyunca yardımları için danışmanım ve bölüm başkanımız **Prof. Dr. Sezai Türkel**'e ve laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan değerli yüksek lisans arkadaşım **Gözde Arslan**'a teşekkür ederim.

Bu tez araştırmasında kullandığımız *GPD1-LacZ* gen füzyonu vektörünü sağlayan değerli bilim insanı **Prof. Dr. Stefan Hohmann**'a (**University of Goetburg Sweeden**) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez çalışmalarımda önemli bir yeri olan *S. cerevisiae* hücrelerinin mikroskop görüntülerinin alınmasında teknik yardımları için **Prof. Dr. Sevcan Çelenk** ve onun yüksek lisans öğrencilerine teşekkürlerimi

Günay İBRAHİMOVA
12 / 02 / 2021

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLERİN DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	2
2. 1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nın Genom Yapısı ve Hücresel Özellikleri.....	2
2. 2. Biyometal İyonları ve Hücresel Önemi.....	7
2. 3. Metal İyonlarının <i>S. cerevisiae</i> 'da Etkileri	8
2. 4. GPD1 Geni Yapısal Özellikleri.....	11
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	15
3. 1. Araştırmada Kullanılan Maya Suşları ve Üreme Koşulları	15
3. 2. <i>GPD1</i> -LacZ Raportör Vektörünün Yapısı ve Transformasyonu	16
3. 3. <i>S. cerevisiae</i> Transformantlarına Biyometal Stresi Uygulaması.....	18
3. 4. <i>GPD1</i> -LacZ Gen Füzyonundan Promotor Aktivitesi Tayini	18
3. 5. Biyometal İyon Stresinin Hücre Fenotipi ve Üremesine Etkilerinin Tayini.....	19
4. BULGULAR	21
4. 1. Farklı Biyometal İyonlarının <i>GPD1</i> Transkripsiyonuna Etkileri.....	21
4. 2. Msn2p'nin Biyometal Stresinde <i>GPD1</i> Transkripsiyonuna Etkileri	23
4. 3. Hog1p ve Hot1p'nin Biyometal Stresinde <i>GPD1</i> Transkripsiyonuna Etkileri	25
4. 4. Aft1p'nin Biyometal Stresinde <i>GPD1</i> Transkripsiyonuna Etkileri	26
4. 5. Yap5p'nin Biyometal Stresinde <i>GPD1</i> Transkripsiyonuna Etkileri.....	27
4. 6. Biyometal İyonları Stresinin Hücre Fenotipine ve Üremeye Etkileri.....	28
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	33
KAYNAKLAR DİZİNİ	37
EKLER.....	41
Ek 1. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması	42
Ek 2. β - Galaktozidaz Aktivitesi Hesaplanması.....	45
Ek 3. Metal İyon Çözeltilerinin Hazırlanması	46
ÖZGEÇMİŞ	47

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Ca ⁺⁺	Kalsiyum 2 ⁺ iyonu
Fe ⁺⁺	Demir 2 ⁺ iyonu
Cu ⁺⁺	Bakır 2 ⁺ iyonu

α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta, delesyon
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
%	Yüzde

Kısaltmalar

Açıklama

ATP	Adenosin trifosfat
cDNA	kopya DNA, komplementer DNA
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DR	Glukoz baskısı altında olmayan, (Derepressed)
<i>GPD1</i>	Gliserol 3-Fosfat Dehidrogenaz-1 geni
Gpd1p	Gliserol 3-Fosfat Dehidrogenaz-1 proteini/enzimi
GRAS	Generally Recognized as Safe, Genellikle Güvenli Organizma
HOG	High Osmolarity Glycerol response
Kbp	Kilo baz çifti
LacZ	Beta-Galactozidaz geni
LiOAc	Lityum asetat kısa sembolü
Leu	Lösin
M	Molar
MAT	Mating type, <i>S. cerevisiae</i> 'da eşleşme tipi
Mbç	Mega baz çifti
mg	Miligram
mm	Milimetre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
OD	Optical Density
ONPG	Orto Nitro Phenyl Galactoside
ORF	Open Reading Frame (Açık okuma Penceresi)
PEG	Polyetilen glikol
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PKA	Protein Kinaz A
R	Glukoz baskılaması (Repressed)

RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Rotation per minute
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC- Ura	Urasil içermeyen sentetik tam üreme ortamı
SGD	Saccharomyces Genome Database
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOD	Süperoksit dismutaz
SNF	Sucrose non-fermenting
tRNA	Taşıyıcı RNA
URA	Uracil
yAP	Yeast Aktivatör Protein
YE _p	Yeast Epizomal plazmit
YPK	Yeast Protein Kinase
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast extract Pepton Dextrose



ŞEKİLLERİN DİZİNİ

.....**Sayfa**

Şekil 2.1. <i>S. cerevisiae</i> 'nın yaşam döngüsü.....	6
Şekil 2.2. <i>S. cerevisiae</i> 'da hücre döngüsü aşamaları morfolojileri.....	6
Şekil 2.3. <i>GPD1</i> geni transkripsiyonuna etki eden bazı transkripsiyon faktörleri.	14
Şekil 2.4. <i>S. cerevisiae</i> 'da gliserol biyosentezi yolağı ve Gpd1'in işlevi.....	14
Şekil 4.1. Sodyum stresinin farklı maya suşlarının üremesine etkileri.....	29
Şekil 4.2. Kalsiyum ve demir stresinin farklı maya suşlarında üremeye etkileri...	29
Şekil 4.3. Farklı maya suşlarında bakır stresinin üremeye etkileri.....	30
Şekil 4.4. Kalsiyumun yaban tip hücrede morfolojik etkisi.....	31
Şekil 4.5. Bakır ve demir iyon stresinin yaban tip hücrede morfolojik etkisi.....	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

.....**Sayfa**

Çizelge 2.1. <i>S. cerevisiae</i> filogenetik sınıflandırılması.....	2
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşları ve özellikleri.....	16
Çizelge 4.1. Farklı biyometal iyonlarının repres şartlarda <i>GPD1</i> 'de transkripsiyona etkileri.....	22
Çizelge 4.2. Farklı biyometal iyonlarının derepres şartlarda <i>GPD1</i> 'de transkripsiyona etkileri.....	22
Çizelge 4.3. İkili metal iyon stresinin <i>GPD1</i> 'de transkripsiyona etkileri.....	23
Çizelge 4.4. Msn2p'nin biyometal iyonu stresinde <i>GPD1</i> 'de transkripsiyona etkileri.....	24
Çizelge 4.5. Hog1p sinyal iletim yolağının biyometal iyonu stresinde <i>GPD1</i> 'de transkripsiyona etkileri.....	24
Çizelge 4.6. Transkripsiyon faktörü Aft1'in biyometal iyonu stresinde <i>GPD1</i> 'de transkripsiyona etkileri.....	27
Çizelge 4.7. Transkripsiyon faktörü yAP5p'nin biyometal iyonu stresinde <i>GPD1</i> 'de transkripsiyona etkileri.....	28

1. GİRİŞ

Biyometaller bütün hücrelerde bulunan ve önemli hücresel işlevleri olan metallerdir. Bu metal iyonlarından özellikle demir, bakır, çinko ve magnezyum çeşitli yapısal ve düzenleyici proteinlerin yapılarında bulunur. Ayrıca gen işleyişinin kontrolü ve enzimatik aktivitelerin düzenlenmesi gibi önemli işlevleri olan temel elementlerdir. Bu metal iyonlarının hücreye girişi ve hücre içi konsantrasyonları toksik seviyede olmayacak şekilde ayrıca kontrol edilir, normal şartlarda da hücre içinde hücresel faaliyetleri engelleyecek seviyede birikmez. Biyometallden demir Fe^{2+} ve Fe^{3+} olarak hücreye taşınır metalloenzimlerin yapısında bulunur. Demir iyonları ayrıca elektron taşıma zincirinde sitokromların yapısında bulunarak ökaryotlarda mitokondriyel faaliyetlerin yürütülmesi için gereklidir. Bakır iyonları ise bazı metalloproteinlerin yapısında bulunmakla birlikte demir iyonlarının hücreye alınması ve depolanmasında işlevi bulunan bir biyoelementtir. Çinko; özellikle bazı transkripsiyon faktörlerinin yapısal ve işlevsel bütünlüğü için gereklidir. Bu araştırmada *GPD1* geninde seçilen biyometallere yanıt olarak genin transkripsiyonel kontrolünde nasıl bir değişiklik olacağı incelendi. *GPD1* geni NAD^+ bağımlı gliserol 3-fosfat dehidrogenaz enzimini kodlar. Bu enzimin aktivitesi, sitoplazmik $NADH/NAD^+$ dengesinin (redoks dengesi=redox balance) sağlanması ve dolayısıyla metabolizmanın devamlılığı için mutlaka gereklidir. Ayrıca bu enzim faaliyeti sonucu sentezlenen gliserol de hem membran lipidlerinin sentezi hem de ozmotik strese dayanıklılık için gereklidir. *GPD1* geni transkripsiyonunun fermentatif ve oksidatif üreme koşullarında metal iyonlarından nasıl etkilendiği bilinmemektedir. Ökaryotik hücrelerin bölünerek çoğalması da çevresel, hücresel sinyallere ve hücrenin metabolik durumuna göre kontrol edilmektedir. Araştırmamızda bazı biyometal iyonlarının sub-letal seviyede bulunması durumunda hücre döngüsüne etkileri de asenkronize *S. cerevisiae* kültürlerinde incelenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

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

Saccharomyces cerevisiae antik çağlardan bugüne ekmek, bira vb. yapımında kullanılan bir maya mantarı türüdür. *Saccharomyces cerevisiae*'nin milattan önce 6000 yıllarında Sümer ve Babil de fermente içecek yapımında, mısırdaki ise ekmek mayalamada kullanıldığına ilişkin yazılı kayıtlar vardır (Feldman 2012). Daha sonra *S. cerevisiae*'nin fermentasyonla olan ilişkisi 1835'de tanımlanmıştır ve ilk kez hücre lizati kullanılarak in-vitro olarak şekerden etanol ve karbondioksit üretilebildiği de *S. cerevisiae*'da gösterilmiştir. Bu maya türüne *Saccharomyces cerevisiae* adı 1837'de Meyen tarafından verilmiştir.

Endüstride yaygın olarak kullanıldığından günümüzde halen önemini sürdürmektedir. Ekmek yapımı, içecek üretimi, yemek atıkları işleme ve gıda maddeleri üretimi gibi endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae* türünün filogenetik sınıflandırılması ise aşağıda verildiği şekildedir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. *S. cerevisiae* filogenetik sınıflandırılması.

Taksonomik Grup	Grup/kategori Adı
Şube	Ascomycota
Sınıf	Saccharomycetes
Takım	Saccharomycetales
Familya	Saccharomycetaceae
Cins	<i>Saccharomyces</i>
Tür	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

S. cerevisiae'nın hücresel yapısı ise küresel şekilli, hücre çapı ~5-10 µm olan ökaryotik bir mikroorganizmadır (Goffeau ve ark. 1996). *S. cerevisiae* tomurcuklanarak ürer. Tomurcuklanma ökaryotlardaki mitoz bölünmeyle özdeştir. Ancak ökaryotlardaki mitozdan farklı olarak *S. cerevisiae*'da bölünme sırasında nükleus zarı kaybolmaz. Buna kapalı mitoz denir (Feldman 2012). Hücre döngüsünü kontrol eden genetik faktörler olan siklinler ilk önce CDC (cell Division Cycle) genleri olarak *S. cerevisiae*'da tayin edilmiştir (Hartwell 1973).

S. cerevisiae ökaryotik mikroorganizmalar içerisinde belki de bilimsel anlamda en çok çalışılmış olanıdır. Tek hücreli ökaryotik bir mikroorganizma olması, insan hücreleriyle birçok yönden benzerlik taşıması, kolayca kültüre edilebilmesi, kısa sürede çoğalabilmesi, mayoz bölünme geçirebilmesi, homolog rekombinasyon, gen delesyonu gibi manipülasyonlara uygun olduğundan rekombinant uygulamalara açık olması, çok uzun yıllardır biliniyor ve kullanılıyor olması, üzerinde birçok çalışma yapıp, karakteristiklerinin ve genomunun iyi biliniyor olması, bunun başlıca sebeplerindendir (Goffeau ve ark. 1996). Model organizma olarak bu tür özelliklerinden dolayı *S. cerevisiae* 21. yüzyılın organizması olarak da tanımlanmıştır (Botstein ve Fink 2011).

S. cerevisiae ile yapılmış olan çalışmalar sayesinde, ökaryot hücre fizyolojisi ve genetik mekanizmaları üzerine çok değerli bilimsel bilgiler literatüre kazandırılmıştır. Tüm genom sekanslama ile genomu dizilenen ilk ökaryotik organizma *Saccharomyces cerevisiae* olmuştur (Feldman 2012, Goffeau ve ark. 1996). *S. cerevisiae* genom dizilimi bilgisi 24 Nisan 1996 yılında kamu erişimine açılmıştır (Goffeau ve ark. 1996). O günden beri, *S. cerevisiae* veri bankasında (SGD: *Saccharomyces* Genome Database) düzenli olarak güncellemeler yapılmaktadır (Anonim 2020a). SGD içeriği ve veri bankası olarak yapısıyla genomik çalışmalara da örnek teşkil etmiştir. Günümüzde birçok organizmaya ait genom veri tabanlarının SGD örneğinden hareketle hazırlandığı bilinmektedir.

