



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

Schizosaccharomyces pombe'DE DEMİR STRESİ ALTINDA GHT5
HEKSOZ TAŞIYICISININ İŞLEVSEL ANALİZİ

Sevim Nur AKYÜZ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Bedia PALABIYIK

II. DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Ahmed S. I. ALY

Temmuz, 2021

İSTANBUL

Bu alışma, 6.07.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Bedia PALABIYIK(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Çağatay TARHAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Hızlan Hıncal AĞUŐ
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversite
Fen-Edebiyat Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

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.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 34860 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, her daim yardım ve desteklerini gördüğüm çok değerli danışman hocalarım Prof. Dr. Bedia PALABIYIK'a ve Dr. Öğr. Üyesi Ahmed ALY'e,

Çalışmalarım sırasında bilgi ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Araş. Gör. Ümit KINA, Araş. Gör. Merve YILMAZER, Araş. Gör. Burcu KARTAL ve Araş. Gör. İlkay CİVELEK'e,

Maddi ve manevi desteklerini her zaman gördüğüm sevgili aileme teşekkür ederim.

Haziran 2021

Sevim Nur AKYÜZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xii
ÖZET	xiv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3
2.2. GLUKOZUN HÜCRE İÇİNE TAŞINMASI.....	5
2.2.1. Heksoz Taşıyıcıları.....	5
2.3. <i>S. pombe</i> 'DE DEMİR METABOLİZMASI	7
2.3.1. <i>S. pombe</i> 'de Yüksek Afiniteli Demirin Taşınımı	8
2.3.2. <i>S. pombe</i> 'de Vakuolar Demir Transportu.....	9
2.3.3. <i>S. pombe</i> 'de Demir Alımının Düzenlenmesi.....	9
2.3.3.1. <i>Demir Bolluğunda;</i>	9
2.3.3.1. <i>Demir Açlığında;</i>	10
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	12
3.1. ORGANİZMALAR, GEN VE PLAZMİDLER	13
3.2. ORGANİZMALARIN ÜRETİMİ VE SAKLANMASI.....	16
3.2.1. <i>S. pombe</i> Irklarının Üretimi ve Saklanması.....	16
3.2.2. <i>E. coli XL10-Gold</i> Suşunun Üretimi ve Saklanması	17
3.3. GENETİK ANALİZLER	17
3.3.1. <i>S. pombe</i> 'den Genomik DNA İzolasyonu	17
3.3.2. DNA'nın Spektrofotometrik ve Elektroforetik Analizi.....	18
3.3.3. <i>S. pombe</i> 'de ght5 Dizilerinin PZR ile Çoğaltılması	19
3.3.4. Plazmidlerin Kesimi	20
3.3.5. PZR Ürünlerinin Kesimi.....	21
3.3.6. Kesim Ürünlerinin Geri Kazanımı	22

3.3.7. Plazmid ve PZR Ürünlerinin Ligasyonu	22
3.3.8. pSLF172, pSLF173 Plazmidleri ile SA01, SA02 ve SA03 Rekombinant Plazmidlerinin <i>E. coli</i> 'ye Transformasyonu, Geri Kazanımı ve Restriksiyon Endonükleazlar ile Kontrolü.....	23
3.3.9. Rekombinant Vektörlerin Dizi Analizi ile Kontrolleri.....	25
3.3.10. SA01, SA02 ve SA03 Rekombinant Plazmidlerinin <i>S. pombe</i> Parental (ED666) Irkına Transformasyonu.....	25
3.3.11. Rekombinant Transformant Kolonilerin Kontrol Edilmesi.....	28
3.4. FİZYOLOJİK ANALİZLER	29
3.4.1. <i>S. pombe</i> Irklarının Üreme Eğrilerinin Oluşturulması	29
3.4.2. Demir Stresi Uygulaması	30
3.4.3. SA03 <i>S. Pombe</i> Transformant Irkına Western Blot Analizi İçin Demir Stresi Uygulaması	31
3.5. PROTEİN ANALİZLERİ	32
3.5.1. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini.....	32
3.5.2. Proteinlerin Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ile Görüntülenmesi.....	34
3.5.3. Western Blot.....	36
4. BULGULAR.....	39
4.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN IRKLARIN ÜREME ÖZELLİKLERİ	39
4.2. <i>S. pombe</i> GHT5 GENİNİN PSLF172 VE PSLF173 EKSPRESYON VEKTÖRLERİNE KLONLANMASI	39
4.2.1. <i>S. pombe</i> 'de İnsört 1, İnsört 2 ve İnsört 3 Dizilerinin PZR ile Çoğaltılması	39
4.2.2. pSLF172, pSLF173 Plazmidlerinin ve PZR Ürünlerinin Kesimi	40
4.2.3. Plazmidler ile PZR Ürünlerinin Ligasyonu ve <i>E.coli</i> XL10-Gold'a Transformasyonu	41
4.2.4. Rekombinant Plazmidlerin Dizi Analizleri	42
4.2.5. SA01, SA02 ve SA03 Rekombinant Plazmidlerinin <i>S. pombe</i> Parental (ED666) Irkına Transformasyonu.....	45
4.3. REKOMBİNANT KLONLARIN ANALİZİ.....	46
4.3.1. Rekombinant Klonların Genetik Kontrolleri.....	46
4.3.2. Rekombinant Transformant Kolonilerinin Koloni PCR ile Kontrol Edilmesi.....	46
4.4.3. Rekombinant Klonların Belirlenen Üreme Özellikleri.....	48
4.4. REKOMBİNANT VEKTÖR İÇEREN <i>S. POMBE</i> IRKLARINA DEMİR STRESİ UYGULANMASI	49
4.4.1. Demir Stresi Uygulanan <i>S. pombe</i> Rekombinant Irklarının Üreme Grafikleri	49

4.4.2. <i>S. pombe</i> Rekombinant Irklarında Demirin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MIC) Belirlenmesi.....	52
4.5. PROTEİN İZOLASYONU SONUÇLARI	53
4.5.1. Protein Miktarları ve SDS PAGE Sonucu.....	53
4.5.2. Western Blot Sonucu	56
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	58
KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ	68



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: <i>S. pombe</i> 'de yaşam döngüsü (Kaufer ve Gutz, 2016).....	4
Şekil 2.2: <i>S. pombe</i> 'de düşük demir konsantrasyonu koşullarında ferrikrom biyosentezi (Mercier ve Labbe, 2010).	8
Şekil 2.3: Bol demir koşulu altında, <i>S. pombe</i> 'de gen ifadelerinin düzenlenmesi (Labbe ve diğ., 2013).	10
Şekil 2.4: Demir azlığı durumunda, <i>S. pombe</i> 'de gen ifadelerinin düzenlenmesi (Labbe ve diğ., 2013).	11
Şekil 3.1: Çalışmanın şematik gösterimi.	12
Şekil 3.2: Çalışmada kullanılan pSLF173 plazmidinin restriksiyon kesim haritası.	14
Şekil 3.3: Çalışmada kullanılan pSLF172 plazmidinin restriksiyon kesim haritası.	14
Şekil 3.4: <i>ght5</i> geninin nükleotid dizisi.	15
Şekil 3.5: Çalışmada kullanılan “Marker” DNA.	19
Şekil 3.6: Demir stresi uygulamasının şematik gösterimi.	30
Şekil 3.7: SA03 <i>S. pombe</i> ırkına western blot analizi için demir stresi uygulamasının şematik gösterimi.	32
Şekil 3.8: Proteinlerin jelden membrana aktarılması için sandviç yapısının oluşturulması.	37
Şekil 4.1: İnsört 1, insört 2 ve insört 3 dizilerinin %1’lik agaroz jeldeki görüntüleri.	40
Şekil 4.2: pSLF172 ve pSLF173 plazmidlerinin <i>EcorI</i> ile kontrol kesimi	40
Şekil 4.3: Rekombinant plazmitlerin <i>E. coli</i> 'ye transformasyonu sonucu elde edilen koloniler.	41
Şekil 4.4: Rekombinant plazmidlerin endonükleaz enzimleriyle kesim kontrolü.	42
Şekil 4.5: SA01 rekombinant plazmidin <i>nmt1</i> forward primeri ile yapılan dizi okuması.	43
Şekil 4.6: SA01 rekombinant plazmidin <i>nmt1</i> revers primeri ile yapılan dizi okuması.	43
Şekil 4.7: SA02 rekombinant plazmidin <i>nmt1</i> forward primeri ile yapılan dizi okuması.	44

Şekil 4.8: SA02 rekombinant plazmidin <i>nmt1</i> revers primeri ile yapılan dizi okuması.	44
Şekil 4.9: SA03 rekombinant plazmidin <i>nmt1</i> revers primeri ile yapılan dizi okuması.	45
Şekil 4.10: Rekombinant plazmidlerin <i>S. pombe</i> 'ye transformasyonu sonucu oluşan koloniler.....	45
Şekil 4.11: Rekombinant plazmidin (SA01) <i>Schizosaccharomyces pombe</i> 'ye transformasyonu sonucu oluşan kolonilerin <i>ght5</i> Forward ve <i>nmt</i> Revers primerleri kullanılarak koloni PZR ile kontrolü.	47
Şekil 4.12: Rekombinant plazmidlerin <i>S. pombe</i> 'ye transformasyonu sonucu oluşan kolonilerin <i>ght5</i> real time forward ve <i>nmt</i> revers primerleri kullanılarak koloni pzt ile kontrolü.....	48
Şekil 4.13: <i>S. pombe</i> ırklarının %2 glukoz içeren MML besiyerindeki üreme eğrisi grafiği	49
Şekil 4.14: Parental ve rekombinant plazmid içeren <i>S. pombe</i> ırklarının farklı demir konsantrasyonları içeren besiyerlerinde üreme grafikleri (a: %2 glukozlu MML, b: %0,5 glukozlu MML besiyeri).	50
Şekil 4.15: %2 glukoz içeren MML besiyerinde , parental ve rekombinant plazmid içeren <i>S.pombe</i> ırklarındaki demir toksisite değerleri.	52
Şekil 4.16: %0,5 glukoz içeren MML besiyerinde , parental ve rekombinant plazmid içeren <i>S. pombe</i> ırklarındaki demir toksisite değerleri.	53
Şekil 4.17: BSA standart grafiği.	54
Şekil 4.18: Protein örneklerinin SDS PAGE görüntüsü.	55
Şekil 4.19: Protein örneklerinin SDS PAGE görüntüsü (Kit ile).....	56
Şekil 4.20: Western blot sonucu.....	57
Şekil 4.21: SA03 için western blot sonucu.	57

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan <i>S. pombe</i> ve <i>E. coli</i> ırklarının özellikleri.....	13
Tablo 3.2: <i>S. pombe</i> 'nin üretiminde ve kontrolünde kullanılan besi ortamları.	16
Tablo 3.3: <i>E.Coli</i> hücrelerinin üretiminde kullanılan besi ortamı.	17
Tablo 3.4: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve içerikleri.....	18
Tablo 3.5: Hedef genin çoğaltılması için tasarlanan primerler.....	19
Tablo 3.6: Hedef genin çoğaltılması için hazırlanan reaksiyon bileşenleri.....	20
Tablo 3.7: PCR koşulları.	20
Tablo 3.8: Plazmid DNA'sının enzim kesimi için gerekli bileşenler ve miktarları.	21
Tablo 3.9: Plazmidlerin desfosforilasyonu için gerekli bileşenler ve miktarları.....	21
Tablo 3.10: PCR ürünlerinin kesimi için gerekli bileşenler ve miktarları.....	22
Tablo 3.11: Ligasyon için gereken bileşenler ve miktarları.	23
Tablo 3.12: Ligasyon koşulları.	23
Tablo 3.13: Restriksiyon endonükleazı ile plazmid kesimi için gerekli bileşenler ve miktarları.	25
Tablo 3.14: Dizileme için kullanılan primerler.	25
Tablo 3.15: <i>S. pombe</i> transformasyonunda kullanılan çözeltiler.....	26
Tablo 3.16: Koloni PZR'da kullanılan primer dizileri ve oluşan ürün boyutları.	28
Tablo 3.17: Koloni PZR bileşenleri.....	28
Tablo 3.18: Koloni PZR koşulları.	29
Tablo 3.19: Demir stresi için hazırlanan stok solüsyon.....	31
Tablo 3.20: Protein izolasyonunda kullanılan tampon ve içeriği.	33
Tablo 3.21: Manuel SDS-PAGE jel bileşenleri.....	34
Tablo 3.22: Biorad, TGX™ FastCast™ SDS-PAGE jel bileşenleri.	35