S. cerevisiae genomunda protein kodlayan yaklaşık 6000 gen bulunur. Tüm genom ~12 MB büyüklüğündedir. Bunlardan yaklaşık 2000 tanesinin fonksiyonu tanımlanmamıştır, “orphan genes” olarak bilinmektedir. *S. cerevisiae* genomunda protein kodlanan açık

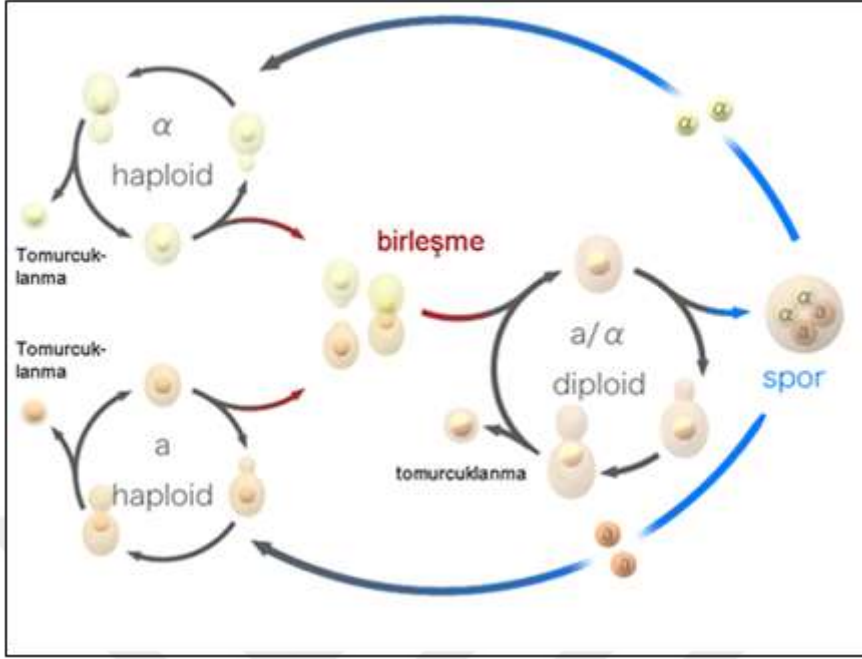
okuma çerçeveleri de (ORF: Open Reading Frame) tespit edilerek genomik DNA dizilimleri belirlenmiştir. Bu açık okuma çerçeveleri yani ORF bölgeleri farklı aminoasit uzunluklarında olabilmektedir (Anonim 2020a). Haploid *S. cerevisiae*'da bütün sekansları bilinen 16 kromozom vardır. Genom büyüklüğü ise 12×10^6 baz çifti kadardır. Yalnız ribozomal DNA tekrarlarının bulunduğu XII kromozomda bu DNA'ların tekrar sayısı maya suşlarında değişkenlik göstermektedir (Feldman 2012).

S. cerevisiae hücreleri glukozu, glikoliz yoluyla üç karbonlu pürüvat molekülüne parçalar. Ortamda yeterli miktarda oksijenin bulunmadığı durumda pürüvat asetaldehit üzerinden etanole dönüştürülür. Bu metabolik yolağın sonucunda bir molekül glukozdan iki molekül etanol üretirler (Feldman 2012). Ortamda oksijen yeterli miktarda bulunuyorsa, pürüvat, AsetilCoA üzerinden Krebs Döngüsüne girebilir ve yüksek enerji elde edilir. Bu yönüyle *S. cerevisiae*, fakültatif anaerobdur. Bu şekilde aerob etkinlik sonucu, maya hücreleri daha fazla enerji üretirler ve hızlı bir şekilde çoğalırlar. Maya biyokütlesi elde edilmek istendiği zaman, aerobik metabolizmayı kullanması teşvik edilir. Ancak, bira, ekmek üretimi vb. işlemleri ilgilendiren, *S. cerevisiae*'nın endüstriyel etkinliği, büyük oranda anaerob metabolik yolu kullanarak fermentatif etkinlik göstermesinden ileri gelir.

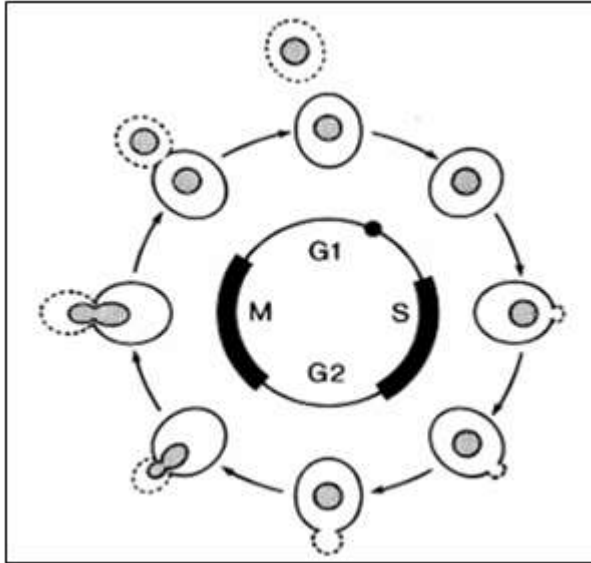
S. cerevisiae hücreleri, diğer birçok fungal organizma gibi, kendilerine has bir yaşam döngüsü gösterirler ve vegetatif olarak bölünebildikleri gibi, eşeyli olarak da çoğalabilirler. Aslında, çoğunlukla çevresel koşullar bu hücrelerin hangi metot ile çoğalacaklarını tayin eder. *S. cerevisiae* hücrelerinin eşeysiz olarak üremesi tomurcuklanmayla, eşeyli olarak üremesi sporla olur. *S. cerevisiae* diploid ya da haploid olarak yaşamına devam edebilir (Feldman 2012). Sporulasyon sadece diploid hücrelerde görünür, haploid *S. cerevisiae* hücreleri spor oluşturmaz. Ayrıca, azot açlığı gibi stres koşullarında *S. cerevisiae* hücreleri mitotik olarak bölündükten sonra birbirine bağlı kalarak psödohif olarak tanımlanan yapıyı da oluştururlar (Gimeno ve ark. 1993) Tomurcuklanma işlemi sırasında, ana hücrenin çekirdeği bölünür ve kendisini yeni hücreye doğru konumlandırır. Tomurcuk sürekli büyür ve tamamen olgunlaştığında, ana hücreden ayrılabilir ve bağımsız bir hücre olarak işlev görebilir (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2). *S. cerevisiae*'da hücre döngüsü aşamalarını ışık mikroskobu ile ayırt etmek de mümkündür

(Şekil 2.2). G1 aşamasındaki hücreler hiç tomurcuk içermez. S fazında ise tomurcuklanma başlar. G2 aşamasında yavru hücreyi oluşturacak tomurcuk ana hücrenin yaklaşık yarısı kadardır. Mitoz sonundaki maya hücrelerinde ise yavru hücre büyüklüğü yaklaşık olarak ana hücre kadardır (Şekil 2.2).





Şekil 2.1. *S. cerevisiae*'nin yaşam döngüsü (Anonim 2020b).



Şekil.2.2. *S. cerevisiae*'da hücre döngüsü aşamaları morfolojileri (Herskowitz 1988).

2.2. Biyometal İyonları ve Hücresel Önemi

Bütün canlı organizmalar büyüme, gelişme ve metabolik kontrolleri için çeşitli biyometallere ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle canlı organizmalar bulundukları ortamlardan çeşitli taşıma mekanizmaları ile hücre içine ihtiyaçları olduğu kadar biyometal iyonlarını alırlar. Ancak biyolojik sistemlerde bulunan biyometaller iyonlaşmış şekilde pozitif veya negatif yüklü olarak bulunur. Bu nedenle biyometal iyonlarının hücre içine taşınması ve hücrede farklı biyolojik olaylar için kullanımı sıkı düzenleme gerektirir (Cyert ve ark. 2013). Biyometal iyonları hücre içi pH kontrolünde, sinyal iletiminde ve çeşitli enzimatik reaksiyonlarda ko-faktör olarak kullanılırlar. İnsanda biyometal iyonlarının düzensiz olarak hücrede bulunması veya eksikliğinin çeşitli metabolik hastalıklara yol açtığı da bilinmektedir (Pokusa ve Trancikova 2017). Canlı sistemleri için çok sayıda metal iyonu çeşitli metabolik faaliyetler için gerekmektedir. Ancak doğada bulunan minerallerden magnezyum (Mg^{2+}), çinko (Zn^{2+}), sodyum (Na^{+}), potasyum (K^{+}) demir (Fe^{2+}), ve bakır (Cu^{2+}) birçok metabolik olayın kontrolünde merkezi işlevi olduğu bulunmuştur. Bu nedenle bu tür metal iyonlarına biyolojik sistemlerdeki önemleri dolayısıyla biyometal iyonları denir. Biyometal iyonları enzimlerde kofaktör olarak yer aldıklarında enzim-substrat etkileşiminin sağlanmasında da önemli işlev görürler. Katalaz ve peroksidaz demir, sitokrom oksidaz bakır, ve karbonik anhidraz ise çinko içeren önemli metallo enzimlerdir. Çinko ayrıca transkripsiyon faktörlerinin yapısında da yer alır ve bu proteinlerde çinko parmak yapısı (zinc finger) oluşumuna neden olur (Brown 2013).

Demir birçok enzim yapısında bulunmakla birlikte özellikle ökaryotlarda mitokondride elektron taşıma zincirindeki işlevi dolayısıyla hücre içine kontrollü olarak taşınması gerekir. Mitokondride oksidatif solunumda demir-sülfür kompleksi olarak bulunan demir farklı canlılarda farklı şekillerde depolanır. İnsanda başta karaciğer olmak üzere ferritin ve hemosiderin olarak depolanır. Ayrıca hemoglobin yapısında heme kompleksi olarak bulunur (Nelson ve Cox 2013). *S. cerevisiae*'da ise demir mitokondriyel işlevine ek olarak ko-faktör olarak da kullanılır ve vakuolde depolanır. *S. cerevisiae*'da demir taşınımı bakır iyonlarına bağlıdır (Cyert ve Philpott 2013).

Sodyum potasyum ise hücrelerde elektrolit dengesini korumak için oldukça önemlidir. Canlılarda su dengesi dokularda ve vücut sıvılarında asit-baz dengesinin korunması hücre zarında bulunan sodyum potasyum pompaları aracılığı ile sağlanır. Potasyumun hücre içi dengesi aynı zamanda insanda kardiovasküler fonksiyon ve sinir iletilsinin normal olarak gerçekleşmesi için gereklidir. Hücrelerde sodyum potasyum dengesi ATPaz olan membran transport sistemlerince sağlanır (Nelson ve Cox 2013).

Kalsiyum diğer önemli bir biyometaldir. Ökaryotlarda çok fonksiyonlu bir biyometal iyonu olup hem yapısal olarak ve hem de sinyal aktive edici iyon olarak işlevleri vardır. Kalsiyum-kalmodulin sinyal yolağı hem maya hücrelerinde hem de insanda moleküler bileşenleri iyi aydınlatılmış bir sinyal yolağıdır. Kalsiyum iyonları kalmoduline bağlanarak kalsiyum kalmodulin yolağını aktive ederler. Bu yolak tarafından apoptoz, T-hücre aktivasyonu, insanda hafıza oluşumu gibi çok çeşitli biyolojik süreçler kontrol edilir. Kalsiyum kalmodulin yolağı bütün ökaryotlarda korunmuştur ve özellikle *S. cerevisia*'da bu sinyal yolağı bileşenleri transkriptom seviyesinde oldukça iyi aydınlatılmıştır (Cyert ve Philpott 2013, Goldman ve ark. 2014, Theves 2014).

2.3. Biyometal İyonlarının *S. cerevisiae*'da Etkileri

Biyometal iyonlarının farklı gen ifadelerine etkileri *S. cerevisiae*'da oldukça ayrıntılı olarak incelenmiştir. *S. cerevisia*'da yapılan bir transkriptom çalışmasında bu organizmadaki genlerin en az %22'sinin transkripsiyon seviyesinde araştırmada uygulanan metal iyonlarına yanıt olarak en az 2 kat değişiklik olduğu bulunmuştur (Jin ve ark. 2008). Farklı metal iyonlarının *S. cerevisiae*'da farklı mekanizmalar ile hücre içine taşındığı bilinmektedir (Wysocki ve Tamas 2010, Cyert ve Philpott 2013). Bu araştırmada incelenecek olan biyometal iyonlarının *S. cerevisiae* için metabolik önemi ve hücre içine taşınma, transport mekanizmaları aşağıda özetlenmiştir.

Metal iyon stresine yanıt olarak *S. cerevisiae*'da aktive edilen diğer bir genetik yolak ise genel stres sinyal yolağıdır. Bu sinyal yolağı ile aktive edilen transkripsiyon faktörleri olan Msn2p ve Msn4p (Msn2/4) hedef genlerin aktivasyonunu sağlayıp maya hücrelerinin strese tolerans göstermelerini sağlar. Toksik metal iyon stresine yanıt

olarak aktive edilen diğerk transkripsiyon faktörü ise yAP (Yeast Activator Protein) grubu transkripsiyon faktörleridir (Morano ve ark. 2012). Transkripsiyon faktörü Msn2/4 kontrol ettiğı genlerin promotor bölgesinde strese yanıt olarak Stres yanıt elementi (Stres response element: STRE) olarak bilinen sekansa bağlanır. Bu DNA sekansı (5'-CCCT-3') olup Msn2/4 ile kontrol edilen bütün promotorlarda bulunmaktadır (Martinez-Pastor ve ark. 1996). yAP grubu transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı DNA dizileri de bilinmekte olup yAP faktörüne göre değışiklik gösterebilmektedir. *S. cerevisiae*'da çok sayıda yAP grubu transkripsiyon faktörü vardır (yAP1-yAP8)(Fernandez ve ark. 1997). Bu faktörlerden bazıları aktivatör, bazıları ise represördür. Bunlardan yAP5'in demir stresine yanıt olarak aktive edilip hedef genlerin transkripsiyonlarını aktive ettiğı bilinmektedir (Li ve ark. 2008). yAP7 ise nitrik oksid sinyaline yanıt olarak aktive edilen represördür (Merhej ve ark. 2015). yAP grubu transkripsiyon faktörlerinin hedef promotorlarda bağlanma dizileri (5'-TGACTCA-3') ve benzeri sekanslardır (Anonim 2020c).

Bu genel transkripsiyon faktörlerine ek olarak *S. cerevisiae*'da biyometal iyonlarına spesifik olarak aktive edilen transkripsiyon faktörleri de vardır. Bunlardan birisi ise kalsiyum stresine yanıt olarak aktive edilen Crz1p (Calcineurin-Responsive Zinc finger) transkripsiyon faktörüdür (Thewes 2014). Demir iyonlarının kullanımı ile ilgili hedef genleri kontrol eden transkripsiyon faktörü ise Aft1'dir (Activator of Ferrous Transport). Ayrıca bakır iyonlarının da Mac1p ve Ace1p adlı transkripsiyon faktörleri aracılığı ile hedef genlerin transkripsiyonunu kontrol ettiğı bilinmektedir (Cyert ve Philpott 2013).

Metal iyon stresine yanıt olarak *S. cerevisiae*'da bazı metabolik adaptasyon mekanizmaları da gelişmiştir. Maya üreme ortamına özellikle toksik seviye biyometal iyonları uygulandığında maya hücreleri buna yanıt olarak metal iyonlarının hücreye girişinin önlenmesi veya metal iyonunu detoksifiye edici mekanizmalar da geliştirmiştir (Wysocki ve Tamas 2010)

Kalsiyum bütün ökaryotlarda sinyal iletici biyometal olarak kalsiyum-kalmodulin sinyal yolağında aktivatördür. Kalsiyum maya hücrelerine hem yüksek afiniteli ve hem de

düşük afiniteli taşıma sistemleri ile alınır. Hücre içine alınan kalsiyumun %90 kadarı maya hücrelerinde vakuolde depolanır. Bu durum insan hücrelerinden farklılık gösterir (Cyert 2013). Kalsiyum biyometal iyonu olarak *S. cerevisiae*'da bölünmenin kontrol edilmesinde işlevseldir. Kalsiyum-kalmodulin sinyal yolağı *S. cerevisiae*'da Crz olarak adlandırılan transkripsiyon faktörünü aktive ederek hedef genlerin transkripsiyonunu kontrol eder (Thewes 2014, Cyert ve Philpott 2013, Cyert 2001).

Demir hücrelerde çoklu işlevleri olan bir biyometal iyonudur. *S. cerevisiae*'da hem mitokondride elektron taşıma zinciri bileşenlerinde hemde bazı enzimlerin yapısında kofaktör olarak bulunur. Bu nedenle hücre içi seviyesi de oldukça sıkı şekilde kontrol edilir. Demirin hücre içine taşınması ve vakuolde depolanması ile ilgili faktörleri aktive eden transkripsiyon faktörleri Aft1p ve Aft2p'dir. Bu transkripsiyon faktörleri tarafından *S. cerevisiae*'da ekspresyonu kontrol edilen genlere topluca demir regulonu (iron regulon) denir. Demir önce maya hücre duvarında bulunan bazı proteinlere bağlanarak lokal konsantrasyonu zenginleştirilir. Daha sonra ise maya hücrelerine membranda bulunan transporter protein Fet3p-Ftr1p kompleksi tarafından aktif olarak hücre içine aktarılır. Fet3p-Ftr1p sistemine ek olarak *S. cerevisiae*'da hücre duvarı kompleksinde bulunan demir iyonu kompleksleri ayrıca Arn/Sit sistemi olarak bilinen transport sistemi ile de hücreye alınır. *S. cerevisiae*'da demir vakuolde depo edilir (Cyert ve Philpott 2013).

Diğer bir biyometal iyonu olan çinko ise *S. cerevisiae*'da Zrt2 (Zinc-Regulated Transporter) aracılığı ile sitoplazmaya alınır ve vakuolde depolanır. *S. cerevisiae*'da çinkoya bağlı olarak aktivitesi kontrol edilen 476 farklı metallo protein olduğu belirlenmiştir. Çinko taşınımı ve kullanımı ile ilgili genler Zap1p (Zinc-responsive Activator Protein 1) tarafından kontrol edilir. Çinko bazı transkripsiyon faktörlerinin yapısında yer alır. Ayrıca karbonik anhidraz gibi önemli metabolik enzimlerin işlevi de kofaktör olarak bulunan çinko iyonuna bağlıdır (Cyert ve Philpott 2013)

Sodyum *S. cerevisiae* hücrelerinde aktif olarak depolanmaz ve hücre içi konsantrasyonu da oldukça sıkı kontrol edilir. Sodyum iyonunun hücre içine taşınması membran transporterleri olan Nha1 taşıyıcı sistem ile gerçekleşir. Bu sistem sodyum potasyum

taşıma sistemi olarak bilinmektedir (Cyert ve Philpott 2013). Sodyum iyonu yüksek konsantrasyonda bulunduğu *S. cerevisiae*'da HOG (High Osmolarity Glycerol) sinyal yolağı olarak bilinen yolağı aktive ederek hücrede gliserol biyosentezini aktive eder. Sodyuma bağlı olarak aktive edilen genlerden birisi de bu araştırmada incelenen *GPD1* genidir.

Biyometal iyonu olarak bakır iyonları hücrede demir ve çinkoya nazaran çok daha az miktarda gereklidir. Bakır metalloproteinlerin yapısında bulunur. Bakır iyonlarının hücre içine taşınması ve hücrede kullanımı ile ilgili faktörler bakıra bağlı olarak aktive edilen transkripsiyon faktörleri Mac1p ve Ace1p tarafından kontrol edilmektedir. Bakır iyonları hücre zarından Fre1p ve Fre7p olarak bilinen transporterler ile hücre içine taşınır. Hücre içi bakır konsantrasyonu oldukça düşüktür ve bakır iyonları sitoplazmada protein kompleksi olarak bulunurlar ve metallo enzimlere bağlanırlar (Cyert ve Philpott 2013).

2.4. *GPD1* Geni Yapısal Özellikleri

GPD1 geni NAD-bağımlı gliserol-3-fosfat dehidrojenaz ailesinin üyesi bir enzim olan Gpd1p'yi kodlar (Albertyn ve ark. 1994). *GPD1* geni *S. cerevisiae* genomunda 4. kromozomda yer alır. İntron içermez ve 391 amino asit uzunluğunda kodlama bölgesi vardır.

Gpd1 enzimi dihidroksiaseton fosfatın (DHAP) ve indirgenmiş nikotin adenin dinükleotitinin (NADH) gliserol-3-fosfata (G3P) ve NAD^{+} 'a dönüşümünü katalize ederek karbonhidrat ve lipid metabolizmasında kritik bir rol oynar (Şekil 2.4). Bu şekilde *S. cerevisiae* için hem gliserol biyosentezini sağlarken aynı zamanda sitoplazmik NAD^{+} konsantrasyonunun yenilenmesine de katkı sağlayan bir enzimdir (Ansell ve ark. 1997, Björkqvist ve ark. 1997). $\text{NADH}/\text{NAD}^{+}$ dengesinin korunması bütün ökaryotlarda başta glikolitik yolak olmak üzere metabolizmanın devamı için gereklidir.

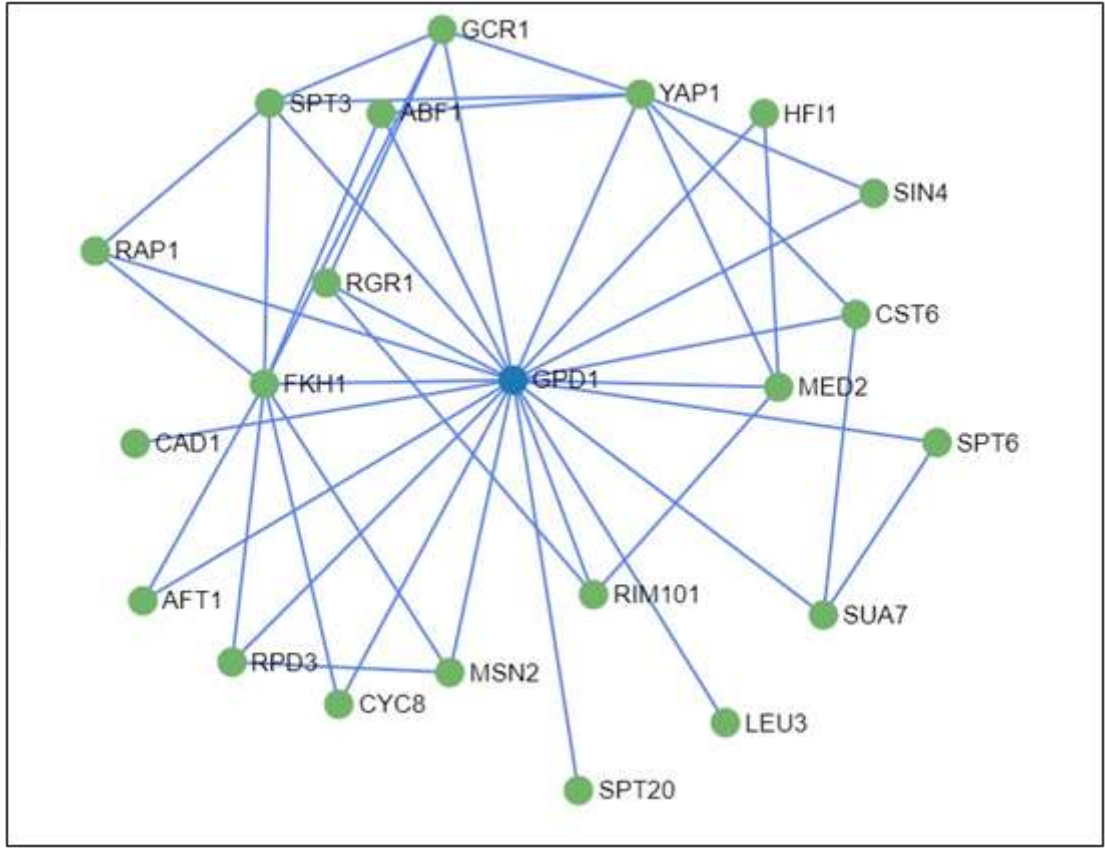
S. cerevisiae mayasında da bu gen gliserol metabolizması için gereklidir. Gliserol, *S. cerevisiae* sitozolunda, sırasıyla gliserol-3-fosfat dehidrojenaz (Gpd1p) ve gliserol-3-fosfataz (Gpp) ile katalize edilen iki aşamada glikolitik ara dihidroksiaseton fosfattan sentezlenir (Şekil 4.2). Gpd'nin iki izoenzimi vardır. Bunlar Gpd1p ve Gpd2p'dir. Gpd1p ozmotik stresle aktive edilir ve bazal seviyede ekspresyonu da çok yüksetir (Hohman 2002). Gpd2p ise oksijensiz ortam koşullarında (anoxic) aktive edilir. Sitoplazma ve mitokondride bulunur (Jung ve ark, 2010, Valadi ve ark, 2004).

Gliserol-3-fosfat dehidrojenazı kodlayan *GPD1* ve *GPD2* genleri *S. cerevisiae*, *S. diastaticus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida glycerinogenes* ve *Zygosaccharomyces rouxii* gibi farklı maya türlerinden klonlanmıştır ve sekansları da bilinmektedir (Chen ve ark. 2008). Bu maya türlerinde de işlevi gliserol metabolizmasının kontrolüdür.

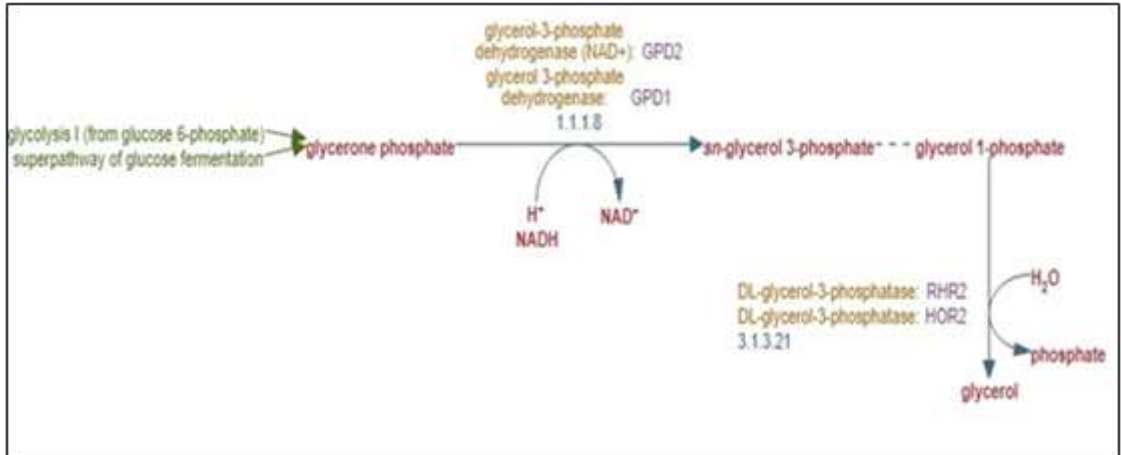
GPD1 geni transkripsiyonunu kontrol eden faktörler farklı araştırma grupları tarafından ayrıntıları ile çalışılmıştır. *GPD1* transkripsiyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörleri ve bu faktörlerin genin promotor bölgesindeki bağlanma sekansları ve transkripsiyona etkileri SGD ve YEASTRACT veri tabanında ayrıntıları ile verilmiştir (Anonim 2020a, Anonim 2020c). YEASTRACT kayıtlarında olan ve *GPD1* geni transkripsiyonuna etkileri olan faktörlerden bazıları şunlardır: Msn1p, Msn2p, Msn4p, Hot1p, Aft1p, Tup1p, Sko1p, Yap1p, Yap6p, Pdr1p, Gcrp, Fkh1p vd. Bu transkripsiyon faktörlerinin bazıları represördür (Tup1 ve Fkh1 gibi). Pd1p ise çinko'nun hücre içi kullanımı ile ilgili faktörleri kodlayan genleri de kontrol eder ve çoklu ilaç dirençliliği yanıt sekansına (Pleiotropic Drug Response Element PDRE) bağlı faktörler ile birlikte hedef promotorlara etki eder. Msn2p ve Msn4p (Msn2/4 olarak gösterilir) transkripsiyon faktörleri ise metal iyon stresi dahil olmak üzere çok çeşitli streslerle aktive edilen transkripsiyon faktörleridir. Aktive ettikleri genlerin promotor bölgesindeki stres yanıt elementi STRE: Stress Response Elements) olarak bilinen DNA sekanslarına bağlanırlar (Martinez-Pastor ve ark. 1996). Hot1p ise ozmotik strese yanıt olarak *GPD1* geni transkripsiyonunu aktive eder (Rep ve ark. 2000). Hot1p bir çeşit protein kinaz olan ve ozmotik stresle aktive olan Hog1p protein kinazı tarafından aktive edilir (Hohmann 2002). *GPD1* promotorunun çok sayıda faktörle kontrol ediliyor

olması bu genin farklı stres koşullarına ve metabolik değişikliklere yanıt olarak aktive edildiğini veya transkripsiyonunun baskılandığını da göstermektedir.