Tablo 3.23: SDS-PAGE için kullanılan tamponlar ve bileşenleri.	35
Tablo 3.24: Coomassie boyama için gerekli solüsyonlar ve içerikleri.	36
Tablo 3.25: Western Blot çalışmasında kullanılan primer ve sekonder antikorlar.....	36
Tablo 3.26: Western Blot çalışmasında kullanılan tamponlar ve içerikleri.....	37
Tablo 4.1: Çalışmada kullanılan 972h ⁻ ve parental (EDD666) ırklarının genotipik kontrolleri.	39
Tablo 4.2: Çalışmada kullanılan rekombinant <i>S. pombe</i> ırklarının genotipik kontrolleri.	46
Tablo 4.3: <i>S. pombe</i> ırklarının protein örneklerinin miktarları (Nanodrop).	54
Tablo 4.4: <i>S. pombe</i> ırklarının protein örneklerinin miktarları (Pierce BCA Kit).....	54

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

-	: Eksi, negatif
%	: Yüzde
~	: Yaklaşık
+	: Artı, pozitif
<	: Küçüktür
>	: Büyüktür
°	: Derece
μ	: Mikro
α	: Alfa

Kisaltmalar	Açıklama
-------------	----------

°C	: Santigrat Derece
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
Amp ^r	: ‘‘Ampicillin Resistant Gene’’
bç	: Baz Çifti
BSA	: Sığır Serum Albumin
dH ₂ O	: Distile Su
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
F	: ‘‘Forward’’
g	: Gram
HA	: İnsan influenza hemaglutinini
L	: Litre
LB	: Luria-Bertani
LiAc	: Lityum asetat

M	: Molar
Mb	: Mega baz Çifti
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
ns	: Anlamsız
N-Ucu	: Proteinin Amino ucu
OD	: Optik dansite
P	: P-değeri / “P-value”
pH	: “Potential of hydrogen”
pmol	: Pikomol
PVDF	: Polivinilidin Florür
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R	: “Revers”
sn	: Saniye
TAE	: Tris-EDTA-Asetat
U	: Ünite
UV	: Ultraviole
V	: Volt
YES	: “Yeast Extract with Supplements”

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Schizosaccharomyces pombe'DE DEMİR STRESİ ALTINDA GHT5 HEKSOZ TAŞIYICISININ İŞLEVSEL ANALİZİ

Sevim Nur AKYÜZ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Bedia PALABIYIK

II. Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Ahmed S. I. ALY

Metabolik işlevler için tüm ökaryotlar demir elementine ihtiyaç duyar. Demir, elektron transportu ve birçok enzimatik aktivite için gerekliyken, bazı koşullarda sitotoksik bir etki gösterir. Diğer taraftan, glukoz çoğu organizma tarafından tercih edilen enerji ve karbon kaynağıdır ve biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir sinyal molekülüdür. Glukozun hücre içine alınması heksoz taşıyıcı proteinler ile sağlanır. *Schizosaccharomyces pombe*'de sekiz farklı heksoz taşıyıcı protein (Ght1-8) vardır. Bunlar arasında Ght5, düşük glukoz koşullarında hücre proliferasyonu için gereklidir. Bu çalışmada, *S. pombe*'de demir stresinin algılanması ve sinyalizasyonunda *ght5* geninin işlevi araştırılmıştır. Bu amaçla *ght5* geni pSLF172 ve pSLF173 vektörlerine klonlanarak, elde edilen rekombinant plazmidler (SA01, SA02, SA03) *S. pombe* EDD666 ırkına transforme edildi. Elde edilen SA01 ve SA02 rekombinant plazmidleri ile HA epitopunun, Ght5 proteinin karboksi ya da amino ucunda herhangi bir fark oluşturup oluşturmadığının araştırılması için kullanıldı. Öte yandan SA03 transformant *S. pombe* ırkı, yüksek (%2) ve düşük (%0,5) glukoz koşullarında ve farklı derişimlerde (0, 0.5, 1 ve 2 mM) demir uygulanarak üretildi. Demir stresinin *ght5* geninin anlatım profiline olan etkisi protein düzeyinde western blot yöntemi ile analiz edildi.

Western blot sonuçları ile HA epitopunun Ght5 proteininin karboksi ya da amino ucuna bağlanmasının herhangi bir fark oluşturmadığı, her iki durumda da çalıştığı gözlemlendi. SA03 ırkı için; %0,5 glukoz içeren ortamda, %2 glukoz içeren ortamda üretilene göre daha koyu ve

kalın bir bant gözlemlenmesi yüksek glukoz affiniteli olduğu bilinen *ght5* geninin anlatım profilini doğrulamaktadır. %0,5 glukoz içeren ortamda 1 mM demir içeren koşulda oldukça koyu ve kalın bir bant gözlenirken, 0.5 mM ve 2 mM demir stresinde daha açık bantların gözlemlenmesi, demirin *ght5* geninin anlatımı üzerinde etken olabileceğine işaret etmektedir. Buna ek olarak, %2 glukoz içeren ortamda üretilen SA03 ırkından elde edilen bantlar, %0,5 glukoz ortamındakilere kıyasla daha açık olmakla beraber, artan demir stresine bağlı belirginleşen Ght5-HA protein bantlarının görülmesi, bu tezimizi daha da kuvvetlendirmektedir. Sonuç olarak, SA03 ırkında represe ve dereprese koşullarda değişen demir stresine karşı gözlenen Ght5-HA protein bantlarındaki farklılık, demir stresinin algılanması ve sinyalizasyonunda *ght5* geninin, önemli rol oynadığını düşündürmektedir.

Temmuz 2021, 85 sayfa.

Anahtar kelimeler: Demir stresi, *Schizosaccharomyces pombe*, glukoz metabolizması, heksoz taşıyıcılar, *ght5* geni.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

FUNCTIONAL ANALYSIS OF GHT5 HEXOSE TRANSPORTER UNDER IRON STRESS IN *Schizosaccharomyces pombe*

Sevim Nur AKYÜZ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Bedia PALABIYIK

Co-Supervisor : Assist. Prof. Dr. Ahmed S. I. ALY

All eukaryotes need the element iron for metabolic functions. While iron is essential for electron transport and many enzymatic activities, it exerts a cytotoxic effect under certain conditions. On the other hand, glucose is the preferred energy and carbon source by most organisms and is an important signaling molecule in the regulation of biological processes. The uptake of glucose into the cell is provided by hexose carrier proteins. *Schizosaccharomyces pombe* has eight different hexose transporter proteins (Ght1-8). Among them, Ght5 is essential and sufficient for cell proliferation under low-glucose conditions. In this study, the function of the *ght5* gene in *S. pombe* in sensing and signaling iron stress was investigated. For this purpose, the *ght5* gene was cloned into pSLF172 and pSLF173 vectors and the resulting recombinant plasmids (SA01, SA02, SA03) were transformed into *S. pombe* EDD666 strain. The resulting SA01 and SA02 recombinant plasmids were used to investigate whether the HA epitope made any difference at the carboxy or amino terminus of the Ght5 protein. On the other hand, SA03 transformant *S. pombe* strain was produced under high (2%) and low (0.5%) glucose conditions and by applying iron at different concentrations (0, 0.5, 1 and 2 mM). The effect of iron stress on the expression profile of the *ght5* gene was analyzed at the protein level by western blot method.

It was observed that binding the HA epitope to the amino or carboxy terminus of the Ght5 protein did not make any difference, and the epitope worked in both cases. For SA03 strain; The observation of a darker and thicker band in the medium containing 0.5% glucose than that produced in the medium containing 2% glucose confirms the expression profile of the *ght5* gene, which is known to have high glucose affinity. While a very dark and thick band was observed in the presence of 1 mM iron in the medium containing 0.5% glucose, the observation of lighter bands at 0.5 mM and 2 mM iron stress indicates that iron may be a factor on *ght5* expression. In addition, the bands obtained from SA03 strain grown in 2% glucose media were lighter than those in 0.5% glucose media, but the presence of Ght5-HA protein bands that became evident due to increased iron stress, further strengthens our thesis. In conclusion, the difference in the Ght5-HA protein bands observed in the SA03 strain against changing iron stress in repressed and depressed conditions suggests that the *ght5* gene plays an important role in the detection and signaling of iron stress.

July 2021, 85 pages.

Keywords: Iron stress, *Schizosaccharomyces pombe*, glucose metabolism, hexose transporters, *ght5* gene.

1. GİRİŞ

Ascomycetes mantar sınıfına dahil olan tek hücreli ve ökaryotik fisyon mayası *Schizosaccharomyces pombe*; daha kompleks ökaryotik organizmalarla birden fazla benzer özellik sergilediğinden, ayrıca genetik çaprazlamaların yapılabilmesi, homolog rekombinasyon mekanizmasına sahip olması ve heterolog gen ifadesi çalışmalarında kullanılabilmesi özelliklerinden dolayı önemli bir model organizmadır (Schmidt ve diğ., 2007; Hoffman ve diğ., 2015).

Demir neredeyse bütün ökaryotlarda hayatidir ve temel bir metal elementidir. Elektron indirgeme ve yükseltme özelliğiyle demir; oksijen taşınımı, solunum, DNA replikasyonu gibi birçok reaksiyonun kritik bir bileşenidir (Kaplan, 2009; Hentze, 2010; Cyert, 2013).

Bu özellikleriyle birlikte demir, yüksek miktarlarda bulunduğu reaktif oksijen türlerinin üretilmesine neden olarak, hücrel makromoleküllerde hasara neden olabilir. Toksik oksidanların zararsız hale dönüştürülmesi, transmembran demir transportunun kontrolü ve toksik olmayan formlarda demirin izole edilmesi gibi sistemlerle hücrel demir seviyeleri düzenlenir (Halliwell, 1992; Labbe ve diğ., 2007).

Mayalar sukroz, fruktoz, mannoz, galaktoz gibi karbon kaynaklarını kullanabilse de, temel enerji ve karbon kaynağı diğer ökaryotlardaki gibi glukozdur. Aynı zamanda, hücrel düzeyde bir sinyal molekülü olarak görev alabilen glukoz, çeşitli hücrel süreçlerin düzenlenmesinde etkin bir rol oynar (Özcan ve Johnston, 1999; Rolland ve diğ., 2002).

Glukoz hidrofilik bir molekül olduğundan, hücre zarından taşınarak hücrel sisteme dahil edilmesi için bir taşıyıcıya ihtiyaç duyar (Boles ve Hollenberg, 1997; Özcan ve Johnston, 1999; Uldry ve Thorens, 2004; Manolescu diğ., 2007). *S. pombe* genomunda sekiz farklı heksoz taşıyıcı tanımlanmıştır (Heiland ve diğ., 2000; Pombase database, [http:// www.pombase.org/](http://www.pombase.org/)). Bunlar *ght1*, *ght2*, *ght3*, *ght4*, *ght5*, *ght6*, *ght7* ve *ght8* olarak sıralanır (Saitoh ve diğ., 2014). Her heksoz taşıyıcı glukoz ve/veya ilgili monosakkaritler için farklı bir afiniteye sahiptir. Bunlar arasında, *ght5*, *ght6* ve *ght8*'in yüksek glukoz varlığında anlatımları artarken, düşük glukoz varlığında sadece *ght5*'in anlatımı artmaktadır (Saitoh ve diğ., 2014).

Daha önce İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yapılan çalışmalarda, oksidatif strese karşı, glukoz açlığına bağlı adaptif bir stres yanıtı sergileyen *S. pombe* ird5'de ve kalori kısıtlamasına bağlı olmaksızın daima dirençli olan *S. pombe* ird11'de (Kıg ve diğ., 2005; Palabıyık ve diğ., 2012; Palabıyık ve diğ., 2013; Palabıyık ve diğ., 2014) glukoz varlığına (glukoz baskılama koşulu) rağmen, oksidatif stress altında tüm heksoz taşıyıcı proteinleri şifreleyen genlerinin arasında sadece *ght5* geninin transkripsiyonunun arttığı rapor edilmiştir (Kına ve Palabıyık, 2019).

Aynı zamanda devam eden çalışmalarda, *S. pombe* yabani ırkında demirin heksoz taşıyıcıları üzerindeki etkisi araştırılmış olup, sadece *ght5* geninin transkripsiyonunun glukoz baskılama koşulunda, artan demir dozu ile önemli ölçüde azaldığı gösterilmiş ve ilk defa bu çalışma ile, Ght5 heksoz taşıyıcısının demir stresinin algılanması ve sinyallenmesinde rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Özkan ve diğ., 2019).

Bu tez çalışmasında, demir stresinin algılanması ve sinyalizasyonunda *ght5* geninin işlevinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, *ght5* geni hem 5' ucunda hemde 3' ucunda HA epitopu içeren pSLF173 ve pSLF172 plazmidlerine klonlanarak üç farklı rekombinant plazmid oluşturuldu (SA01, SA02 ve SA03). Rekombinant plazmidlerin *S. pombe*'ye transformasyonunda konak olarak EDD666 hücresi kullanıldı.

İlk olarak, elde edilen SA01 (HA-ght5- pSLF173) ve SA02 (ght5- HA-pSLF172) rekombinant plazmidleri ile HA epitopunun, Ght5 proteinin karboksi ya da amino ucunda olmasının (Ght5-HA ya da HA-Ght5) herhangi bir fark oluşturup oluşturmadığına bakıldı. Bu amaçla elde edilen transformant *S.pombe* ırklarının üretiminde %2 glukoz içeren minimal besi ortamı kullanıldı.