Biyometal iyonlarının sıvı çözeltilerde pozitif yüklü olarak bulunmaları bunların hücreye taşınması sonucu sitoplazmada da net yükü değiştirmektedir. Sitoplazmada ve vakuol gibi organellerde iyonik net yükün belirli aralıklarda sabit tutulabilmesi için hücreler belirli yanıt mekanizmaları geliştirmişlerdir. Biyometal iyonları metallo enzimlerde yapısal işlevlerine ek olarak sinyal iletili elementler olarak da hücre metabolizması ve hücre bölünmesine etki edebilmektedirler. Bu tez araştırmasında bazı biyometal iyonlarının hücrede bölünme, hücre döngüsü ve *GPD1* geni transkripsiyonuna etkileri incelenmiştir.



Şekil 2.3. *GPD1* geni transkripsiyonuna etki eden bazı transkripsiyon faktörleri (Anonim 2020a).



Şekil 2.4. *S. cerevisiae*'da gliserol biyosentezi yolağı ve Gpd1'in işlevi (Anonim 2020d).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3. 1. Araştırmada Kullanılan Maya Suşları ve Üreme Koşulları

Bu tez araştırmasında kullanılan *S. cerevisiae*'nin yaban tip ve mutant suşları ve özellikleri çizelge 3. 1'de verildi. Bu *S. cerevisiae* suşları Frankfurt Üniversitesi tarafından kontrol edilen EUROSCARF maya koleksiyonundan satın alındı. Bu *S. cerevisiae* suşlarının tüm genomları sekanslanmış olup Çizelge 3.1'de verilen delesyonlardan başka mutasyon içermedikleri bilinmektedir. Araştırmamızda yaban tip suş olarak kabul edilen BY4741 (Y00000) (laboratuvar kodu olarak YST124) suşu biyometallerin hücre içine taşınımında ve hücresel özelliklerin incelenmesinde standart referans suş olarak kabul edilmiştir. EUROSCARF'dan sağlanan yaban tip ve mutant *S. cerevisiae* suşlarına ait örnekler ayrı ayrı YPD (Yeast Extract, Peptone, Dextrose) petrilere çizgi ekimi yapılarak yeniden üretilmek ve canlılıklarını doğrulamak için 30 °C'de, 48 saat inkübatörde üremeye bırakıldı. Delesyonlu suşların ilgili gende delesyon içerdikleri satın alınan *S. cerevisiae* suşları G418 (Geneticin) içeren petrilere üretilerek doğrulandı. KanMX4 markör geni içeren delesyonlu suşların G418 antibiyotikğine direçli oldukları doğrulandı. Delesyonlu suşlar daha önce üretici kurum tarafından açıklandığı şekilde elde edilmiştir (Brachmann ve ark. 1998).

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

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşları ve özellikleri

ST Lab Kodu	Genotipi ve ilgili mutasyonlar
YST124	MATa, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0.
YST240	MATa, ura3 Δ 0; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; YLR113w: : kanMX4 (Δ hog1 mutantı)
YST241	MATa, ura3 Δ 0; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; YMR172w: : kanMX4 (Δ hot1 mutantı)
YST297	MATa, ura3 Δ 0; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; YGL071w: : kanMX4 (Δ aft1 mutantı)
YST299	MATa, ura3 Δ 0; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; YMR037c: : kanMX4 (Δ msn2 mutantı)
YST300	MATa, ura3 Δ 0; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; YIR018w: : kanMX4 (Δ yap5 mutantı)

3. 2. *GPD1*-LacZ Raportör Vektörünün Yapısı ve Transformasyonu

Araştırmamızda biyometal stresinin etkileri araştırılacak olan *GPD1* geni raportör gen füzyonu olarak daha önce hazırlanmıştır (Rep ve ark. 2000). Bu gen füzyonu Prof. Dr. S. Hohmann (university of Gothenburg) tarafından laboratuvarımızdaki araştırmalar için daha önceden sağlanmıştır. *GPD1*-LacZ gen füzyonu YE_p (Yeast Epizomal plasmid) türü bir ekspresyon vektörü olan 2 μ m-URA3 plazmit vektörü üzerine klonlanmıştır. Bu raportör gende *GPD1* geni promotor bölgesi olan 516 bç'lik bölge (-693'den -177 bç'lik bölgesi) bulunmaktadır ve daha önce yapılan delesyon çalışmalarında normal *GPD1* geni transkripsiyonunun kontrolü için gerekli olan bütün düzenleyici bölgeleri içerdiği gösterilmiştir (Rep ve ark. 2000). YE_p vektörlerinin transformasyonla aktarıldıkları maya suşlarında seçici üreme ortamında stabil olarak bulundukları da daha önce gösterilmiştir (Farabaugh ve ark. 1989).

GPD1-LacZ raportör plazmitinin yukarıda verilen yaban tip ve mutant maya suşlarına transformasyonu daha önce açıklanan şekilde lityum asetat-polietilen glikol metodu ile yapıldı (Gietz ve ark. 1995). Bu yöntem kısaca aşağıda özetlendiği şekilde uygulandı.

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

240 μ L PEG (%50'lik stoktan)

36 μ L 1 M LiAOc (taze stok)

6 μ L denatüre Herring sperm DNA'sı

4-5 μ L (1-2 μ g) plazmid DNA'sı

64 μ L dsH₂O

Toplam hacim 350 μ L olacak şekilde su eklendi.

Elde edilen transformasyon karışımı vortekle karıştırıp önce 30 C'de 30 dk, daha sonra 42 C'de 20 dk bekletildi. Daha sonra transformasyon karışımı mikrofüjde 12500 rpm'de 30 sn çöktürüldü. Sıvı faz atıldı. Pellet olan maya hücreleri 500 μ L stersil saf suda suspanse edildi. Bu transformant maya süspansiyonlarından Sc-Ura+%2 dekstrozu içeren petrilere steril cam baget ile 100 μ L yayma ekimi yapıldı. Petrilerin yüzeyleri kuruduktan sonra 30 C'de etüvde transformant maya kolonileri gelişinceye kadar inkübe edildi. Koloniler 1-2 mm çapında geliştikten sonra tekrar Sc-Ura+%2 dekstrozu içeren petrilere 0.5 cm ebatlarında pasajlar yapıldı. Bu pasajlar da 30 C'de 2-3 gün inkübe edildi. Pasaj yapılan maya transformantları bir sonraki aşamada sıvı kültürlerin hazırlanmasında stok olarak kullanıldı. Transformant petrilere deneyler süresince +4 C'de buz dolabında bekletildi.

3. 3. *S. cerevisiae* Transformantlarına Biyometal Stresi Uygulaması

GPD1 promotor aktivitesine biyometal iyonlarının etkisini belirlemek için önce maya transformantları 10 mL Sc-Ura+%2 dekstroz içeren seçici üreme ortamında ikişerli olarak logaritmik aşamaya kadar üretildi. Log aşamasında maya kültürleri 5'er mL'lik iki kısma bölündü. Bir bölümü normal koşullarda üreme ortamında inkübe edildi. Maya kültürlerinin ikinci 5'er mL'lik kısımlarına ise son konsantrasyonları daha önce belirlenen miktarlarda biyometal iyonları ilave edildi ve maya kültürleri 4-5 saat standart üreme şartlarında üremeye bırakıldı (Schmidt ve ark. 2009). Üreme süresi sonunda maya kültürleri masa üstü santrifüjde 1600 rpm'de 5 dk çöktürüldü, sıvı faz atıldı. Maya pelletleri 1 mL steril saf suda süspanse edilerek steril mikrofüj tüplerine aktarılıp tekrar 12500 rpm'de 1 dk çöktürüldü, sıvı faz atıldı. Maya pelletleri bir sonraki aşamada β -galaktozidaz aktiviteleri tayini için 200 μ L β -galaktozidaz lizis tampon çözeltisinde süspanse edildi. Daha sonraki aşamalarda β -galaktozidaz aktivitesi tayini için ise maya süspanسیونları -80 C'de derin dondurucuda bekletildi. *GPD1* promotoru glukoz baskılaması ile kontrol edilmektedir. *GPD1* transkripsiyonuna biyometal iyonlarının derepres koşullarda etkisini analiz etmek için yukarıda açıklanan şekilde üretilen maya kültürleri logaritmik aşamada masa üstü santrifüjde 1600 rpm'de 5 dk çöktürüldü sıvı faz atıldı. Maya pelletleri 10 mL steril saf suda süspanse edilerek tekrar aynı şekilde santrifüjde çöktürüldü, sıvı faz atıldı. Maya pelletleri derepres üreme koşulları için Sc-Ura+%0.1 dekstroz üreme ortamında süspanse edildi. Bu şekilde hazırlanan maya kültürlerinin bir kısmına yukarıda açıklanan şekilde biyometal stresi uygulandı.

3. 4. *GPD1-LacZ* Gen Füzyonundan Promotor Aktivitesi Tayini

GPD1-LacZ gen füzyonunda yer alan *GPD1* promotorundan yapılan transkripsiyonun kantitatif tayini bu gen füzyonundan maya suşlarında ekspres edilen β -galaktozidaz aktiviteleri ölçülerek belirlendi. Bölüm 3.3'de açıklandığı şekilde hazırlanan maya transformantları önce lizat elde etmek için daha önce açıklanan şekilde SDS ve kloroform ile permeabilized edildi (Rose ve ark. 1990, Gurantee 1983). β -galaktozidaz

aktivitesi tayininde her bir transformants için üçlü olarak deney tüpleri hazırlandı. Bu tüplere önce 980 µL Z-tampon çözeltisi ve üzerine de 20 µL permeabilize edilmiş hücre lizatı eklendi. Bu karışım 30 C'de su banyosunda 3 dk bekletildi ve üzerine 200 µL ONPG ilave edilerek başlangıç zamanı kronometre ile tayin edildi. Deney tüplerinde belirli tonda (açık sarı renk) sarı renk gelişinceye kadar beklendi. Bu süre sonunda geçen zaman dakika olarak kayıt edildi ve reaksiyonu durdurmak için deney tüplerine 500 µL 1 M Na₂CO₃ ilave edildi. Deney tüpleri masa üstü santrifüjde 1600 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çözeltideki lizat parçaları çöktürüldü, sıvı faz 2 mL'lik spektrofotometre hücrelerine aktarıldı ve 420 nm'deki absorbansları lizat içermeyen kontrol sıvıya karşı ölçülerek kayıt edildi. *GPD1-LacZ* gen füzyonlarından yapılan β-galaktozidaz ekspresyonunu normalize etmek için lizatlardaki toplam çözünür protein konsantrasyonları da daha önce açıklanan şekilde Lowry testi ile belirlendi (Lowry ve ark. 1951). Protein tayinleri için test tüplerine 180 µL steril saf su ve 20 µL transformantlardan elde edilen ve β-galaktozidaz aktivitesi tayininde kullanılan lizatlardan 20 µL bu test tüplerine ilave edildi. Daha sonra bu tüplere taze hazırlanmış 1 mL Lowry-C çözeltisi ilave edildi, vorteksle kısaca karıştırıldı ve 10 dk beklendi. Daha sonra bu tüplere 1N folin çözeltisinden 100 µL ilave edildi, vorteksle birkaç sn karıştırıldı ve 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme süresi sonunda test tüpleri 1600 rpm'de 5 dk masa üstü santrifüjde santrifüj edilerek çözeltideki maya lizatları çöktürüldü. Sıvı faz 2 mL'lik spektrofotometre tüplerine aktarılarak oluşan mavi rengin absorbansı spektrofotometrede 750 nm'de lizat içermeyen kontrole göre okunarak kayıt edildi. *GPD1-LacZ* gen füzyonundan yapılan β-galaktozidaz aktiviteleri ek-2'de verildiği şekilde hesaplandı. β-galaktozida ünitesi nm ONPG/dk/mg protein olarak ifade edildi. β-galaktozidaz aktivite tayinleri 3'lü olarak yapıldı. Transformant kültürler de ikişerli olarak üretildi. Bütün deneyler en az iki kez tekrarlandı. Sonuçlar bölümünde verilen β-galaktozidaz aktivitelerinde standart sapma değerleri %10-15 aralığındadır.

3. 5. Biyometal İyon Stresinin Hücre Fenotipi ve Üremesine Etkilerinin Tayini

Biyometal iyonlarının *S. cerevisiae*'da hücre fenotipine etkileri logaritmik aşamadaki normal ortamda ve biyometal iyonu uygulanmış ortamdaki kültürlerden 4. saatte örnek alınarak ışık mikroskopunda direkt görüntülenme ile 10x40 büyütme ile incelendi.

Maya hücrelerinin ışık mikroskobu görünlerinin fotoğrafları alınarak sonuçlar bölümünde verildi.