Daha sonra ise SA03 (promotörlü Ght5-HA pSLF172) rekombinant plazmidi *ght5* geninin demir stresinin algılanması ve sinyalizasyonundaki işlevinin araştırılmasında kullanıldı. Bu çalışma için SA03 transformant *S. pombe* ırkı, yüksek (%2) ve düşük (%0,5) glukoz koşullarında ve farklı derişimlerde (0, 0.5, 1 ve 2 mM) demir uygulanarak üretildi.

Demir stresinin, yüksek (%2) ve düşük (%0,5) glukoz koşullarında Ght5 heksoz taşıyıcısı üzerindeki anlatım değışikliklerine olan etkisi, western blot tekniğı ile protein düzeyinde araştırıldı.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. *Schizosaccharomyces pombe*

Fungi aleminin, Ascomycetes ve Basidiomycetes olarak adlandırılan iki ana şubesi vardır. Ascomycetelerin belirgin özelliği, eşey sporların ascus adı verilen bir kese içinde oluşmasıdır. Mayalar her iki gruba da ait olabilirler fakat yaşam biçimleri ve şekerleri fermente etmeleriyle diğer mantarlardan ayrılırlar. *Aspergillus* ve *Neurospora* gibi laboratuvar organizmaları olarak bilinen birçok filamentli mantar ascomycetedir. Makroskopik dünyadaki çoğu mantar ise basidiomycetedir (Hoffman ve diğ., 2015).

Pombe, Swahili dilinde "bira" (veya en bira benzeri fermente edilmiş içecek) anlamına gelir (Hoffman ve diğ., 2015). *S. pombe* meyvelerden, mayalar ve bakterilerle karışık fermantasyon ile üretilen bir çay olan kombuchadan başka, rom ve tekila gibi damıtılmış alkollü içkiler üretmek için kullanılan pekmez gibi farklı doğal kaynaklardan da izole edilmiştir (Gomes ve diğ., 2002).

Fisyon mayası *Schizosaccharomyces pombe*, tomurcuklanan maya *S.cerevisiae* (Goffeau ve diğ., 1996) ve dört çok hücreli organizmadan (*C. elegans* [The C. elegans Sequencing Consortium, 1998], *Drosophila melanogaster* [Adams ve diğ., 2000], *Arabidopsis thaliana* [The Arabidopsis Genome Initiative, 2000], ve *Homo sapiens* [International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Venter ve diğ., 2001]) sonra genomu sekanslanan altıncı ökaryotik organizmadır (Decottignies ve diğ., 2003).

S. pombe 1950'lerden beri kapsamlı bir şekilde incelenmiş ilk olarak 1890'larda tanımlanmıştır (Leupold ve diğ., 1950 ve Mitchson, 1957).

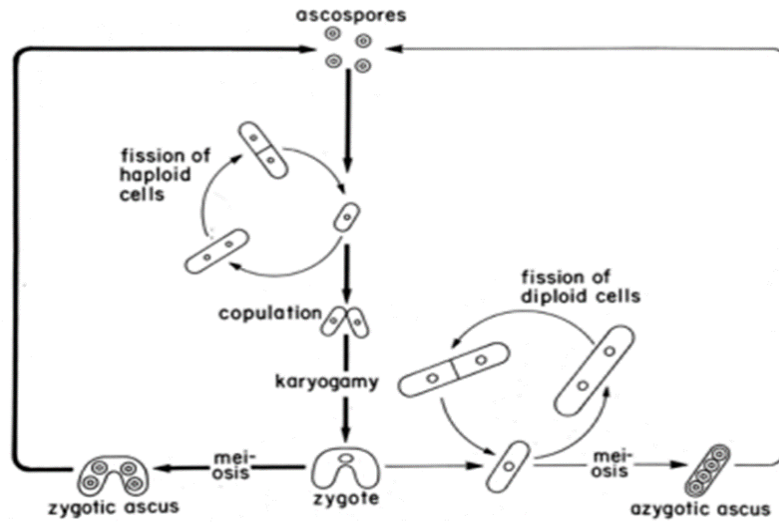
Schizosaccharomyces pombe, 3-4 µm çapında, 7-15 µm uzunluğundadır ve silindir şekline sahiptir (Moreno ve diğ., 1991).

S. pombe'nin genom boyutu 13.8-Mb'tır. 3 büyük kromozomu vardır ve genom büyüklüğü; kromozom I (5.7Mb), II (4.6Mb) ve III (3.5Mb) (Hoffman ve diğ., 2015), ve 20 kb mitokondriyal genom (Lank ve Wolf, 1984) arasında paylaşılır. Kromozomların sentromerleri I, II ve III için sırasıyla 35, 65 ve 110 kb uzunluğunda ve toplam 0.2 Mb'tır (Wood ve diğ., 2002). Ayrıca 5.8S, 18S ve 25S ribozomal RNA genlerini içeren 10.4-kb'lik bir parçanın 100 ±

120 tekrarından oluşan ardışık diziler genomda yaklaşık 1.1 Mb'lık yer kaplar (Schaak ve diğ., 1982).

S. pombe'nin genom dizilemesi sonucu en fazla 4.940 protein kodlayan gen (11 mitokondriyal gen dahil) ve 33 psödogen öngörülürken, gen yoğunluğunun üç kromozom için de benzer olduğu tespit edilmiştir (Wood ve diğ., 2002).

Mayalar haploid veya diploid fazda yaşamlarını sürdürebilirler. Mayalar ve bazı ilkel ökaryotlarda, haploid hücreler koşullara bağlı olarak bölünmeye devam edebilir veya gamet olarak kalabilir. Diploid hücreler, kötü çevresel koşullar ile karşılaşana kadar bölünür ve büyür. Bu koşullarda spor oluşumu tetiklenir. Daha sonra diploid hücre, içinde mayozun meydana geldiği bir askusa dönüşür ve her askus içinde dört haploid spor (askosporlar) üretilir. Askosporlar, askustan salındıktan sonra gelişmeye başlar ve böylece yaşam döngüsünün haploid aşaması yeniden oluşturulur (Clark, 2010).



Şekil 2.1: *S. pombe*'de yaşam döngüsü (Kaufer ve Gutz, 2016).

S. pombe'nin üç eşey tipi $975h^+$ (heterotallik) , $972h^-$ (heterotallik) ve $968h^{90}$ (homotallik)dir. (Kohli ve diğ., 1977). Bunlardan sadece $975h^+$ ve $972h^-$ çiftleşme sırasında diploid bir hücre verecek şekilde birleşirken, $968h^{90}$ ise kendi kendine diploid hücre meydana getirebilir (Egel, 2004).

Ökaryotik ve tek hücreli olan *S. pombe*'nin, haploid ve diploid durumlarda olabilmesi, otonom plazmidleri muhafaza edebilmesi ve aktif homolog rekombinasyon mekanizmasına sahip olması özelliklerden moleküler genetik çalışmalarında yararlanılır (Hoffman ve diğ., 2015).

2.2. GLUKOZUN HÜCRE İÇİNE TAŞINMASI

Şeker metabolizmasıyla ilgili olarak, fisyon mayası *Schizosaccharomyces pombe*'nin tomurcuklanan maya *Saccharomyces cerevisiae* ile ortak özellikleri vardır. Her iki tür de fakültatif aerob olarak büyür ve fazla şeker varlığında aerobik alkollü fermantasyon kullanır (Fietcher ve diğ., 1981; De Jong-Gubbels ve diğ., 1996).

S. pombe hücreleri, monosakkarit D-glukonat (Hoever ve diğ., 1992) üzerinde büyüyebilirken, *S. cerevisiae* hücreleri, D-galaktoz ve sukroz gibi disakkaritleri kullanabilir (De Jong-Gubbels ve diğ., 1996; Fraenkel ve diğ., 1982). *S. cerevisiae*'nin aksine, *S. pombe* etanolü ancak glukoz varlığında kullanabilir (Tsai ve diğ., 1989; Tsai ve diğ., 1992). *S. pombe*'nin karbon metabolizması glioksilat döngüsünü içermez ve ayrıca bazı etanol metabolizması ve glukoneogenez enzimleri yapısal olarak ifade edilmez (Tsai ve diğ., 1989; De jong Gubbles ve diğ., 1996).

Glukoz ökaryotlarda temel karbon ve enerji kaynağıdır. Glukozun alımı ve kullanımı çeşitli enerji tüketen hücresel süreçlerin sürdürülmesi için gereklidir (Özcan ve Johnston, 1999; Uldry ve Thorens, 2004; Manolescu ve diğ., 2007). Glukoz, hücre zarından geçemeyen hidrofilik bir molekül olduğundan, glukozun hücresel sisteme dahil edilmesi için bir taşıyıcı gereklidir (Boles ve Hollenberg, 1997; Özcan ve Johnston, 1999; Uldry ve Thorens, 2004; Manolescu diğ., 2007).

2.2.1. Heksoz Taşıyıcıları

Heksoz taşıyıcıları; Bakteriler, mayalar, bitkiler ve insanlar dahil olmak üzere günümüze kadar çeşitli organizmalar için iyi tanımlanmış hücresel şeker alımına katılan bir protein ailesidir (Heiland ve diğ., 2000). Bu taşıyıcılar, iki protein süper ailesinden biri olan sodyum/çözünen simporter ailesine (SSSF; Reizer ve diğ., 1994) veya başlıca kolaylaştırıcı süper aile (MFS; Marger ve Saier, 1993)'den birine aittir.

HXT proteinleri 12 transmembran taşıyıcısının üst ailesine aittir. Glukoz da dahil olmak üzere heksozların taşınmasına aracılık eden heksoz taşıyıcı proteinleri, membranın sitosolik tarafında hem amino hem de karboksi termini (uç) ile 12 transmembran segmenti içerir (Mueckler ve diğ., 1985; Hresko ve diğ., 1994). Her taşıyıcı protein glukoz ve/veya ilgili monosakkaritler için farklı bir afiniteye sahiptir. Benzer şekilde, tomurcuklanan mayada da, iki tip glukoz taşıyıcısı vardır: Glukoz-sınırlı ortamlarda ifade edilen yüksek afiniteli taşıyıcılar ve glukoz açısından zengin ortamlarda ifade edilen düşük afiniteli taşıyıcılar (Reifenberger ve diğ., 1995; Özcan ve Johnston, 1999; Maier ve diğ., 2002).

Bazı taşıyıcılar ayrıca glukoz dışındaki sakkaritlerin difüzyonunu kolaylaştırır. İnsan Glut2 taşıyıcısı, fruktoz taşınmasının yanı sıra glukoz taşınmasına aracılık eder. Bu nedenle, anlatımları yapılan heksoz taşıyıcılarının türleri ve kombinasyonları, hücrel heksoz alım oranlarını ve heksoz kullanım modlarını belirleyen anahtar bir faktör olabilir. Uygun heksoz alımı için, her taşıyıcının anlatım seviyesi ve aktivitesi, çevresel heksoz konsantrasyonlarındaki değişikliklere ve/veya dokulardaki heksoz için fizyolojik gereksinime göre düzenlenmelidir (Saitoh ve diğ., 2014).

Glukoz taşınmasının yetersiz olduğu *S. pombe* suşu YGS-5 ile birlikte, fasyon mayasının ilk izole edilmiş glukoz taşıyıcısı *ght1* tanımlanmıştır (Milbradt ve Höfer, 1994). Daha sonraki çalışmalarda, *S. pombe* genomunda sekiz farklı heksoz taşıyıcı kodlama bölgesi tanımlanmıştır (Heiland ve diğ., 2000; Pombase database, [http:// www.pombase.org/](http://www.pombase.org/)). Bunlar *ght1*, *ght2*, *ght3*, *ght4*, *ght5*, *ght6*, *ght7* ve *ght8* olarak sıralanır (Saitoh ve diğ., 2014).

Dizilerindeki yüksek benzerliğe rağmen, sekiz taşıyıcı gereksiz olarak işlev görmemektedir. *Ght1* proteini için tercih edilen karbon kaynağı D-Glukoz iken, *Ght3* ve *Ght4* taşıyıcıları için glukonat ve *Ght6* proteini için de D-fruktozdur (Heiland ve diğ., 2000; Saitoh ve diğ., 2014). Yüksek glukoz koşulları altında *ght8*, *ght5* ve *ght6*'nın anlatımları artarken, düşük glukoz koşulları altında sadece *ght5*'in anlatımı artmaktadır. Bu nedenle, *ght5*'in düşük glukoz koşulları altında hücre çoğalması için yeterli ve gerekli olduğu ileri sürülmüştür (Saitoh ve diğ., 2014). *ght7* bir sinyal peptidi taşımadığından, bu genin anlatımı sadece mayotik sporülasyon esnasında yapılır (Mata ve diğ., 2007; Saitoh ve diğ., 2014).

S. pombe'de yüksek glukoz varlığında, transkripsiyonel represör, Scr1, nukleustan sitozole yer değiştirir. Bu süreç, Ca^{2+} / kalmodulin bağımlı kinaz kinaz, Ssp1 ve PP2A / PP6 benzeri protein

fosfatazların Sds23 proteaz inhibitörünün düzenlemesine bağlı olarak gerçekleştirilir. *S. pombe* yabani tip hücreleri, yüksek glukozdan (111 mM, %2) düşük glukoz (4.4 mM, %0.08) aktarıldığında, çoğalmayı geçici olarak durdurur ve daha sonra yüksek glukozda olduğu gibi bölünmeye devam eder (Pluskal ve diğ., 2011; Saitoh ve diğ., 2014). Düşük glukoz koşullarında *S. pombe* hücrelerinin proliferasyonu ve/veya boyut kontrolü için farklı fosfo sinyalizasyon kaskadları kullanıldığı görünmektedir. Birinci kaskad, 2A tipi protein fosfatazların (PP2A'lar) Ppa1 ve Ppa2 ve PP2A-benzeri PP6 fosfataz, Ppel'in Sds23 aracılı down regülasyonunu içerir. Bir diğeri ise, genetik olarak Sds23 ile etkileşime giren Ca^{2+} / kalmoduline bağlı kinaz kinaz (CaMKK), Ssp1'dir. Üçüncü bir kaskad, rapamisin (TOR) kinaz hedefini içeren evrimsel olarak korunmuş bir fosfatidilinositol 3-kinaz benzeri protein kinaz kompleksi olan TORC2'yi içerir (Hanyu ve diğ., 2009; Ikai ve diğ., 2011).

Ght5 geninin transkripsiyonunun baskılanmasında nükleer Scrl'in yer değiştirmesi, Ssp1 / CaMKK gerektirirken, *Ght5* taşıyıcısının sitoplazmadan plazma zarına göçü TORC2 ve Gad8 / Akt sinyalini gerektirir. Her ne kadar hücrelerin hücre dışı glukoz konsantrasyonunu algıladığı araçlar hala bilinmese de, Ssp1 / CaMKK içeren Ca^{2+} sinyal yolunun glukoz algılama mekanizmasında merkezi bir rol oynadığı düşünülüyor. Ssp1 normal olarak sitoplazma boyunca meydana gelse de, hiperosmotik basınç gibi çevresel stresler hemen plazma zarına geçmesine neden olur (Rupes ve diğ., 1999; Freitag ve diğ., 2014).

2.3. *S. pombe*'DE DEMİR METABOLİZMASI

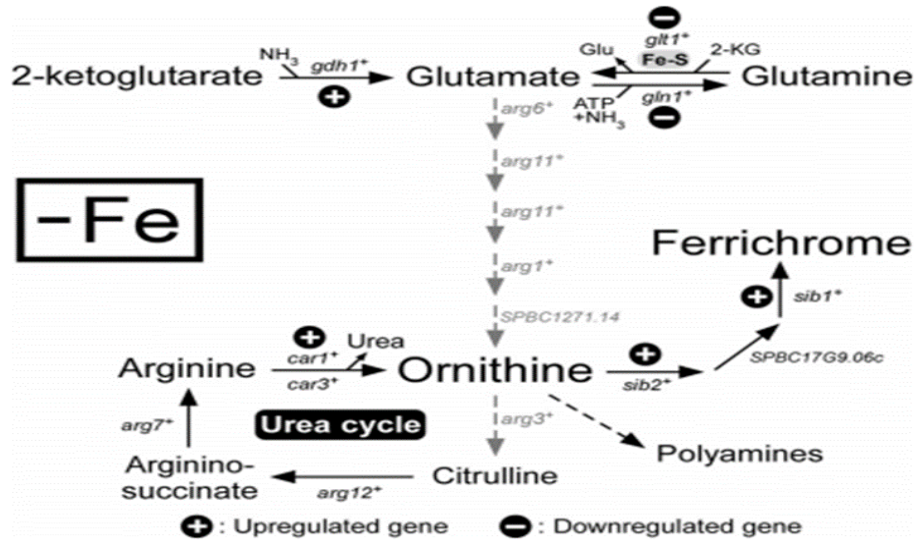
Metabolik işlevler için tüm ökaryotlar demir elementine ihtiyaç duyar. Elektron alma ve verme özelliğiyle demir; oksijenin taşınması, trikarboksilik asit döngüsünün aktivitesi, solunum ve DNA replikasyonu gibi reaksiyonlarda yer alan hayati öneme sahip birçok enzim için, elektron transfer aracı görevi görür (Kaplan ve Kaplan 2009; Hentze ve diğ., 2010; Cyert ve Philpott, 2013). Demiri elektron transportu ve birçok enzimatik aktivite için gerekli kılan özellikler bazı koşullarda sitotoksiteden de sorumlu kılar. Aşırı indirgenmiş demir (Fe^{+2}), hidrojen peroksit ile tepkimeye girebilir (Halliwell ve Gutteridge, 1992). Bunun sonucunda oluşan toksik hidroksil radikalleri ise hücrelerde bulunan şekerler, amino asitler, fosfolipitler, DNA bazları ve organik asitler gibi her tür moleküle zarar verir. Bunun için, demir depolama bileşikler, demir detoksifiye ediciler olarak kabul edilebilir (Schrettl ve diğ., 2004).

Demir, çevrede bol miktarda mevcuttur fakat aerobik ortamlarda meydana gelen oksidasyon reaksiyonları, çözünmeyen ferrik hidroksitlerin oluşumuna yol açtığı için demirin çözünür formu zor bulunur (Schrettl ve diğ., 2004).

Bir organizmanın demiri elde etmek için birçok yolu olsa da hücre içine taşınması sıkı ve düzenleyici bir denetim altında olmalıdır (Labbe ve diğ., 2007).

2.3.1. *S. pombe*'de Yüksek Afiniteli Demirin Taşınımı

Fisyon mayası *S. pombe*'de yüksek afiniteli demir alımı için iki farklı sistem mevcuttur. Stratejilerden biri, ferriredüktaz Frp1'e dayalı indirgeyici bir demir toplama sistemini içerir (Roman ve diğ., 1993). Hücre dışı ferrik demir, Frp1 tarafından ferröz durumuna indirgenir ve indirgenmiş demir, Fio1 ve Fip1'den oluşan bir oksidaz permeaz kompleksi vasıtasıyla plazma membranı boyunca taşınır (Askwith ve Kaplan, 1997). Diğer bir strateji ise, hidroksamat tipi siderofor ferrikromun biyosentezini, birikmesini ve atılmasını kapsar. Esasen demir açlığı sırasında ferri formunda üretilen ve salınan sidereforlar, düşük moleküler kütleli, organik, ferrik demire özgü şelatörlerdir (Schrettl ve diğ., 2004).



Şekil 2.2: *S. pombe*'de düşük demir konsantrasyonu koşullarında ferrikrom biyosentezi (Mercier ve Labbe, 2010).

Bu gözlemler, *S. pombe*'nin ferrikromu bir demir depolama molekülü olarak kullandığını ve ayrıca metabolik ihtiyaca göre demiri çevreden harekete geçirmek için bir demir taşıyıcı sistemi

kullandığını göstermektedir (Labbe ve diğ., 2013). Ferrikrom üretme kabiliyetine uygun olarak, *S. pombe* Str1, Str2 ve Str3 olarak adlandırılan üç hücre yüzey siderofor taşıyıcısına da sahiptir (Pelletier ve diğ., 2003).

2.3.2. *S. pombe*'de Vakuolar Demir Transportu

Demir, bakır ve çinko gibi temel metal iyonlarının mayada vakuollerde depolandığı çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu organeller aynı zamanda homeostatik düzenleme için de önemli bir role sahiptir. Yapılan bazı biyokimyasal ve genetik analizlerin sonucu, vakuollerde depolanan bu metallerin kullanılabilir olduğunu göstermektedir (Labbe ve diğ., 2013).

Vakuolar demir alıcıları her iki mayada da benzer görünse de, vakuolar demir alımında görev alan proteinlerin, *S. cerevisiae*'de Fth1 ve Fet5 proteinlerinin, *S. pombe* 'de homologlarının eksik olması sebebiyle, sürecin farklı olduğu görülmektedir (Pouliot ve diğ., 2010).

Fisyon mayasında, sınırlı demir varlığı koşullarında indüklenen ancak demir bolluğu koşulları altında baskılanan ve ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılarının ABCC alt ailesi ile yüksek sekans homolojisi sergileyen Abc3 adlı vakuolar transmembran proteini tanımlanmıştır (Pouliot ve diğ., 2010; Decottignies ve Goffeau, 1997; Paumi ve diğ., 2008).

S. pombe'de düşük demir konsantrasyonlarına yanıt olarak *abc3*⁺ yüksek oranda indüklenir ve depolanmış demirin vakuolden sitozole hareket ettirilmesini sağlar. Abc3, vakuol membranında sadece düşük demir koşulları altında lokalize olmaktadır (Labbe ve diğ., 2013).

2.3.3. *S. pombe*'de Demir Alımının Düzenlenmesi

S. pombe'deki demir toplama sisteminin özelliklerinden biri, demir gereksinimlerindeki değişikliklere yanıt verme yetenekleridir. Demir kıtlığında, metabolik ihtiyaçları karşılamak için demir alma kapasitesi artarken, demir bol olduğunda, metalin toksik seviyelerde birikmesini önlemek için alım sistemleri baskılanır (Labbe ve diğ., 2007).

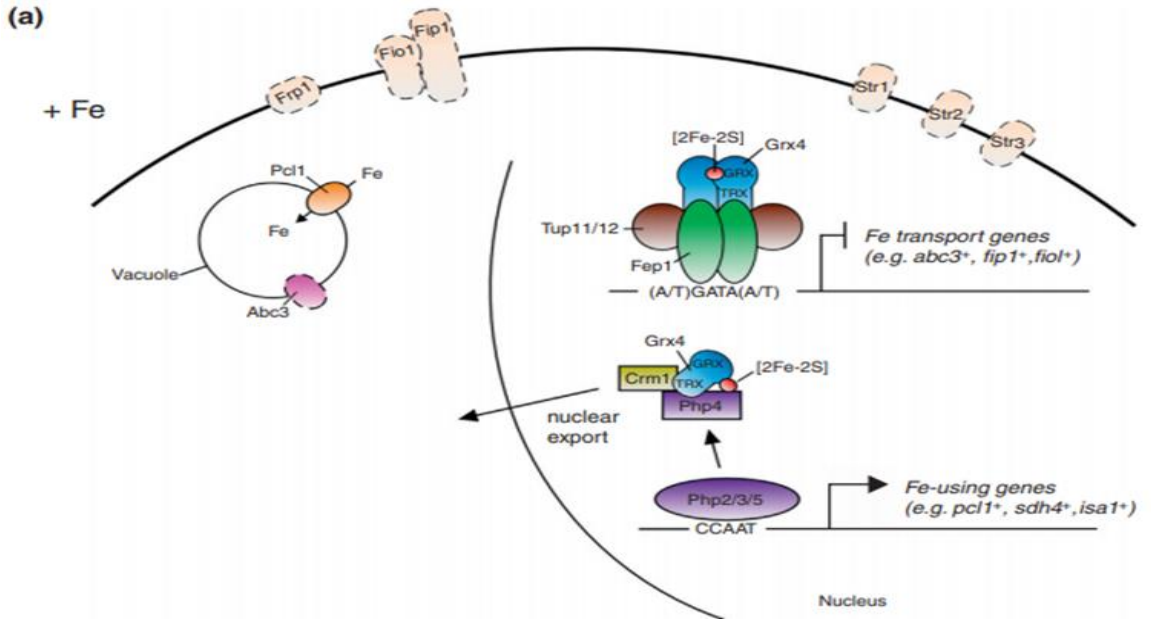
2.3.3.1. *Demir Bolluğunda;*

Hücre dışı demir seviyelerindeki değişikliklere hızlı bir şekilde yanıt verebilmek için demir konsantrasyonlarını kontrol etmek gereklidir ve bu hücreler için kritik bir öneme sahiptir. İndirgenmeden sonra, ferröz demir, plazma membranı multicopper oksidaz Fio1 tarafından ferrik demire oksitlenir ve üretilen ferrik demir daha sonra, demiri plazma zarından geçiren

permeaz olan ikinci bir bileşen, Fip1 tarafından alınır. İlginç bir şekilde, *S. pombe*'nin yüksek demire maruz kalması, yüksek afiniteli demir alım oranında dramatik bir düşüşe neden olur (Askwith ve Kaplan, 1997).

Demir bolluğunda, GATA tipi transkripsiyon faktörü Fep1'in anlatımı arttırılırken indirgeyici olan (*frp1⁺*, *fio1⁺* ve *fip1⁺*), indirgeyici olmayan (*str1⁺*, *str2⁺*, *str3⁺*) ve vakuolar (*abc3⁺*) demir taşıma sistemlerinin ürünlerini kodlayanlar dahil olmak üzere birkaç genin anlatımı baskılanır. Fep1, bu genlerin cis aktive edici elementi olan 5' - (A/T)GATAA - 3' bölgesine bağlanarak ilgili genlerin baskılanmasını sağlar (Pelleetier ve diğ., 2002; Pelleetier ve diğ., 2003).