Biyometallerin *S. cerevisiae* hücrelerinin üreme özelliklerine etkileri ise kalitatif olarak petri testleri ile tayin edildi. Bunun için logaritmik aşamaya kadar sıvı kültürlerde üretilen maya suşlarından 3-4 µL alınarak direkt olarak normal üreme ortamı olan YPD petrisine ve ayrıca sıvı kültürlerde verilen konsantrasyonlarda biyometal iyonlarını içeren YPD petrilere çizgi ekimi yapıldı. Ekim yapılan maya petrilerinin yüzeyleri kuruduktan sonra 30 C etüvde 24-48 saat inkübe edildi. Petrilerdeki maya hücrelerinin üreme durumları inkübasyon süreleri sonunda fotoğraflandı. Bunlarla ilgili fotoğraflar sonuçlar bölümünde verildi.

4- BULGULAR

4. 1. Farklı Biyometal İyonlarının *GPD1* Transkripsiyonuna Etkiler

Biyometal iyonlarının normal üreme ortamı koşullarında *GPD1* geni bazal transkripsiyonuna etkileri *GPD1*-LacZ raportör gen füzyonu kullanılarak test edildi. Bu çalışmada etkisi test edilen biyometaller sırasıyla; Ca^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+3} , Zn^{+2} ve Na^{+2} 'dir. Elde edilen sonuçların karşılaştırmalı analizinde *GPD1* transkripsiyonunun çinko hariç olmak üzere diğer biyometal iyonlarınca en az iki kat aktive edildiğini göstermektedir (Çizelge 4.1). Sodyumun ozmotik stres dolayısıyla *GPD1* transkripsiyonunu önemli derecede aktive ettiği ve bu aktivasyonun moleküler bileşenleri daha önce tanımlanmıştır (Albertyn ve ark. 1994). Bu nedenle *GPD1* transkripsiyonunun sodyum iyonu ile aktive edilmiş olması da bir çeşit pozitif kontrol olarak araştırmada kullanılan *GPD1*-LacZ raportör gen füzyonunun doğru şekilde çalıştığını göstermektedir. Diğer biyometal iyonlarının etkileri analiz edildiğinde en fazla aktivasyonun kalsiyum ile gerçekleştiği, bakır ve demir iyonlarının ise yaklaşık iki kat aktivasyona neden olduğu görülmektedir (Çizelge 4.1). Çinkonun verilen konsantrasyonlarda *GPD1* transkripsiyonuna etkisi görülmediğinden araştırmanın bundan sonraki aşamalarında incelenmemiştir.

GPD1 geni transkripsiyonu bazal seviyesi oldukça yüksek olmasına rağmen kısmen de olsa glukoz baskılaması altındadır (Albertyn ve ark. 1994). Bu nedenle test edilen biyometal iyonlarının *GPD1* geni transkripsiyonuna etkileri derepres koşullarda da test edildi. Bunun için logaritmik aşamaya kadar %2 glukoz içeren ortamda üretilen *GPD1* transformantı yaban tip maya hücreleri (YST124 suşu) bu aşamada Sc-Ura +%0.1 glukoz içeren ortama aktarıldı ve farklı biyometal iyonlarının etkileri karşılaştırmalı olarak analiz edildi (Çizelge 4.2). Derepres şartlarda tamamen aktif promotor üzerine sadece bakır iyonunun etkin olduğu, bakır iyonunun bazal transkripsiyon durumdan derepres duruma geçişi engellendiği elde edilen sonuçlardan görülmektedir. Derepres şartlarda demir iyonunun *GPD1* transkripsiyonuna herhangi bir etkisinin olmadığı, kalsiyumun etkisinin de düşük seviyede kaldığı (%25 kadar artış) görülmektedir. Bu sonuçlardan dolayı araştırmanın bundan sonraki aşamasında biyometallerin *GPD1*

transkripsiyonuna etkilerinin normal üreme koşullarında analiz edilmesinin daha uygun olduğuna karar verildi.

Çizelge 4.1. Farklı biyometal iyonlarının repres şartlarda *GPD1*'de transkripsiyona etkileri.

Biyometal iyonu	β -Galaktozidaz Aktiviteleri* $\pm$ SD
Normal ortam	1762 $\pm$ 92
+100 mM Ca ²⁺	5355 $\pm$ 355
+1 mM Cu ²⁺	3166 $\pm$ 87
+1 mM Fe ³⁺	3460 $\pm$ 41
+4. 4 mM Zn ²⁺	1618 $\pm$ 13
+400 mM Na ²⁺	7679 $\pm$ 335

* β -Galaktozidaz aktiviteleri nmol ONPG/dakika/mg protein olarak verilmiştir.
 $\pm$ SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir.

Çizelge 4.2. Farklı biyometal iyonlarının derepres şartlarda *GPD1*'de transkripsiyona etkileri.

Biyometal iyonu	β -Galaktozidaz Aktiviteleri* $\pm$ SD
Normal derepres ortam	3442 $\pm$ 89
+100 mM Ca ⁺²	4583 $\pm$ 291
+1 mM Cu ⁺²	1385 $\pm$ 42
+1 mM Fe ⁺³	3641 $\pm$ 175
+400 mM Na ⁺²	5783 $\pm$ 105

* β -Galaktozidaz aktiviteleri nmol ONPG/dakika/mg protein olarak verilmiştir. $\pm$ SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir.

Bu araştırmada incelenen biyometal iyonlarının *GPD1* transkripsiyonuna etkilerinin kümülatif olup olmadıkları da test edildi. Bunun için normal üreme ortamında bulunan yaban tip *GPD1* transformantları aynı anda ikili metal iyon streslerine maruz bırakıldı. Sonuçlar   izelge 4. 3’de verildi.   kili olarak test edilen biyometal iyon stresinin *GPD1* transkripsiyonu üzerine kümülatif etki göstermediği bulundu. Kalsiyum ve demir stresinin eř zamanlı olarak uygunlanması durumunda *GPD1* transkripsiyonunun kalsiyum stresi kadar aktive edildiği bulundu (  izelge 4.3). Buna benzer şekilde kalsiyum ve sodyum stresinde de *GPD1* transkripsiyonunun tek başına sodyum iyon stresi seviyesine kadar aktive edildiği bulundu. Kalsiyum ve bakır stresi ortamının da *GPD1* transkripsiyonunun yaklaşık olarak kalsiyum ile aktive edilen seviyede gerçekleştiği görüldü (  izelge 4.3). Bu sonuçlar araştırmada uygulanan biyometal iyonu stresi şartlarının etkilerinin kümülatif veya sinerjistik olmadığını göstermektedir.

Çizelge 4.3.   kili metal iyon stresinin *GPD1*’de transkripsiyona etkileri.

Biyometal iyonu	β-Galaktozidaz Aktiviteleri*$\pm$ SD
Normal derepres ortam	1762 $\pm$ 92
Ca ⁺² + Fe ⁺³	5016 $\pm$ 545
Ca ⁺² + Na ⁺²	7174 $\pm$ 226
Ca ⁺² + Cu ⁺²	4825 $\pm$ 294

* β -Galaktozidaz aktiviteleri nmol ONPG/dakika/mg protein olarak verilmiştir.
 $\pm$ SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir.

4. 2. Msn2p’nin Biyometal Stresinde *GPD1* Transkripsiyonuna Etkileri

Transkripsiyon faktörü Msn2p genel stres şartları altında aktive edilip stres koşullarında ilgili genlerin transkripsiyonel aktivasyonu için gereklidir. Msn2p STRE (Stress Response Element) olarak bilinen DNA sekansına (5’-CCCT-3’) ba  lanmaktadır (Martinez-Pastor ve ark. 1996). *GPD1* promotorunda potansiyel transkripsiyon faktörü

bağlanma dizileri YEASTRACT veritabanında analiz edildiğinde Msn2p/Msn4p faktörleri için bağlanma sekansı olduğu görülmektedir (Anonim 2020c). Msn2p'nin biyometal iyon stresine bağlı olarak da *GPD1* transkripsiyonunu aktive edip etmediği *MSN2* geni delesyonlu maya suşunda test edildi ve elde edilen sonuçlar yaban tip maya suşu ile karşılaştırıldı. Msn2p faktörünü içermeyen mutant *S. cerevisiae* suşunda normal koşullarda ölçülen transkript miktarının yaklaşık olarak yaban tip maya suşunda görülen seviyede gerçekleştiği bulundu (Çizelge 4.4). Ancak $\Delta msn2$ mutant maya suşunda biyometal iyonları stresine yanıt olarak yaban tip maya suşuna göre çok daha düşük seviyede aktivasyon gerçekleştiği bulunudu (Çizelge 4.4). Kalsiyum ve demir iyon stresine yanıt olarak *GPD1* transkripsiyonunda yaklaşık %40-50 kadar bir artış olduğu görüldü. Bakır stresi uygulandığında ise bu mutant suşta hiçbir aktivasyon gerçekleşmediği görüldü. *GPD1* promotorunun sodyumla aktivasyonunun da yaban tip suşa göre sadece iki kat kadar gerçekleştiği görüldü. Bu sonuçlar transkripsiyon faktörü Msn2p'nin kısmen de olsa biyometal iyonları stresine yanıt olarak *GPD1* geni transkripsiyonu aktivasyonunda yer aldığını göstermektedir.

Çizelge 4.4. Msn2p'nin biyometal iyonu stresinde *GPD1*'de transkripsiyona etkileri.

Biyometal iyonu	β -Galaktozidaz Aktiviteleri* $\pm$ SD
Normal derepres ortam	1739 $\pm$ 92
+100 mM Ca ⁺²	2450 $\pm$ 10
+1 mM Cu ⁺²	1581 $\pm$ 105
+1 mM Fe ⁺³	2590 $\pm$ 175
+400 mM Na ⁺²	3855 $\pm$ 199

* β -Galaktozidaz aktiviteleri nmol ONPG/dakika/mg protein olarak verilmiştir.
 $\pm$ SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir.

4. 3. Hog1p ve Hot1p'nin Biyometal Stresinde GPD1 Transkripsiyonuna Etkileri

Protein kinaz Hog1p *S. cerevisiae*'da çeşitli çevresel streslere yanıt olarak aktive edilen ve etkileştiği faktörleri fosforlayıp aktivitelerini değiştiren önemli bir sinyal iletim faktörüdür. Hog1p'nin *GPD1* transkripsiyonunu sodyum iyon stresine bağlı olarak aktive ettiği ve bunun sonucu olarak da *S. cerevisiae*'da gliserol biyosentezi sağladığı bilinmektedir (Hohmann 2002). Araştırmamızda protein kinaz Hog1p'nin biyometal iyonlarına yanıt olarak da *GPD1* transkripsiyonuna etkisi olup olmadığı test edildi. Bu amaçla *HOG1* geni delesyonlu mutant suş kullanılarak elde edilen sonuçlar yaban tip maya suşu sonuçları ile karşılaştırıldı. Hog1 mutant suşunda bazal seviyede *GPD1* transkripsiyonun da yaban tip seviyeye göre yaklaşık 2 kat azaldığı görüldü (Çizelge 4.5). Biyometal iyonlarına maruz bırakılan hog1 mutantında *GPD1* transkripsiyonunda hiçbir aktivasyon olmadığı gibi bakır stresi koşullarında *GPD1* transkripsiyonunda %50 kadar azalma olduğu bulundu (Çizelge 4.5). Kalsiyum, demir ve sodyum iyon stresine maruz bırakılan Δ hog1 mutant suşunda *GPD1* geni transkripsiyonunun yaklaşık olarak 850-936 seviyelerinde gerçekleştiği görüldü.

Çizelge 4.5. Hog1p sinyal iletim yolağının biyometal iyonu stresinde *GPD1*'de transkripsiyona etkileri.

Biyometal iyonları	Maya suşları ve β -Galaktozidaz Aktiviteleri*($\pm$ SD)	
	<i>Δhog1</i> mutanıtı	<i>Δhot1</i> mutanıtı
Normal ortam	850 $\pm$ 54	1917 $\pm$ 161
+100 mM Ca ⁺²	829 $\pm$ 26	3621 $\pm$ 272
+1 mM Cu ⁺²	458 $\pm$ 27	1028 $\pm$ 116
+1 mM Fe ⁺³	860 $\pm$ 5	3519 $\pm$ 8
+400 mM Na ⁺²	939 $\pm$ 8	NA

Hop1p kinazın etkisi ile aktive edilen çok sayıda transkripsiyon faktörlerinden birisi de Hot1p'dir. Hot1p'nin ozmotik stres koşullarında *GPD1* transkripsiyonu aktivasyonu için gerekli olduğu da daha önceki çalışmalarda bulunmuştur (Rep ve ark. 2000). Araştırmamızda biyometal iyon stresine yanıt olarak *GPD1* geni transkripsiyonunda Hot1p'nin de işlevi olup olmadığı incelendi (Çizelge 4. 5). Normal üreme koşullarında Δ hot1 mutant suşunda *GPD1* transkripsiyonunun yaban tip maya suşunda olduğu seviyede gerçekleştiği bulundu. Biyometal iyon stresi uygulanan Δ hot1p mutantı maya suşunda kalsiyum ve demir iyon stresine karşı *GPD1* transkripsiyonunda kısmen aktivasyon gerçekleştiği fakat bakır iyon stresine karşı bu mutant suşta aktivasyon görülmediği bulundu (Çizelge 4. 5). Elde edilen sonuçlar biyometal iyonu stresine karşı, bakır iyon stresi hariç, Hot1p'nin de kısmen işlevsel olduğunu göstermektedir.

4. 4. Aft1p'nin Biyometal Stresinde *GPD1* Transkripsiyonuna Etkileri

Transkripsiyon faktörü Aft1p *S. cerevisiae*'da demir iyonu taşınımı ve dengesi için gerekli olan bir transkripsiyon faktörü olup bu metal iyonunun *S. cerevisiae*'da kullanımı ile ilgili faktörleri kodlayan genlerin aktivatörüdür (Yamaguchi-Iwai ve ark. 1996). Araştırmamızın bu bölümünde Aft1p'nin *GPD1* transkripsiyonunda işlevi olup olmadığı bu faktörü içermeyen mutant suş kullanarak incelendi. Normal ortamda üretilen Δ aft1 mutant suşunda yaban tip maya suşuna göre *GPD1*'in bazal transkripsiyonunda artış olduğu görüldü. Fakat kalsiyum ve demir iyon stresine yanıt olarak *GPD1* transkripsiyonunda artış olduğu görülmektedir (Çizelge 4.6). Bakır stresine yanıtta ise bu mutant suşta *GPD1* transkripsiyonunun yaklaşık 2 kat azaldığı bulundu (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Transkripsiyon faktörü Aft1'in biyometal iyonu stresinde *GPD1*'de transkripsiyona etkileri.

Biyometal iyonu	β -Galaktozidaz Aktiviteleri* $\pm$ SD
Normal ortam	2149 $\pm$ 191
+100 mM Ca ⁺²	4053 $\pm$ 205
+1 mM Cu ⁺²	824 $\pm$ 25
+1 mM Fe ⁺³	3301 $\pm$ 112

* β -Galaktozidaz aktiviteleri nmol ONPG/dakika/mg protein olarak verilmiştir.
 $\pm$ SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir.

4. 5. Yap5p'nin Biyometal Stresinde *GPD1* Transkripsiyonuna Etkileri

Transkripsiyon faktörü Yap5p stresle aktive edilen faktör olup demir iyonlarına yanıtta bazı genlerin aktivasyonu için gereklidir (Li ve ark. 2008). *S. cerevisiae*'da sitoplazmik demir iyonlarının vakuol'e taşınmasını sağlayan *CCC1* geni aktivasyonunu da sağlar (Li ve ark. 2008). Araştırmamızda Yap5'nin biyometal iyonu stresine yanıt olarak *GPD1* geni transkripsiyonuna etki edip etmediği de $\Delta yap5$ mutant *S. cerevisiae* suşu kullanılarak incelendi. Bu mutant suşta normal ortamda üretilen *GPD1*'de bazal transkripsiyone seviyesinin yaban tip suşa oranla artış gösterdiği görülmektedir. Biyometal iyonları kalsiyum ve demir stresi uygulandığında $\Delta yap5$ mutant suşunda yaklaşık 2 kat artış meydana geldiği görüldü (Çizelge 4.7). Bakır stresi uygulanan mutants suşta ise *GPD1* transkripsiyonunda azalma olduğu bulundu. Bu sonuçlar Yap5p'nin biyometal iyonları stresine yaban tip suşa benzer şekilde yanıt verdiğini göstermektedir.

Çizelge 4.7. Transkripsiyon faktörü yAP5p'nin biyometal iyonu stresinde *GPD1*'de transkripsiyona etkileri.

Biyometal iyonu	β -Galaktozidaz Aktiviteleri* $\pm$ SD
Normal ortam	2766 $\pm$ 290
+100 mM Ca ⁺²	5130 $\pm$ 176
+1 mM Cu ⁺²	2052 $\pm$ 26
+1 mM Fe ⁺³	4515 $\pm$ 230

* β -Galaktozidaz aktiviteleri nmol ONPG/dakika/mg protein olarak verilmiştir.
 $\pm$ SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir.

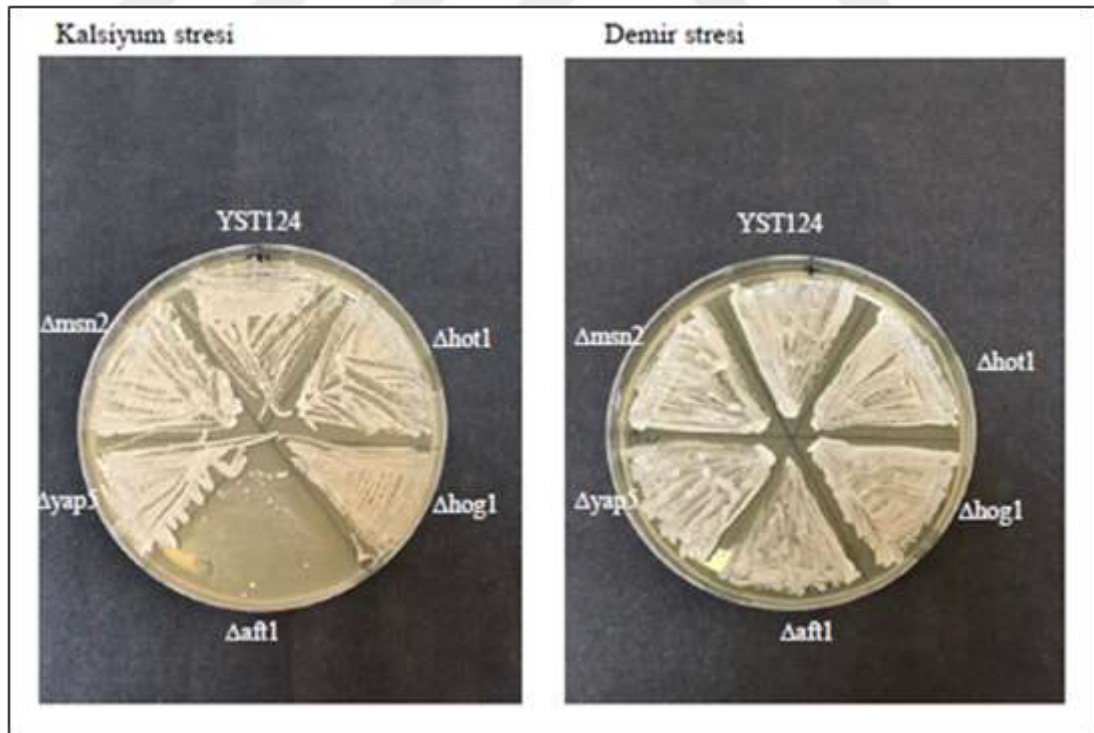
4. 6. Biyometal İyonları Stresinin Hücre Fenotipine ve Üremeye Etkileri

Bu araştırmada incelenen biyometal iyonlarının hücre morfolojilerine etkileri direkt olarak ışık mikroskobunda incelendi ve normal ortamda üreyen maya hücreleri ile karşılaştırıldı. Biyometal iyonlarının üremeye etkileri ise kalitatif olarak metal iyonlarını içeren petrilere tayin edildi.

Farklı biyometal iyonlarını sıvı kültürlerde uygulanan konsantrasyonlarda içeren tam besiyeri (YPD) ortamına ekilen yaban tip ve mutant maya suşlarının biyometal iyonlarına karşı olan duyarlılıklarında da farklılıklar görüldü. Sodyum stresi uygulanan üreme ortamında $\Delta hog1$ ve $\Delta aft1$ mutantlarında üreme olmadığı görüldü (Şekil 4.1). Hog1p'nin sodyum stresine yanıt için gerekli olduğu bilindiğinden 400 mM sodyum içeren ortamda $\Delta hog1$ mutant suşunda beklendiği şekilde üreme olmadığı görülmektedir. Ancak bu üreme ortamında $\Delta aft1$ mutant suşunda da üreme olmaması beklenmeyen bir sonuçtur. Araştırmada kullanılan mutant maya suşlarının demir stresi uygulanan ortamda üreme durumlarının etkilenmediği herbirinin normal yaban tip maya seviyesinde üreme gösterdikleri bulundu (Şekil 4.2).

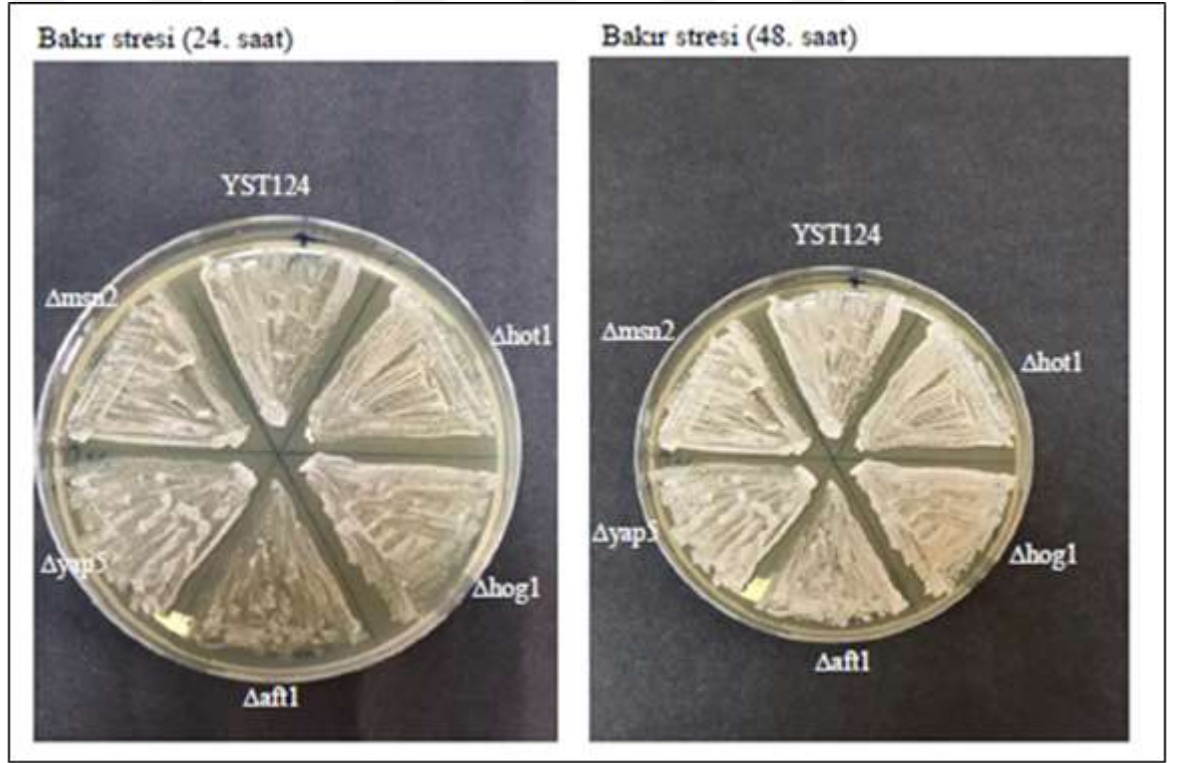


Şekil 4.1. Sodyum stresinin farklı maya suşlarının üremesine etkileri.



Şekil 4.2. Kalsiyum ve demir stresinin farklı maya suşlarında üremeye etkileri.

Kalsiyum stresine karşı da sadece $\Delta aft1$ mutant suşunda üreme görölmedi. Bu durum Aft1p'nin sadece demir iyonu taşınımı ve hücrel dengesi için değil kalsiyum ve sodyum iyonlarının oluşturduğu strese yanıt için de işlevleri olabileceğini öne sürmektedir. Sıvı kültür ortamında *GPD1* transkripsiyonunun en çok etkilendiği bakır iyonu stresine karşı da araştırmada kullanılan maya suşlarında üreme durumlarına önemli bir etkisinin olmadığı bulundu. Ancak $\Delta aft1$ mutant suşunda 24 saatlik inkübasyon sonucu üreme yaban tip suşa göre yavaş ve yetersiz durumda iken 48. saat sonunda bu mutants suşta da bakır stresinin üremeye etkisi olmadığı görüldü (Çizelge 4.3).

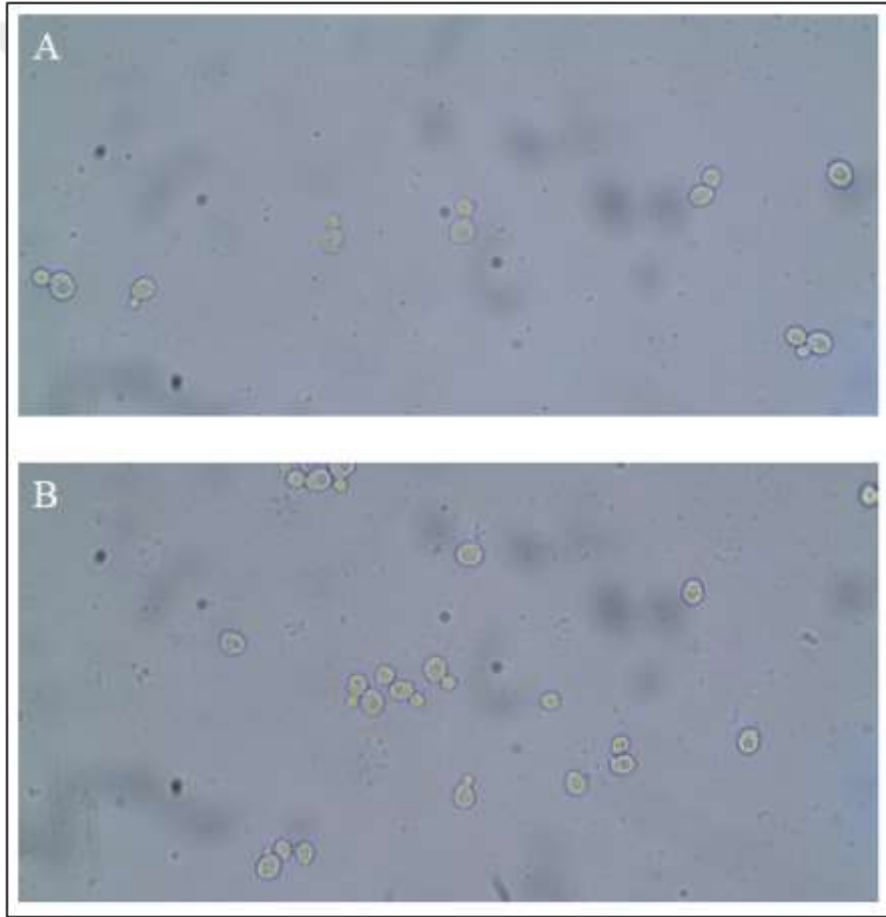


Şekil 4.3. Farklı maya suşlarında bakır stresinin üremeye etkileri.