Fep1'in N-terminal 241-amino asit bölgesi, demire duyarlı genlerin düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığı gösterilen diğer mantar proteinlerinin amino asit bölgelerine oldukça benzerdir (Labbe ve diğ., 2013).



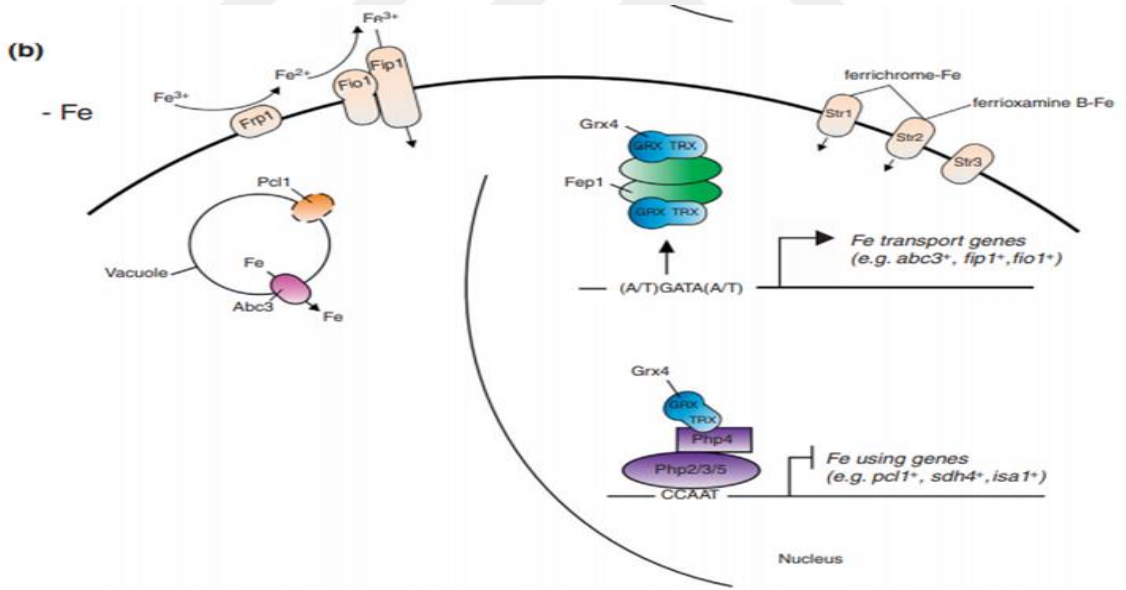
Şekil 2.3: Bol demir koşulu altında, *S. pombe*'de gen ifadelerinin düzenlenmesi (Labbe ve diğ., 2013).

2.3.3.1. Demir Açlığında;

Ortamdaki demir miktarı az olduğunda, organizmalar, bazı düzenleyici sistemler geliştirerek, demiri kullanan proteinleri üreten genlerin ekspresyonunu önler. Küçük RNA'lar kullanan bakterinin veya RNA bağlayan protein kullanan tomurcuklanan maya *S. cerevisiae*'nin aksine, *S. pombe*'deki düzenleme, transkripsiyonel seviyede hareket eden bir heteromerik DNA bağlanma kompleksi aracılığıyla çalışır (Mercier ve diğ., 2006).

Düzenleyici dizinin baz çifti bileşimi ile tutarlı olarak, dört alt birimden (Php2, Php3, Php4 ve Php5) oluşan CCAAT bağlama faktörü, demir açlığına yanıt olarak gen ekspresyonu düzeylerini kontrol etmede anahtar rol oynar. Php2, Php3 ve Php5, DNA bağlama kompleksinin oluşumu için gerekliyken, Php4 doğrudan DNA bağlanmasında yer almaz, ancak DNA'ya getirildiğinde fonksiyonel bir baskılama domeini taşır (Mercier ve diğ., 2006; Mercier ve diğ., 2008).

Php4, CCAAT bağlayıcı faktörün negatif bir düzenleyici alt birimi olarak hareket eder. Php2 / Php3 / Php5 / Php4 kompleksi, hedef gen ekspresyonunu bloke eder. Öte yandan, demir fazlalığı koşulları altında Fep1, *php4*⁺ promotöründeki GATA elemanları ile etkileşime girerek *php4*⁺ gen ekspresyonunu baskılar. *php4*⁺ geninin demire bağlı transkripsiyonel düzenlemesine ek olarak, Php4, translasyon sonrası düzenlemeye de tabi tutulur. Hücreler, düşük demir seviyelerinden yüksek seviyelere geçiş yaptığında, Php4, çekirdekten sitoplazmaya aktarılır (Labbe ve diğ., 2007; Labbe ve diğ., 2013).

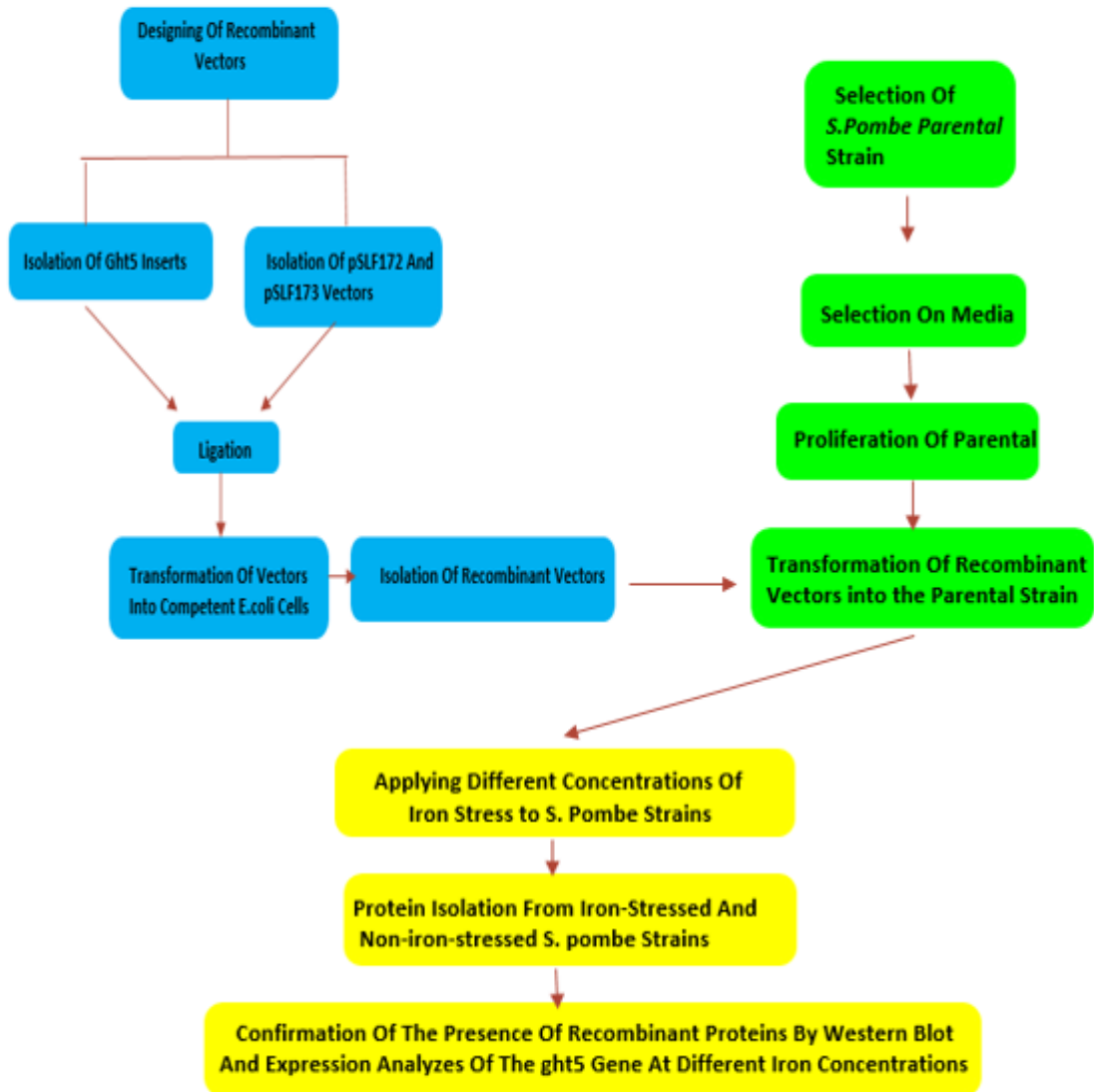


Şekil 2.4: Demir azlığı durumunda, *S. pombe*'de gen ifadelerinin düzenlenmesi (Labbe ve diğ., 2013).

Sonuç olarak, demir konsantrasyonlarındaki değişikliklere verilen bu düzenleyici tepkiler, demirin temel biyokimyasal reaksiyonlar için hücrelerde mevcut olmasını sağlarken, demir veya demir kullanan proteinlerin zararlı seviyelerde birikmesini önler (Labbe ve diğ., 2007).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu yüksek lisans tezi çalışmasında *Schizosaccharomyces pombe* parental ırkına, pSLF172 ve pSLF173 vektörlerine klonlanan SPCC1235.14 (*ght5*) geninin transformasyonu yapıldı. Farklı konsanstrasyonlarda demir stresi uygulanan transformant *S. pombe* ırklarındaki *ght5* geninin ekspresyonuna bakılarak, demir stresinin Ght5 heksoz taşıyıcısı üzerindeki etkisi incelendi. Tez çalışmasının genel akış şeması Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1: Çalışmanın şematik gösterimi.

3.1. ORGANİZMALAR, GEN VE PLAZMİDLER

Bu çalışmada, tek hücreli ökaryotik bir organizma olan *Schizosaccharomyces pombe* linder str. *Liquefaciens*'in yabani tipi (972h⁻) ve parental ırkı (ED666, ade6-M210, ura4-D18, leu1-32) ile *Escherichia coli* XL10 Gold suşu kullanıldı. Çalışmada kullanılan *S. pombe* Linder str. *Liquifaciens* 972h⁻ ve parental (ED666, ade6-M210 ura4-D18 leu1-32) ırkları İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Kültür Koleksiyonu'ndan sağlandı. Irkların özellikleri Tablo 3.1'de verildi.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan *S. pombe* ve *E. coli* ırklarının özellikleri.

İrklar	Özellikleri	Kaynak
<i>S. pombe</i> 972h ⁻	Yabani ırk	İÜ-MBG
<i>S.pombe</i> parental	ED666, ade6-M210 ura4-D18 leu1-32	İÜ-MBG
pSLF173/ Parental	Parental ırkının pSLF173 plazmidile oluşan transformantı	Bu çalışma
SA01	Parental ırkının ght5-pSLF173 plazmidile oluşan transformantı	Bu çalışma
SA02	Parental ırkının ght5-pSLF172 plazmidile oluşan transformantı	Bu çalışma
SA03	Parental ırkının <i>promotorlū</i> ght5-pSLF172 plazmidile oluşan transformantı	Bu çalışma
<i>E.Coli</i> XL10-Gold	TetrD(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]	Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Çalışmada İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü koleksiyonunda bulunan *S. pombe* pSLF172 ve pSLF173 plazmid vektörleri kullanıldı. Bu vektörler, pREP42X plazmidinden köken almıştır (Forsburg ve Sherman, 1996). Plazmidler tiamin biyosentezinde rol alan ve tiamin ile anlatımı baskılanabilen *nmt1* geninin promotör dizisini içermektedir (Maundrell, 1993). Maya seçilimi için ura4⁺ ile *E. coli* seçilimi için ampisilin direnç (Amp^R) genlerine sahiptir. Ek olarak, plazmidlerin çoklu klonlama bölgelerinde raportör gen olarak üç tekrarlı HA epitopu bulunmaktadır. Klonlanan genin rekombinant proteinin amino ucuna HA epitopu eklemek için pSLF173, karboksi ucuna HA epitopunu eklemek için de pSLF172 plazmidleri kullanıldı. pSLF173 ve pSLF172'nin restriksiyon kesim noktalarını içeren plazmid haritaları Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'de verildi.

nükleotidlik kısmın da dahil edildiği dizi, klonlama çalışmalarında insört DNA olarak kullanıldı. Bu dizi ise insört 3 olarak adlandırıldı. İnsört 1 dizisi pSLF173, insört 2 dizisi ise pSLF172 plazmidlerine klonlanarak Ght5'in, sırasıyla amino ve karboksi uçlarına HA epitopu eklendi. İnsört 3 dizisi ise pSLF172 plazmidine, plazmidin *nmt1* promotörü çıkarılarak klonlandı.



Şekil 3.4: *ght5* geninin nükleotid dizisi.