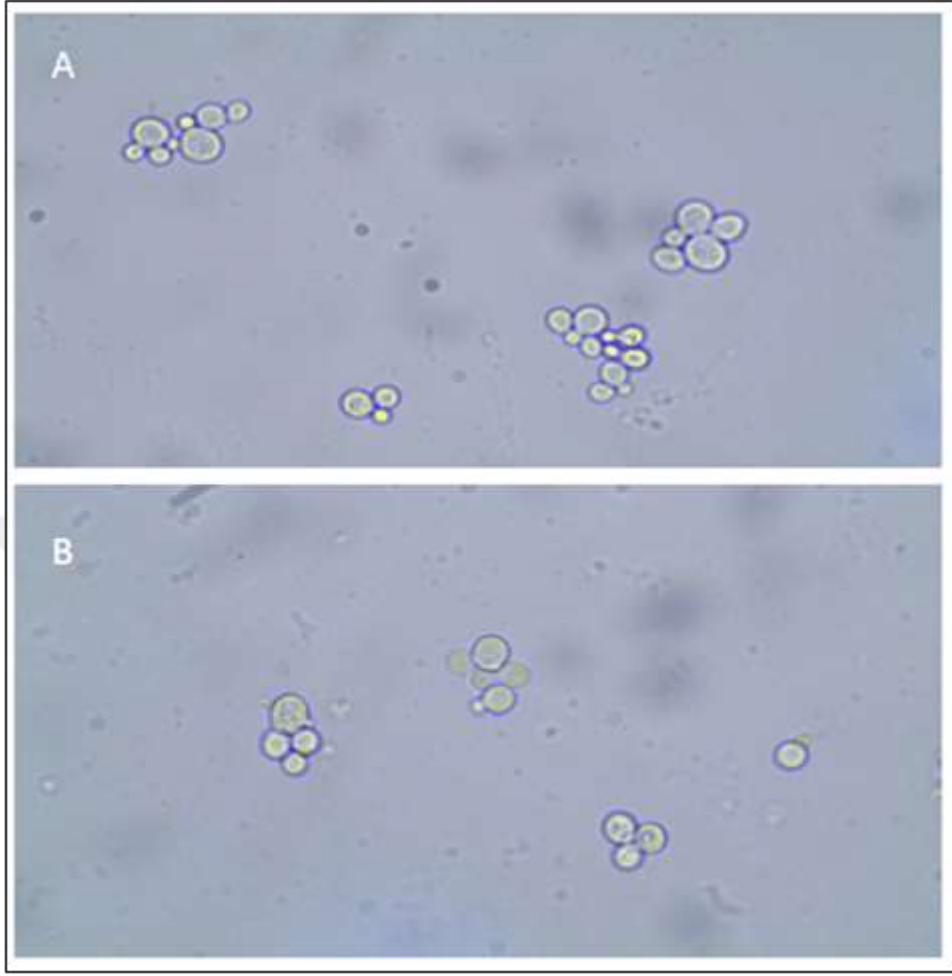
Araştırmamızda incelenen biyometal iyonlarının hücre morfolojilerine olan etkileri de mikroskopik olarak incelendi. Ancak tez araştırmasının bu aşaması için sıvı kültür ortamında *GPD1* transkripsiyonunun en fazla etkilendiği mutant suş olan $\Delta hog1$ mutant

suşunun fenotipik özellikleri için yaban tip hücre morfolojileri ile karşılaştırmalı olarak inceleme yapıldı.

Biyometal iyonlarının hücre morfolojisine etkilerinin incelenmesinde bu metal iyonlarının hücre büyüklükleri ve tomurcuklanma durumuna etkileri dikkate alındı. Kalsiyum stresinin normal hücrede araştırmada kullanılan inceleme koşullarında hücre morfolojine önemli bir etkisi görülmedi (Şekil 4.4). Kalsiyum stresi uygulanan hücrelerde tomurcuklanmamış hücre sayılarının daha fazla olduğu dikkat çekmektedir. Ancak bakır ve demir iyon stresinin maya hücrelerinde hücre büyüklüklerinde önemli artışa neden olduğu ve anormal tomurcuklanmaya neden olduğu görüldü (Şekil 4.5)



Şekil 4.4. Kalsiyumun yaban tip hücrede morfolojik etkisi. A panelinde normal üreme ortamı, B panelinde ise kalsiyum stresi uygulanmış ortamdaki hücre şekilleri görülmektedir.



Şekil 4.5. Bakır ve demir iyon stresinin yaban tip hücrede morfolojik etkisi. A panelinde bakır stresi uygulanmış üreme ortamı, B panelinde ise demir stresi uygulanmış ortamdaki hücre şekilleri görülmektedir.

Elde edilen sonuçlar özellikle demir ve bakır iyon stresinin maya hücrelerinde hücre büyüklüklerinde artışa ve bölünme şeklinde anomaliye yol açabildiğini göstermektedir. Bakır stresinde bazı hücrelerde G1 aşaması tamamlanmadan yani hücreler belirli bir büyüklüğe erişmeden tomurcuklanma yani S fazının başladığı da görülmektedir (Şekil 4.5 A paneli). Farklı bir anomali olarak yine bakır stresi uygulanmış hücrelerde bir S fazı tamamlanmadan aynı ana hücrede ikinci bir S fazı (tomurcuklanma) olduğu da görülmektedir (Şekil 4.5).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Biyometal iyonları bütün organizmalar için büyüme ve gelişme için gereklidir. Bu iyonların hücre içine taşınması ve hücredeki konsantrasyonlarının da sıkı şekilde kontrol edilmeleri gerekir. Kadmiyum, krom gibi bazı toksik metal iyonlarının düşük seviyede (sub-letal) hücreye uygulanması ile maya hücrelerinde genlerin %22'sinde (6000 maya geninden 1320 tanesinde) transkripsiyon seviyesinde en az iki kat değişiklik olduğu daha önce gösterilmiştir (Jin ve ark. 2008). Toksik metal iyonlarına karşı maya hücrelerinde çeşitli detoksifikasyon mekanizmaları geliştirilmiştir. Ancak hücre metabolizması için hücreye alınması gereken biyometal iyonlarının da konsantrasyonlarının belirli aralıklarda olması gerekir. Bu durum *S. cerevisiae*'da biyometal iyonlarının hücreye taşınımı ve hücre içinde farklı organellerde (Vakuol ve mitokondri gibi) belirli konsantrasyonlarda depolanması ile sağlanır (Cyert ve Philpott 2013). Bu araştırmada bazı biyometal iyonlarının (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Na^{+}) *S. cerevisiae*'da hücresel etkileri ve *GPD1* geni transkripsiyonuna etkileri araştırıldı. Araştırmada kullanılan biyometal iyonları daha önceden tanımlanan konsantrasyonda petrilerde veya sıvı kültürde üretilen maya hücrelerine uygulandı (Schmidt ve ark. 2009).

Araştırmamızda öncelikle yaban tip laboratuvar suşu olarak kullanılan *S. cerevisiae* hücrelerinde verilen biyometal iyonlarının *GPD1* geni transkripsiyonuna etkileri incelendi. Bu incelemede *GPD1* geni promotor bölgesini içeren *GPD1-LacZ* raportör gen füzyonu kullanıldı. Bu gen füzyonunda transkripsiyonel aktivasyonun normal *GPD1* geninde olduğu gibi kontrol edildiği daha önce yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Rep ve ark. 2000). Logaritmik aşamada glukoz baskılaması olan koşullarda üretilen *S. cerevisiae* hücrelerinde uygulanan biyometal iyonu stresi koşullarında *GPD1* transkripsiyonunun iyon çeşidine göre değişmekle birlikte 2-4 kat aktive edildiği bulundu. En yüksek aktivasyonun ise sodyum iyonları ile sağlandığı görüldü. Sodyum'un ozmotik stres yolağını aktive ederek *GPD1* transkripsiyonunu aktive ettiği daha önceden gösterilmiştir (Eriksson ve ark. 1995). *GPD1* transkripsiyonunun sodyum iyon stresi ile aktivasyonu araştırmamızda pozitif kontrol olarak da değerlendirilebilir. Demir, bakır ve özellikle kalsiyum stresine yanıt olarak

GPD1 transkripsiyonunun 2-3 kat aktive edilmesi bu genin transkripsiyonunun biyometal iyonlarına yanıt olarak da kontrol edildiğini göstermektedir. *GPD1* geni transkripsiyonu aynı zamanda glukoz baskılaması ile de kontrol edilmektedir. Diğer ifade ile yüksek glukoz konsantrasyonlarında transkripsiyonu daha düşük seviyede, düşük glukoz konsantrasyonlarında ise transkripsiyonu daha fazla gerçekleştirmektedir. Biyometal iyonlarının glukoz baskılamasının olmadığı koşullarda (üreme ortamında +0.1 glukoz varlığında) *GPD1* transkripsiyonuna etkileri de incelendi. Elde edilen sonuçlarda biyometal iyonlarının glukoz baskılamasının olmadığı koşullarda aktive edilmiş *GPD1* transkripsiyonuna çok fazla etkisi olmadığını gösterdi (Çizelge 4.1 ve 4.2). Ancak buna rağmen sodyum ve kalsiyum stresinin glukoz baskılamasının olmadığı koşullarda da *GPD1* transkripsiyonuna düşük seviyede de olsa etkilerinin olduğu görüldü. Bakır iyonlarının ise glukoz baskılamasının olmadığı koşullarda *GPD1* transkripsiyonunun aktivasyonu engellediği ortaya konuldu. Biyometal iyonlarının olmadığı koşullarda 1618 üniteden 3492 üniteye çıkan *GPD1* transkripsiyonunun ortamda bakır iyonu bulunduğunda derepres koşullarda transkripsiyonun aktive edilemediği bulundu (Çizelge 4.2). Bu durum bakır iyonlarına bağlı olarak glukoz derepressed koşullarda *GPD1* transkripsiyonun baskılandığını göstermektedir. Bakır iyonları ile aktive edilen transkripsiyon faktörlerinden bir veya birkaçının (örneğin yAP grubu faktörler) *GPD1* transkripsiyonunu derepres koşullarda baskılıyor olabilir (Çizelge 4.2).

Araştırmada uygulanan biyometallerden *GPD1* transkripsiyonuna en yüksek etkisi olan kalsiyum ve sodyumdur. Araştırmada uygulanan biyometal iyonu stresinin *GPD1* transkripsiyonuna etkilerinin kümülatif veya sinerjistik olup olmadığını da test etmek için bu metal iyonları *S. cerevisiae* suşuna ikili kombinasyonlar olarak da uygulandı. Kalsiyumla birlikte uygulanan demir, bakır ve sodyum iyonlarının herhangi bir kümülatif etkilerinin olmadığı görüldü (Çizelge 4.3). Bu durum incelenen biyometal iyonlarının farklı yollar üzerinden değil ortak bir faktör üzerinden etki ettiğini göstermektedir.

Biyometal iyonlarının hangi transkripsiyon faktörleri aracılığı ile *GPD1* transkripsiyonuna etki ettiklerini de analiz etmek için biyometal iyonları ile aktive

edildiği bilinen transkripsiyon faktörlerinin olmadığı mutant maya suşları kullanıldı ve sonuçlar yaban tip maya suşundan elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldı. Genel stres yanıtı transkripsiyonel aktivatörü olduğu bilinen Msn2 faktörünü içermeyen mutant maya suşunda biyometal iyonu stresi uygulanması sonucu *GPD1* transkripsiyonunda kısmen azalma olduğu görüldü. Bu durum biyometal iyonu stresine yanıt olarak gerçekleşen *GPD1* transkripsiyonel aktivasyonunun kısmen Msn2/4'e bağlı olduğunu göstermektedir. Hog1p protein kinaz olup başta sodyum stresi olmak üzere farklı stresler ile aktive edilip hücre döngüsünü kontrol eden protein kinazdır. Araştırmamızda Hog1 kinaz mutantında *GPD1* transkripsiyonunda biyometal iyonlarına bağlı olarak *GPD1* transkripsiyonunda hiçbir aktivasyon olmadığı hatta bakır stresine yanıt olarak en az 2-kat baskılama olduğu bulundu. Bu durum biyometal iyonları stresine yanıt olarak *GPD1* transkripsiyonu aktivasyonunun tamamen Hog1p kinaza bağlı olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.5). Hog1p protein kinaz olarak hücrede farklı transkripsiyon faktörlerini aktive etmektedir. Bu faktörlerden birisi de Hot1p'dir. Hot1p mutant suşunda yapılan çalışmada kalsiyum ve demir iyonlarına bağlı aktivasyonun Hot1p'den bağımsız olduğunu ancak bakır iyonlarına bağlı olan aktivasyonun Hot1p'ye bağlı olduğu görüldü. Çünkü, yaban tip maya suşunda bakır stresi koşullarında 3166 ünite olan *GPD1* transkripsiyonunun Δ hot1 mutant suşunda aktive edilemediği ve 1028 ünite olarak bazal seviyede kaldığı görülmektedir (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.5).

Aft1 transkripsiyon faktörü demir iyonlarının hücreye alınması ile ilgili faktörleri kodlayan genlerin aktivatörüdür. Bu transkripsiyon faktörünü içermeyen Δ aft1 mutant suşunda da *GPD1* transkripsiyonu normal ve biyometal iyonu stresi koşullarında analiz edildi. Kalsiyum stresine bağlı aktivasyonun Aft1 mutasyonundan etkilenmedi ancak bakır stresine bağlı aktivasyonun Aft1p'ye bağlı olduğu görüldü. Demir stresine bağlı aktivasyonun da Aft1 mutasyonundan etkilenmedi görüldü. Bu durum *GPD1* transkripsiyonunun demir stresine bağlı aktivasyonun Aft1p'den bağımsız olarak gerçekleştiğini de göstermektedir. Aynı zamanda bakır stresine bağlı aktivasyonun hem Hot1p ve hem de Aft1p'ye bağlı olduğu görülmektedir (Çizelge 4.6). Bu faktörler eke olarak transkripsiyon faktörü yAP5'in de biyometal iyonlarına bağlı olarak *GPD1* transkripsiyonuna etkileri incelendi. Kalsiyum ve demir stresine bağlı aktivasyonun yAP5'den bağımsız olarak gerçekleştiği ancak bakır stresine yanıtın yAP5'e bağlı

olduğu görüldü (Çizelge 4.7). Yapılan bu incelemeler sonucu özellikle bakır stresine yanıt olarak *GPD1* transkripsiyonunun kontrol edilmesinde Msn2, Hot1p, Aft1p ve Yap5'nin direkt veya dolaylı olarak etkileri olduğu bulundu.