3.2. ORGANİZMALARIN ÜRETİMİ VE SAKLANMASI

3.2.1. *S. pombe* Irklarının Üretimi ve Saklanması

S. pombe ırklarının üretiminde ve saklanması Gutz ve diğ. (1974)'nin önerdiği yöntemler kullanıldı. 972h⁻ ve parental ırkları +4°C'de silika jel (çap:0.2-0.5mm) içerisinde saklanan stoklardan alınarak sırasıyla YEA besi ortamlarını içeren petrilere ekildi. İki gün sonrasında elde edilen kolonilerden azaltma ekim yapıldı ve tek koloni elde edildi. Birer koloni seçilerek eğri YEA besi ortamına ekildi ve 30°C'de 2 gün çoğaltımı yapıldı. Bu örnekler saklanmak üzere 4°C'ye alındı. Çalışmada kullanılan *S. pombe* hücrelerinin üretilmesinde ve kontrolünde kullanılan besi ortamlarının içerikleri Tablo 3.2'de verildi. Tüm besi ortamları otoklavda 121°C'da ve 1.2 atmosfer basınçta 15 dk steril edildi. Katı besi ortamları sterilizasyon sonrası tek kullanımlık steril petrilere dökülerek hazırlandı. Seçici besi ortamı için gerekli metabolitler olan Ade, Ura ve Leu 10 mg/mL olacak şekilde hazırlandı ve 121°C'da ve 1.2 atmosfer basınçta 15 dk steril edildi. Final konsantrasyon 50 mg/L olacak şekilde MMA veya MML besi ortamlarına ilave edildi. Tüm besiyerleri +4°C'de muhafaza edildi.

Tablo 3.2: *S. pombe*'nin üretiminde ve kontrolünde kullanılan besi ortamları.

Besi ortamı	İçerik	Miktar
Maya özütü sıvı besi ortamı (YEL)	Maya özütü Glukoz Distile su	5 g 30 g 1000 mL
Maya özütü katı besi ortamı (YEA)	Maya özütü Glukoz Agar Distile su	5 g 30 g 20 g 1000 mL
Minimal Sıvı Besi Ortamı (MML) ve Minimal Katı Besi Ortamı (MMA)	Yeast Nitrogen Base (YNB) Agar (MMA için) Distile su	6.7 g 20 g 1000 mL

Yeast nitrogen base içerisinde 0.4 µg/mL thiamine HCL bulunmaktadır. Bu oran nmt promotorünün baskılanması için gerekli olan 5 µg/mL (Forsburg ve Sherman, 1997) oranından düşük olduğu için promotorü baskılamada rol almayacağı kabul edilip, çalışma boyunca minimal besi ortamı hazırlamada YNB'nin kullanılması uygun görüldü (Tablo 3.2).

3.2.2. *E. coli* XL10-Gold Suşunun Üretimi ve Saklanması

Çalışmada, rekombinant plazmidlerin seçilim ve üretimi için kullanılan *Escherichia coli* XL10 Gold suşu bakterisinin temini Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde Dr. Aly'nin laboratuvar kültür koleksiyonlarından sağlandı. *E.coli* XL10-Gold hücrelerinin üretilmesinde kullanılan besi ortamlarının içerikleri Tablo 3.3'te verildi.

Tablo 3.3: *E.Coli* hücrelerinin üretiminde kullanılan besi ortamı.

Besi Ortamı	İçerik	Miktar
“Luria-Bertani” sıvı besi ortamı (LB) ve “Luria-Bertani” katı besi ortamı (LBA)	Trypton	2 g
	Maya özütü	1 g
	NaCl	2 g
	Agar (LBA için)	3 g
	dH ₂ O	200 mL
SOC (Super Optimal Broth)	Trypton	200 mg
	Maya Ekstresi	50 mg
	NaCl	58.44 mg
	dH ₂ O	100 mL

LB ve LBA besi ortamları Tablo 3.3'te verilen bileşenler dH₂O içinde çözdürüldükten sonra 1 N NaOH ile pH 7.2'ye ayarlandı. Katı besi ortamı için agar eklendikten sonra otoklavda steril edildi. Ampisilin içeren besi ortamları için sterilizasyon sonrasında 50 mg/L ampisilin eklendi. SOC besi ortamına ise; 121°C'da ve 1.2 atmosfer basınçta 15 dk steril edilerek hazırlanan 10 mM, 100 mL MgCl ve 2 M, 5 mL glukoz solüsyonlarından sırasıyla 500 µl ve 1 mL eklendi. Besiyerinin pH'ı NaOH ile 7.0'a ayarlandı. Tüm besiyerleri +4°C'de muhafaza edildi.

3.3. GENETİK ANALİZLER

3.3.1. *S. pombe*'den Genomik DNA İzolasyonu

S. pombe 972h⁻ 'den genomik DNA izolasyonunda Looke ve diğ. (2011) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek uygulandı.

İzolasyon aşamaları:

1. YEL besi ortamında bir gece üretilen (30°C, 180 rpm) *S. pombe* 972 h⁻ hücreleri çöktürüldü ve 100 µL 200 µM LiOAc w/v %1 SDS solüsyonu ile süspansiyon haline getirildi ve 5 dk 70°C'de su banyosunda inkübe edildi.

2. Daha sonra üzerine 300 μ L %96'lık etanol (soğuk) eklenip vortekslendi.
3. 15000 xg'de 3 dk santrifüjlendikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı.
4. Pellet 500 μ L %70'lik etanol ile yıkandı ve santrifüj ile tekrar çöktürüldü.
5. Sonrasında pellet 100 μ L nükleaz içermeyen steril suda çözündürüldü ve hücre kalıntısını çöktürmek için 15 saniye 15000 xg'de santrifüjlendi.
6. Son olarak süpernatant başka bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve gerektiğinde kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

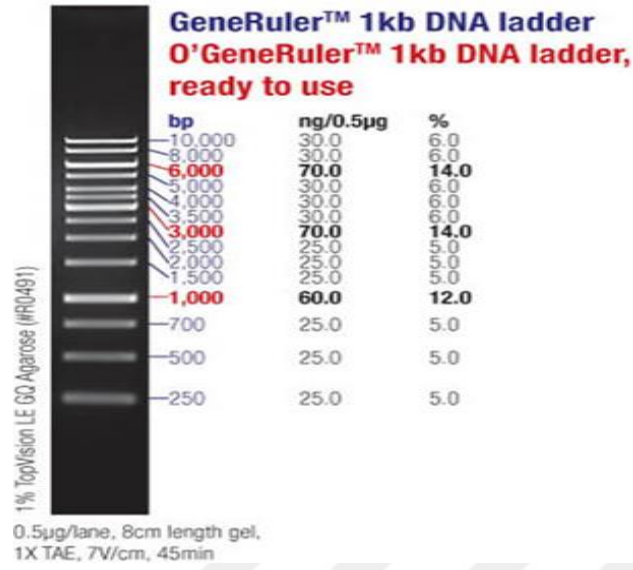
3.3.2. DNA'nın Spektrofotometrik ve Elektroforetik Analizi

Elde edilen DNA örneğinin ve pSLF172, pSLF173 plazmidlerinin miktar ve saflık kontrolleri spektrofotometrede ("Nanodrop 8000", Thermo Scientific) 260 ve 280 nm dalga boyunda ölçülerek yapıldı. Öncelikle 2 μ L ddH₂O "blank" olarak cihaza okutulduktan sonra örneklerden 2 μ L alınarak saflık ve miktar ölçümleri yapıldı.

DNA örneği %1'lik agaroz jelde kontrol edildi. Gerekli miktarda agaroz ve 1X TAE karıştırılıp mikrodalga fırınında 2 dk çözündürüldü. 50-55°C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine son konsantrasyonu 0.5 μ g/mL olacak şekilde etidyum bromür (10 mg/mL) eklendi ve yatay elektroforez kasetine dökülerek 15-20 dk boyunca jelin soğuyup katılaşması için beklendi. Daha sonra içinde 1X TAE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirilip, her bir örnekten 5 μ L alınarak, 1 μ L 6X yükleme tamponu ile karıştırılıp jele yüklendi. Bant boyutlarının anlaşılabilmesi için GeneRuler™ 1 kb boyutlu standart DNA ("Marker DNA", Fermentas) kullanıldı (Şekil 3.4). Agaroz jele yüklenen DNA örnekleri 80 V'da 50 dk yürütüldü ve 302 nm dalga boyunda ultraviyole (UV) ışıktaki görüntülendi. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler Tablo 3.4'te verildi.

Tablo 3.4: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve içerikleri.

Adı	İçerik	Miktar/Hacim
50 X TAE (Tris-Asetat-EDTA Tamponu)	Tris Base	121 g
	0.5 M EDTA (pH 8.0)	50 mL
	Glasiyel Asetik Asit	28.6 mL
	dH ₂ O	420 mL
Etidyum bromür	Etidyum Bromür dH ₂ O	10 mg 1 mL



Şekil 3.5: Çalışmada kullanılan ‘Marker’ DNA.

3.3.3. *S. pombe*’de *ght5* Dizilerinin PZR ile Çoğaltılması

S. pombe’de 3. kromozom üzerindeki *ght5* geninin tam boyda ve *ght5* promotorünün de dahil edildiği dizilerin çoğaltılmasında kullanılacak primerler için gerekli olan *ght5* sekansı “NCBI Nucleotide Database” den alınarak Primer3 programı kullanılarak tasarlandı. Ligasyon için insörtlerin restriksiyon enzimleri ile kesimi yapılması gerektiğinden, ilgili vektörlere uygun enzim kesim bölgeleri primerlere eklendi. Primerlerin sentezi için ticari bir firmadan hizmet alındı. Tasarlanan primerler Tablo 3.5’te verildi. İnsört 1 dizisinin pSLF173’e klonlanmasıyla Ght5’in amino ucuna, insört 2’nin ise pSLF172 plazmidine klonlanmasıyla *ght5*’in karboksi ucuna HA epitopu eklendi. İnsört 3 dizisi ise pSLF172 plazmidine, plazmidin *nmt1* promotörü çıkarılarak klonlandı.

Tablo 3.5: Hedef genin çoğaltılması için tasarlanan primerler.

	Primerler	Dizi
İnsört 1	1)Ght5-F_SalI	5' AAG CGT CGA CGA TGG GAA AAA ATT TGA CCA TTG 3'
	2)Ght5 R_SmaI	5' GGT CCC GGG CTA TGC GAA TTG TT 3'
İnsört 2	3)Ght5-F_BglII	5' CGA AGA TCT ATG GGA AAA AAT TTG ACC ATT G-3'
	4)Ght5-R_NotI	5' ATA GTT TAG CGG CCG CGT GCG AAT TGT TCT TCC TG 3'
İnsört 3	4)Ght5-R_NotI	5' ATA GTT TAG CGG CCG CGT GCG AAT TGT TCT TCC TG 3'
	5)Ght5-F_PstI	5' AAC TGC AGC AGG TCT TGC GTC CAA CTT T 3'

PZR bileşenleri, 0.2 mL'lik PZR tüplerinde Tablo 3.6'da belirtildiği biçimde bir araya getirildi.

Tablo 3.6: Hedef genin çoğaltılması için hazırlanan reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar (µl)	Son Konsantrasyon
dH ₂ O	11.3	
Tampon	4	1X
MgCl ₂	0.5	1.25 mM
2 mM dNTP	2	0.2 mM
Primer(F)	0.5	0.25 pmol/µL
Primer(R)	0.5	0.25 pmol/µL
DNA	1	5 ng/µL
DNA polimeraz(5 U/µL)	0.2	0.05 U/µL
Toplam	20	

Reaksiyonda “Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase” enzimi ve kalıp olarak *S. pombe 972h* ırkı genom DNA'sı kullanıldı. PZR Tablo 3.7'de verilen koşullarda PZR cihazı (Bio-RAD T100 Thermal Cycler) ile gerçekleştirildi.

Tablo 3.7: PCR koşulları.

Reaksiyon Basmağı	Sıcaklık(°C)	Süre	Döngü Sayısı
Pre-Denatürasyon	98	30 sn	1
Denatürasyon	98	10 sn	35
Bağlanma	*	30 sn	
Uzama	72	1 dk 30 sn	
Son Uzama	72	10 dk	1

*Bağlanma sıcaklıkları; insört 1 ve insört 2 için: 54°C, insört 3 için: 66°C'dir.

PZR sonucu oluşan ürünler %1'lik agaroz jelde kontrol edildi. Örnekten 5 µL, yükleme tamponundan 1 µL karıştırılarak kuyucuklara yükleme yapıldı. 80 Voltta 50 dk yürütüldü ve UV ışıktaki 302 nm'de bantlar görüntülendi.

3.3.4. Plazmidlerin Kesimi

Rekombinant plazmid vektörlerini oluşturmak için ilk olarak, mevcut dairesel plazmidleri çizgisel hale getirmek amacıyla, 1) pSFL173 plazmidinin *SalI* (NEB) + *SmaI* (NEB); 2) pSLF172 plazmidinin *NotI* (NEB) + *BglII* (NEB) ; 3) pSLF172 plazmidinin *NotI* (NEB) + *PstI* (NEB) restriksiyon endonükleazlarıyla ikili kesimleri gerçekleştirildi (Tablo 3.8).

SA01 rekombinant plazmidi için, reaksiyon sırasıyla 1 saat 37°C, 30 dk 25°C ve 1 saat 37°C’de inkübasyona bırakıldı. SA02 ve SA03 rekombinant plazmidleri için reaksiyonlar 37°C’de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Daha sonra enzimlerin inaktivasyonu için reaksiyonlar 85°C’de 15 dk inkübe edildi. Hemen ardından endonükleazlar ile kesimi yapılmış tüm plazmid reaksiyonlarına fosfataz enzimi (NEB, Antarctic Phosphatase) eklenerek vektörlerin defosforilasyonu gerçekleştirildi. Bu işlem ile, linear vektörün 5’ uçlarında endonükleaz kesimi sonucu açığa çıkan fosfat gruplarının kaldırılmasıyla, vektörlerin kendi üzerine kapanmasının (self-ligasyonu) engellenmesi amaçlandı. Defosforilasyon için reaksiyonlar 37°C’de 2.5 saat tutuldu. Fosfataz enziminin inaktivasyonu için ise karışımlar 85°C’de 15 dk inkübasyona bırakıldı (Tablo 3.9). Rekombinant plazmid için restriksiyon enzimlerinin seçiminde, gen içinde tanıma bölgesi olmamasına ve aynı zamanda, pSLF172 ve pSLF173 plazmidlerinin klonlama bölgelerindeki restriksiyon enzimleriyle uyumlu olmasına dikkat edildi.

Tablo 3.8: Plazmid DNA’sının enzim kesimi için gerekli bileşenler ve miktarları.

Reaksiyon Bileşenleri	Kullanılan Hacim (µL)
dH ₂ O	19
10X Cut Smart Tampon	10
Plazmid DNA’sı	65
Enzim 1	3.5
Enzim 2	2.5
Toplam	100

Tablo 3.9: Plazmidlerin defosforilasyonu için gerekli bileşenler ve miktarları.

Reaksiyon Bileşenleri	Kullanılan Hacim (µL)
Restriksiyon enzimleri ve plazmid DNA’sı reaksiyon karışımı	100
10X Fosfataz Buffer	12
Fosfataz Enzimi	3
dH ₂ O	5
Toplam	120

3.3.5. PZR Ürünlerinin Kesimi

Her iki ucunda da, ligasyona bırakılacak ilgili vektörlere uyumlu restriksiyon kesim bölgesi bulunan PZR ürünlerinin, 1) *SalI* (NEB)+ *SmaI* (NEB), 2) *NotI* (NEB) + *BglII* (NEB) ; 3) *NotI* (NEB) + *PstI* (NEB) endonükleazları ile ikili kesimleri gerçekleştirildi (Tablo 3.10).

1. insört için reaksiyon sırasıyla; 1 saat 37°C, 30 dk 25°C ve 1 saat 37°C’de inkübasyona bırakıldı. 2. ve 3. insörtler için reaksiyonlar 37°C’de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Daha sonra enzimlerin inaktivasyonu için reaksiyonlar 85°C’de 15 dk inkübe edildi.

Tablo 3.10: PCR ürünlerinin kesimi için gerekli bileşenler ve miktarları.

Reaksiyon Bileşenleri	Kullanılan Hacim(μL)
10X Cut Smart Tampon	10
PZR Ürünü DNA	85
Enzim 1	2.5
Enzim 2	2.5
Toplam	100

3.3.6. Kesim Ürünlerinin Geri Kazanımı

Ürünlerin geri kazanımı ticari kit (Qiagen QIAquick PCR Purification Kit) ile firmanın önerdiği koşullarda gerçekleştirildi.

1. İlk olarak her bir ürün için mikrosantrifüj tüpüne saflaştırılacak hacmin 5 katı kadar ‘‘Binding Buffer’’ eklendi.
2. Kesim ürünleri ve binding buffer iyice karıştırıldıktan sonra bu karışım filtre tüpüne aktarıldı ve bu filtre mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
3. Daha sonra 21.1 xg’de 1 dk santrifüj edildi ve mikrosantrifüj tüpünün altında biriken sıvı atıldı.
4. Filtre tüpünün içine 750 μL ‘‘ Wash Buffer’’ eklendi ve tekrar 21.1 xg’de 1 dk santrifüj edildi ve alttaki sıvı atıldı.
5. Sonra hiçbir şey ilave etmeden tekrar 21.1 xg’de 2 dk santrifüj edildi.
6. Son olarak filtre tüpü yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve 40 μL ddH₂O eklendi. Bu aşamada 1-2 dk beklendikten sonra 21.1 xg’de 1 dk santrifüj yapıldı ve elde edilen ürünlerin nanodropta miktar ve saflık tayinleri yapıldı.

3.3.7. Plazmid ve PZR Ürünlerinin Ligasyonu

Ght5-pSLF173 (SA01), ght5-pSLF172 (SA02) ve promotörlü ght5-pSLF172 (SA03) rekombinant vektörlerinin oluşturulması için restriksiyon endonükleazlarıyla kesilmiş ve

saflaştırılmış plazmidler ile ght5 insört DNA'ları ve T4 DNA ligaz (NEB) enzimi kullanıldı. Ligasyon reaksiyonları Tablo 3.11'de verilen bileşenler ile Tablo 3.12'de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

Tablo 3.11: Ligasyon için gereken bileşenler ve miktarları.

Reaksiyon Bileşenleri	Kullanılan Hacim(μ L)
dH ₂ O	4
T4 Ligaz Tamponu	1
Plazmid	2.5
İnsört DNA	2
T4 DNA Ligaz	0.5
Toplam	10

Tablo 3.12: Ligasyon koşulları.

Sıcaklık($^{\circ}$ C)	Süre	Döngü Sayısı
4	20 dk	1
16	2 saat	1
10	30 sn	60
30	30 sn	
25	2 saat	1

3.3.8. pSLF172, pSLF173 Plazmidleri ile SA01, SA02 ve SA03 Rekombinant Plazmidlerinin *E. coli*'ye Transformasyonu, Geri Kazanımı ve Restriksiyon Endonükleazlar ile Kontrolü

pSLF172, pSLF173 plazmidleri ile insört 1, insört 2 ve insört 3'ün klonlandığı rekombinant plazmidlerini çoğaltmak için *E.coli XL10-Gold* kompetant hücrelerine transformasyon yapıldı.

Transformasyon aşamaları şu şekilde gerçekleştirildi;

1. -80 $^{\circ}$ C'de saklanan 40 μ L süper yeterli *E. coli XL10-Gold* hücreleri buz içerisinde 10 dk bekletilerek çözündürüldü.
2. Çözünen hücre süspansiyonu üzerine 0.1-1 μ g DNA içeren 1-10 μ L plazmid çözeltisi eklendi.
3. Hücreler bu şekilde 30 dk buz içerisinde inkübe edildikten sonra 42 $^{\circ}$ C'de 30 saniye ısı şoku etkisinde bırakıldı. Ardından 2 dk buzda bekletildi.

4. Daha sonra 2 dk oda ısısında bekletildi ve karışımın üzerine 100 µL SOC besi ortamı eklenip 37°C’da 40 dk inkübasyona bırakıldı.

5. İnkübasyondan sonra karışımın tamamı, seçici besi ortamına steril plastik baget ile yayılarak 37°C’de 1 gece inkübe edildi. Seçici besi ortamı olarak LBA+Amp besi ortamı kullanıldı.

Seçici besi ortamlarında (LBA+Amp) üreyen kolonilerden plazmid izolasyonu yapıldı. Plazmid izolasyonu ”Qiagen QIAprep Spin Miniprep” ticari kiti ile gerçekleştirildi. İzolasyon adımları şu şekilde yapıldı;

1. Transformasyon sonrasında LBA+Amp besi ortamında seçilen tek kolonilerden alınarak 5 mL LB+Amp besi ortamına inoküle edildi ve 220 rpm’de çalkalamalı etüvde 37°C’de 1 gece üretili.

2. Kültür 4255 xg’de 5 dk santrifüjlenerek hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı.

3. Pelletin üzerine 250 µL ”Resuspension Buffer” eklenerek pipetaj ile çözdürüldü ve 1.5 mL’lik mikrosantrifüj tüplerine alındı.

4. Ardından 250 µL ”Lysis Buffer” eklenerek karışım mavi rengi alana kadar beklendi.

5. Sonra 350 µL ”Neutralization Buffer” eklenerek karışım beyaz rengi alana kadar beklendi.

6. Daha sonra 21.1 xg’de 10 dk santrifüj edildi.

7. Ardından süpernatant temiz mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilen ”spin columnlara” aktarıldı. 1 dk 21.1 xg’de santrifüj edildi.

8. Süpernatant uzaklaştırılarak column’a 750 µL ”Wash Buffer” eklendi ve 1 dk 21.1 xg’de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı ve aynı santrifüj bir kere daha gerçekleştirildi.

9. ”Spin columnlar” yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Columun ortasına 50 µL ddH₂O eklenerek 2 dk oda ısısında beklendi ve 1 dk 21.1 xg’de santrifüj edildi.

10. Elde edilen ürünlerin spektrofotometrede miktar ve saflık tayinleri yapıldı.

İzole edilen plazmidlerin doğruluğunu kontrol etmek amacıyla pSLF172 ve pSLF173 plazmidleri *EcorI* (NEB); SA01 plazmidi *BamHI* (NEB)+ *KpnI* (NEB); SA02 plazmidi ve

SA03 plazmidi *PstI* (NEB)+ *BamHI* (NEB) restriksiyon endonükleazları ile kesim reaksiyonuna bırakıldı. Kesim reaksiyonu Tablo 3.13'te belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Bileşenler karıştırıldıktan sonra örnek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Reaksiyon sonrası sonuçların kontrolü agaroz jel elektroforezi ile yapıldı.

Tablo 3.13: Restriksiyon endonükleazı ile plazmid kesimi için gerekli bileşenler ve miktarları.

Reaksiyon Bileşenleri	Kullanılan Hacim(μ L)
dH ₂ O	11.5
10X Cut Smart Tamponu	2
Plazmid DNA'sı	6
Enzim 1	0.25
Enzim 2	0.25
Toplam	20

3.3.9. Rekombinant Vektörlerin Dizi Analizi ile Kontrolleri

Restriksiyon enzimleri ile kontrol kesimlerinin ardından pozitif sonuç veren rekombinant vektörlerin dizi analizleri gerçekleştirildi. *Ght5* geninin ilgili vektöre doğru biçimde yerleştiğini görmek ve mutasyon sonucu çerçeve kayması olmadığını göstermek için vektördeki nmt1 promotörüne ait ileri (F) ve terminatör dizisine ait geri (R) primerler (Tablo 3.14) ile, ilgili vektörler dizilemeye gönderildi. Dizi analizi için MedSanTek firmasından hizmet alımı yapıldı.

Tablo 3.14: Dizileme için kullanılan primerler.

Primer Adı	Primer Dizisi (5'3')
Nmt1 Forward	5'-ACTCTCGGCTACTGGATGGT-3'
Nmt1 Revers	5'-CGCACCCGTCTACGTTTCTA-3'

3.3.10. SA01, SA02 ve SA03 Rekombinant Plazmidlerinin *S. pombe* Parental (ED666)

İrkına Transformasyonu

S. pombe parental ırkına hem kimyasal bir yöntem olan lityum asetat yöntemiyle (Forsburg, 2003) hem de elektroporasyon (Forsburg, 2003) yöntemiyle transformasyon gerçekleştirildi. pSLF173, SA01, SA02 ve SA03 plazmid vektörleriyle transformasyon yapıldı. Kimyasal transformasyon aşamasında kullanılan çözeltiler Tablo 3.15'te gösterildiği oranlarda hazırlanıp otoklavda steril edildi.

Tablo 3.15: *S. pombe* transformasyonunda kullanılan çözeltiler.