Biyometal iyonlarına bağlı stresin *S. cerevisiae*'da üreme hızı petri testleri ile hücre morfolojilerine olan etkileri ise mikroskopik olarak incelendi. Biyometal iyonlarına bağlı olarak yaban tip maya hücrelerinde (YST124) üreme hızında petrilere herhangi bir önemli fark görülmedi (Şekiller 4.1-4.3). Ancak özellikle Daft1 mutantı maya suşunun kalsiyum ve sodyum stresi uygulanan ortamlarda üremediği bulundu. Bu durum Aft1'in hücre döngüsünü ve bölünmesini kontrol eden faktörlere de etki ettiğini göstermektedir. Beklendiği şekilde Δ hog mutantı maya suşunda sodyum stresi uygulanan ortamda üreme olmadığı bulundu. Ayrıca, Δ aft1 mutant suşunun bakır stresine yanıt olarak başlangıçta (ilk 24 saat) üremesinin gerçekleşmediği ancak daha sonra bu mutant suşun bakır stresine adapte olarak üremesinin gerçekleştiği de görüldü (Şekiller 4.1-4.3). Biyometal stresi uygulanan hücrelerde ise bazı morfolojik anomaliler olduğu görüldü. Demir ve bakır stresi uygulanan hücrelerde normal üreme ortamına göre hücre büyüklüklerinde artış ve çoklu tomurcuklanma gibi fenotipler görüldü (Şekil 4.4-4.5). Özellikle çoklu tomurcuklanma olması bakır stresinin G1 ve S aşamalarında önemli anoliler olduğunu G1 tamamlanmadan tekrar S fazına geçildiği veya aynı hücrede iki kez S fazı oluşumuna yol açtığı şeklinde değerlendirildi. Araştırmada elde edilen sonuçlar *GPD1* geni transkripsiyonunun biyometal iyon çeşidine bağlı olarak farklı transkripsiyon faktörleri ile kontrol edildiğini ve bazı biyometal iyonlarının (örneğin bakır) hücre morfolojisinde anomaliye neden olduğunu göstermiştir.

KAYNAKLAR

Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J.M., Prior, B.A. 1994. *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell. Biol.*, 14: 4135–4144.

Anonim, 2020a. *Saccharomyces cerevisiae* Genome Database (SGD). <https://www.yeastgenome.org> (Eriřim tarihi: 15.12.2020)

Anonim, 2020b. *Saccharomyces cerevisiae*. https://tr.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae (Eriřim tarihi: 15.12.2020)

Anonim, 2020c. YEASTRACT (Yeast Search for Transcriptional Regulators And Consensus Tracking). <http://www.yeasttract.com/> (Eriřim tarihi: 15.12.2020)

Anonim, 2020d. Yeast pathways. <https://pathway.yeastgenome.org/YEAST/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY30-48&detail-level=2> (Eriřim tarihi: 15.12.2020)

Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J.M., Adler, L. 1997. The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J.*, 16: 2179–2187.

Björkqvist, S., Ansell, R., Adler, L., Liden, G. 1997. Physiological response to anaerobicity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:128–132.

Botstein, D., Fink G.R. 2011. Yeast: An experimental organism for 21st Century Biology. *Genetics*, 189: 695–704.

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

Brown, T.A. 2013. Genomlar 3. Ed. Bardakçı, F., Ülger, C. Nobel Akademik yayıncılık Eğitim danışmanlık Tic. LTD.ŞTİ. Türkiye, 705 pp.

Chen, X., Fang, H., Rao, Z., Shen, W., Zhuge, B., Wang, Z., Zhuge, J. 2008. Cloning and characterization of a NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene from *Candida glycerinogenes*, an industrial glycerol producer. *FEMS Yeast Research*, 8: 725–734.

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

Cyert, M.S., Philpott, C.C. 2013. Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 193: 677–713.

Eriksson P., André L, Ansell R, Blomberg A, Adler, L. 1995. Cloning and characterization of GPD2, a second gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in *Saccharomyces cerevisiae*, and its comparison with GPD1. *Mol Microbiol.*, 17 :95-107.

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

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

Fernandez, L., Rodrigues-Pousada, C., Struhl, K. 1997. Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol Cell Biol.*, 17: 6982–6993

Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., Woods, R.A. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11: 355–360.

Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., Fink, G.R. 1993. Characterization of *Saccharomyces Cerevisiae* Pseudohyphal Growth. *Dimorphic Fungi in Biology and Medicine*, 83-103.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Louis, E.J. 1996. Life with 6000 genes. *Science*, 274: 546–567.

Goldman, A., Roy, J., Bodenmiller, B., Wanka, S., ve ark. 2014. The Calcineurin signaling network evolves via conserved kinase–phosphatase modules that transcend substrate identity. *Mol Cell.*, 55: 422–435.

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

Herskowitz, I. 1988. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. rev.*, 52: 536–553.

Hohmann, S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 300–372.

Jin, Y.H., Dunlap, P.E., McBride, S.J., Al-Refai, H., Bushel, P.R., vd. 2008. Global transcriptome and deletome profiles of yeast exposed to transition metals. *PLoS Genet.*, 4(4): e1000053.

Jomova, K., Valko, M. 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283: 65–87.

Jung, S., Marelli, M., Rachubinski, R.A., Goodlett, D.R., Aitchison, J.D. 2010. Dynamic changes in the subcellular distribution of Gpd1p in response to cell stress. *J. Biol. Chem.*, 285: 6739–6749.

Li, L., Bagley, D., Ward, D.M., Kaplan, J. 2008. Yap5 is an iron-responsive transcriptional activator that regulates vacuolar iron storage in yeast. *Mol Cell Biol.*, 28: 1326–1337.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, 193: 265–275.

Martinez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., Estruch, F. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *EMBO J.* 15: 2227–2235.

Merhej, J., Delaveau, T., Guitard, J., Palancade, B. ve ark. 2015. Yap7 is a transcriptional repressor of nitric oxide oxidase in yeasts, which arose from neofunctionalization after whole genome duplication. *Molecular Microbiol.*, 96: 951–972.

Morano, K.A., Grant, C.M., Moye-Rowley, W.S. 2012. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190: 1157-1195.

Nelson, D.L., Cox, M.M. 2013. Biyokimyanın İlkeleri. Ed. Elçin, M., Palme Yayıncılık, Türkiye, 1158pp.

Pokusa, M., Trancikova, A.K. 2017. The central role of biometals maintains Oxidative balance in the context of metabolic and neurodegenerative disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2017, Article ID 8210734.

Rep, M., Krantz, M., Thevelein J.M., Hohmann, S. 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. *J. Biol. Chem.*, 275: 8290–8300.

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

Rivera –Mancía, S., Pérez-Neri, I., Ríos, C., Tristán-López, L., Rivera-Espinosa, L., Montes, S. 2010. The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. *Chem Biol Interact.*, 186: 184–199.

Schmidt, K., Wolfe, K.D., Barbara Stiller, B., Pearce, D.A. 2009. Cd²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ and Se²⁺ toxicity to *Saccharomyces cerevisiae* lacking YPK9p the orthologue of human ATP13A2. *Biochem Biophys Res Comm.*, 383: 198–202.

Stearman, R., Yuan, D.S., Yamaguchi-Iwai, Y., Klausner, R.D., Dancis, A. 1996. A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science*, 271: 1552–1557.

Thewes, S. 2014. Calcineurin-Crz1 signaling in lower eukaryotes. *Eukaryotic Cell*, 13: 694–705.

Valadi, A., Granath, K., Gustafsson, L., Adler, L. 2004. Distinct intracellular localization of Gpd1p and Gpd2p, the two yeast isoforms of NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, explains their different contributions to redox-driven glycerol production. *J. Biol. Chem.*, 279: 39677–39685.

Wysocki, R., Tamas, M. J. 2010. How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *FEMS microbiology reviews*, 34: 925-951.

Xie, J., Ye, J., Cai, Z., Luo, Y., Zhu, X., Deng, Y., ... & Liang, Y. (2020). GPD1 Enhances the Anticancer Effects of Metformin by Synergistically Increasing Total Cellular Glycerol-3-Phosphate. *Cancer Research*, 80(11), 2150–2162.

Yamaguchi-Iwai, Y., Stearman, R., Dancis, A., Klausner, R.D. 1996. Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulon in yeast. *EMBO J.*, 15: 3377–3384.

EKLER

EK 1. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması

EK 2. β - Galaktozidaz Aktivitesi Hesaplanması

EK 3. Metal İyon Çözeltilerinin Hazırlanması



EK 1. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması

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

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

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

Sc-Ura besiyerini hazırlamak için 1.7 gram/litre Yeast Nitrogen Base (YNB), 5 gram/litre Amonyum sülfat distile suda çözülüp, otoklavda steril edildi. Otoklavdan sonra Sc-Ura amino asit karışımı 1 gram/litre olacak şekilde saf suda çözüldü ve 0.45 mm'lik disk filtre ile steril edilerek verilen konsantrasyonlarda besiyerine eklendi.

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

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

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

4: Polietilen Gilikol (%50 PEG)

Polietilen Glikol (PEG) (Molekül ağırlığı: 3350) distile suda %50'lik stok çözelti olarak hazırlanıp, 121°C'de 25 dk otoklavda steril edildi. Maya transformasyonu için kullanıldı.

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

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

6: Lizis Tampon Çözeltisi (Break Buffer)

Lizis Tampon Çözeltisinin (Break Buffer) Bileşenleri:

100 mM Tris. HCl (pH: 8)

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

%20 Gliserol

4 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF).

7: β -Galaktozidaz Tampon Çözeltisi (Z Buffer)

Z Buffer içeriği:

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

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

10 mM KCl,

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

50 mM β -Merkepto-etanol çözeltisi

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

8: Lowry Çözeltileri

I: Lowry A çözeltisi:

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

II: Lowry-B1 çözeltisi:

1 g CuSO_4 , toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile su ile çözülüp, $+4^\circ\text{C}$ 'de depolandı. III: Lowry-B2 çözeltisi:

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

IV: Lowry-C çözeltisi:

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

Lowry-C Çözeltisinin İçeriği:

24,5 ml Lowry A,

250 µl Lowry B1,

250 µl Lowry B2.

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

ONPG (Sigma N1127), en son konsantrasyonu 4 mg/ml olacak şekilde Z-tampon çözeltisi içinde hazırlanıp, +4°C’de saklandı.



EK 2. β - Galaktozidaz aktivitesi hesaplanması

β -Galaktozidaz aktivitesi aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

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

OD₄₂₀: Sarı rengin absorbansı

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

0,0045: ONPG'nin molar absorpsiyon katsayısı

t: β -galaktozidaz reaksiyon süresi (dakika)

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

P: Hücre lizatlarının protein konsantrasyonları (mg/mL)

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

EK 3. Metal İyon Çözeltilerinin Hazırlanması

Biyometal iyonları aşağıda verilen şekilde stok çözeltiler olarak deiyonize saf suda hazırlandı ve 0.45 µm'luk membran filtre ile steril edildi. Metal iyonları bu stok çözeltilerden materyal metod bölümünde verilen son konsantrasyonları sağlayacak şekilde *S. cerevisiae* üreme ortamlarına ilave edildi (Schmidt ve ark. 2009).

a-) Cu²⁺ (CuSO₄. 5H₂O, Formül ağırlığı (FW): 249.69)

Son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde kullanıldı. Stok: 100 mM'dır. 0.745 gr CuSO₄. 5H₂O, 25 mL dH₂O'da çözüldü. Bu 100 mM'lık stoktan 5 mL'lik kültürler için 50 µL eklendi ve 4 saat inkübe edildi.

b-) Fe³⁺ (Fe₂(SO₄)₃. H₂O, Fw: 399.88)

Son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde kullanıldı. Stok: 50 mM'dır. 0.5 gr Fe₂(SO₄)₃, 25 mL dH₂O'da çözüldü. Bu 50 mM stoktan 5 mL'lik kültürlerle 100 µL eklendi.

c-) Zn²⁺ (ZnCl₂, FW: 136.3)

Son konsantrasyonu 4.4 mM olacak şekilde kullanıldı. Stok: 100 mM'dır. Stok Zn çözeltisi hazırlamak için 0.34 gr ZnCl₂ 25 mL dH₂O'da çözüldü. Bu 100 mM'lık stoktan 5 mL'lik kültürlerle 220 µL eklendi ve standart şartlarda 4 saat beklendi.

d-) Ca²⁺ (CaCl₂, FW: 147.02)

Son konsantrasyonu 100 mM olarak kullanıldı. Stok: 2 M'dır. 2 M stok hazırlamak için 7.35 gr CaCl₂, 25 mL dH₂O'da çözüldü. Bu 2 M stoktan 5 mL'lik kültürlerle 250 µL eklendi ve 4 saat beklendi.

e-) Na²⁺ (NaCl, FW: 58.5)

Son konsantrasyonu 400 mM olarak kullanıldı. Stok: 4 M'dır. 4 M stok hazırlamak için 11,7 gr NaCl, 50 mL dH₂O'da çözüldü. Bu 4 M stoktan 5 mL'lik kültürlerle 500 µL eklendi ve 4 saat beklendi.