Çözelti	İçerik
LiAc solüsyonu	0.1 M LiAc, 1X TE (pH 7.5)
LiAc-PEG solüsyonu	0.1 M LiAc, %50 PEG 3350, 1X TE (pH 7)

1. Kimyasal transformasyon için kullanılacak olan *S.pombe* parental hücreleri YEA besiyerinde 30°C'de 2 gece boyunca üretildikten sonra, 30 mL MML (Ade+Leu+Ura) besiyeri içeren erlene 10⁶ hücre/mL olacak şekilde inoküle edildi.
2. Kültür 0.5 -1 x 10⁷ hücre/ml (OD₆₀₀ = 0.2-0.5) yoğunluğuna gelene kadar üretildi. Yeterli hücre yoğunluğuna ulaşan kültür 1734 xg'de 5 dk santrifüj edildi.
3. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet 8 mL distile su ile yıkanarak tekrar 1734 xg'de 5 dk santrifüj edildi.
4. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılarak pellet 0.1 M Lityum Asetat solüsyonu (pH 4.9) ile hücre yoğunluğu 1x10⁹ hücre/mL olacak şekilde yeniden süspanse edildi.
5. Süspanse edilen hücreler 1.5 µL'lik mikrosantrifüj tüplerine 100 µL alıquotlar halinde dağıtıldı ve 30°C'de 2 saat inkübe edildi.
6. Sonra her tüpe 15 µL TE (pH 7.5) içinde 1 µg plazmid DNA eklendi ve inkübasyon sırasında çöken hücreleri yeniden süspanse etmek için nazikçe vortekslenerek karıştırıldı.
7. Ardından 30°C'de önceden ısıtılmış %50 (w/v) PEG 4000'den 290 µL eklendi ve yavaşça vortekslenerek tekrar karıştırıldı ve 30°C'de 60 dakika inkübe edildi.
8. İnkübasyon bitiminde tüplere, 42°C'de 15 dakika boyunca ısı şoku yapıldı ve ardından tüpler 10 dakika oda sıcaklığında soğutuldu.
9. Oda sıcaklığına gelen hücreler 2.4 xg'de 2 dk santrifüj edilerek süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
10. Pellet, 1 mL 1/2 YEL besiyerinde yeniden süspanse edildi ve 32°C 180 rpm'de 3 saat boyunca inkübe edildi.

11. İnkübasyon sonrası hücreler 0.9 xg'de 1 dk çöktürülerek süpernatantın 800 µL'si uzaklaştırıldı ve geriye kalan 200 µL ile pellet süspanse edilerek seçici besiyerlerine MMA (Ade+Leu) ekim yapıldı. 30 °C etüvde 4-7 gün boyunca inkübe edildi.

Elektroporasyon ile transformasyon için;

1. İlk olarak *S.pombe* parental hücreleri YEA besi yerinde 30°C'de 2 gece boyunca bekletildi.
2. Sonra 30 mL MML (Ade+Leu+Ura) besiyeri içeren erlene 10⁶ hücre/mL olacak şekilde ekimi yapıldı ve 180 rpm'de 30°C'de gece boyunca çalkalamalı etüvde üretildi.
3. Ertesi gün hücre yoğunluğu 600 nm'de 0.5-1.5 (OD₆₀₀) aralığına gelince kültür +4°C 1734 xg'de 5 dk santrifüj edildi.
4. Pellet 5 mL soğuk ddH₂O ile yıkandı ve tekrar aynı koşullarda santrifüj edildi.
5. Ardından süpernatant uzaklaştırılarak 5 mL 1M soğuk sorbitol ve 1 M 125 µL DTT eklenerek 15 dk buzda bekletildi.
6. Buzdaki inkübasyonun bitimiyle hücreler +4°C, 1734 xg'de 5 dk santrifüj edildi.
7. Süpernatant uzaklaştırılarak son hücre yoğunluğu 1-5x10⁹ /mL olacak şekilde 1 M soğuk sorbitol ile süspanse edildi.
8. Her bir transformasyon için 40 µL hücre daha önce buzda bekletilerek soğutulmuş elektroporasyon küvetlerine eklendi.
9. Ardından 100 ng DNA eklenerek küvetler elektroporatöre yerleştirildi.
10. Elektroporasyon işlemi 1.5 kV, 200 ohms, 25 µF koşullarında (Biorad, GenePulser Xcell) gerçekleştirildi.
11. Daha sonra küvetlere 0.9 mL soğuk sorbitol eklenerek 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı.
12. Hücreler 0.9 xg'de 1 dk santrifüj edildi. Süpernatantın 0.7 mL'si uzaklaştırıldı.

13. Son olarak süpernatantın kalan miktarı ile hücreler süspanse edilerek ilgili seçici besiyerlerine MMA (Ade+Leu) ekildi. 30 °C etüvde 4-7 gün boyunca inkübe edildi.

3.3.11. Rekombinant Transformant Kolonilerin Kontrol Edilmesi

Seçici besiyerinde üreyen kolonilerin, rekombinant plazmidleri almış olan koloniler olup olmadığı koloni PZR ile kontrol edildi. Bu PZR’da koloniler kalıp olarak kullanıldı. 10 µL distile su içerisine kürdan yardımıyla kolonilerden hücre alındı ve süspanse edildi. Bu hücre süspanسیونları kalıp olarak kullanıldı. Primer olarak, SA01 plazmidinin *S.pombe*’ye transformasyonu ile oluşan kolonilerin kontrol edilmesi için insört 1’in çoğaltımında kullanılan *ght5* forward primeri ile *mnt1* promotor bölgesi için tasarlanmış nmt revers primeri ; SA02 ve SA03 plazmidlerinin *S.pombe*’ye transformasyonu sonucu oluşan kolonilerin kontrolü için *ght5* realtime forward primeri ile plazmitte yer alan *mnt1* promotor bölgesi için tasarlanmış nmt revers primeri (Tablo 3.16) kullanıldı.

Tablo 3.16: Koloni PZR’da kullanılan primer dizileri ve oluşan ürün boyutları.

Primerler	Dizi	Ürün Boyutu
1)Ght5-F	5’ AAG CGT CGA CGA TGG GAA AAA ATT TGA CCA TTG 3’	~ 1.5 kb
2)Nmt-R	5’ - CGC ACC CGT CTA CGT TTC TA-3’	
3)Nmt-R	5’ - CGC ACC CGT CTA CGT TTC TA-3’	~ 1.0 kb
4)Ght5-RF	5’-TTT GGT GGT CTT TTC GTC CT-3’	

Reaksiyon “Thermo Scientific Dream Taq DNA Polymerase” enzimiyle gerçekleştirildi. Tablo 3.17’de verilen bileşenler 0,2 ml’lik PZR tüplerinde karıştırıldı ve reaksiyon koşulları Tablo 3.18’de verildi.

Tablo 3.17: Koloni PZR bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar (µl)	Son Konsantrasyon
dH ₂ O	13.3	
Tampon	2	1X
MgCl ₂	0.5	1.25 mM
2 mM dNTP	2	0.2 mM
Primer(F)	0.5	0.25 pmol/µL
Primer(R)	0.5	0.25 pmol/µL
Kalıp	1	
DNA polimeraz(5 U/µl)	0.2	0.05 U/µL
Toplam	20	

Tablo 3.18: Koloni PZR koşulları.

Reaksiyon Basmağı	Sıcaklık(°C)	Süre	Döngü Sayısı
Pre-Denatürasyon	95	30 sn	1
Denatürasyon	95	30 sn	
Bağlanma	54	30 sn	35
Uzama	72	1 dk	
Son Uzama	72	10 dk	1

PZR sonrasında ürünler %1 agaroz jele yüklenerek kontrol edildi. PZR ürünlerinin 10 µL'si 2 µL 6X yükleme boyasıyla karıştırılarak yüklendi. Jel 80V'da 50 dakika yürütüldükten sonra UV ışıktaki 302 nm'de görüntülenerek fotoğrafı çekildi. SA01 kolonileri için yaklaşık 1500 bç beklenen büyüklük, SA02 ve SA03 kolonileri için yaklaşık 1000 bç PCR ürünün çoğaltıldığı koloniler pozitif (rekombinant vektörü almış) olarak belirlendi.

3.4. FİZYOLOJİK ANALİZLER

3.4.1. *S. pombe* Irklarının Üreme Eğrilerinin Oluşturulması

S. pombe 972h⁻, parental (ED666), SA01, SA02 ve SA03 ırklarının üreme eğrilerinin çıkarılması için Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı gibi hücreler, seçici besi ortamlarında (972h⁻ - MML; parental- MML+Ade+Leu+Ura; SA01, SA02 ve SA03 -MML+Ade+Leu) önce 30°C'de 2 gece boyunca katı besiyerinde inkübe elde edildi. Daha sonra 1 mL distile su ile süspanse edilerek toplandı. 100 kat seyreltilen hücrelerin sayımı Malassez Lamı (0.0025 mm², Superior, Marienfeld) kullanılarak yapıldı.

Mililitredeki hücre sayısı Denklem 3.1'e göre hesaplandı.

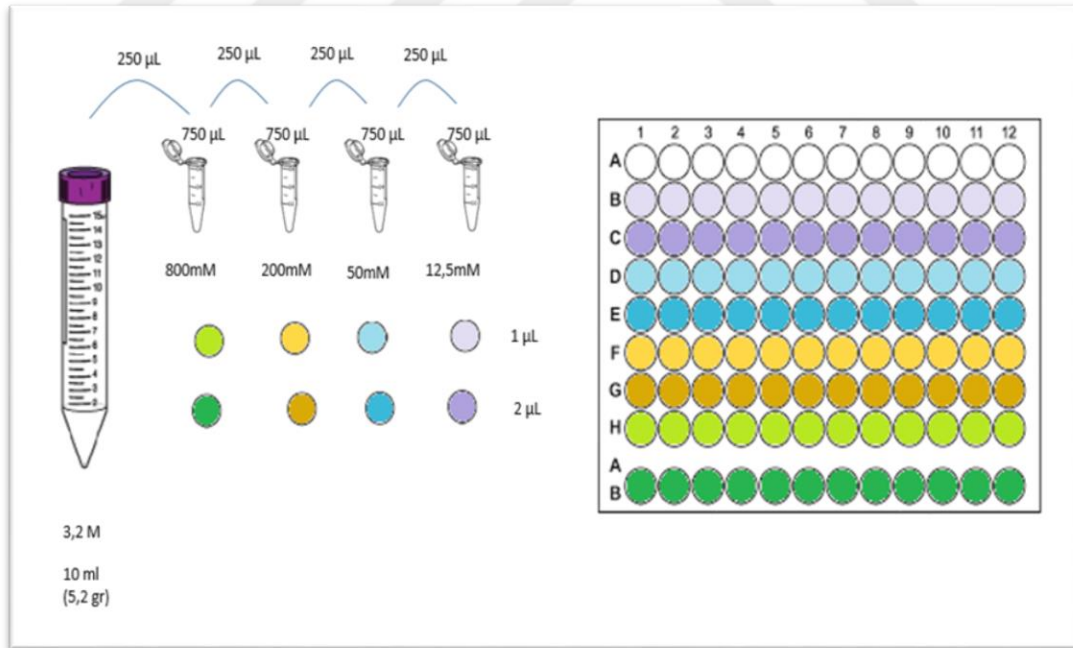
$$\text{Hücre/mL} = \text{Ortalama hücre sayısı} \times \text{Sulandırma faktörü} \times 10^5 \quad (3.1)$$

20 mL seçici besi ortamı içeren 100 mL'lik erlenlere 10⁶ hücre/mL olacak şekilde ekim yapıldı ve çalkalayıcı etüvde 180 rpm'de, 30°C'de üremeye bırakıldı. Hücre kitlesindeki artış her 2 saatte bir 200 µL alınarak spektrofotometrede (Biotek Cytation 5, Elx8080) 600 nm dalga boyundaki ışık kullanılarak yoğunluğun ölçülmesiyle takip edildi. 30 saat boyunca takip edilen kültürlerin, zamana bağlı üreme eğrileri oluşturuldu.

3.4.2. Demir Stresi Uygulaması

Bu çalışmada elde edile rekombinant ırklar ve kontrol grubu olarak kullanılan parental ve parental+pSLF172 ırklarında demirin sitotoksik etkisi, karbon kaynağı olarak hem %2 hem de %0,5 glukoz içeren minimal besi ortamlarında (MML) farklı konsantrasyonlarda demir (0,0625 – 8 mM, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Merck) uygulanarak hücre canlılığının takip edilmesiyle belirlendi. Buna göre, her bir ırk için yüksek ve düşük glukoz koşullarında, ayrı ayrı, demirin minimum inhibisyon (MIC) değerleri IC_{50} olarak hasaplandı.

Öncelikle, stres uygulanacak ırkların %2 glukoz içeren MML besi yerinde 30°C , 180 rpm’de, 1 gün boyunca üretilerek taze kültürleri elde edildi. Bu arada, 96 kuyucuklu mikropalaklara 200 μL MML (%2 ve %0,5 glukoz) besiyeri dağıtıldıktan sonra, 0,0625 mM, 0,125mM, 0,25mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM olacak şekilde 8 farklı konsantrasyonda 3,2 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solüsyonundan (Tablo 3.19) eklendi. Her bir ırka ait taze hücre kültürlerinden 10^6 h/mL olacak şekilde ekim yapıldı ve 30°C , 180 rpm’de üremeye bırakıldı. Deney akış şeması ayrıca şekil 3.6’da verildi.



Şekil 3.6: Demir stresi uygulamasının şematik gösterimi.

Hücre üremelerindeki artış 0., 18., 24., 42. ve 48. saatlerde plate'lerin doğrudan spektrofotometrede (Biotek Cytation 5, Elx8080) 600 nm dalga boyunda ölçülmesiyle takip edildi. 2 gün boyunca takip edilen kültürlerin, hem zamana bağlı üreme eğrileri hem de 24. saatte MIC değerleri IC_{50} olarak hesaplandı. Bu deney düşük (%0,5) ve yüksek (%2) glukoz içeren MML besiyerlerinde, 2 teknik 3 deney terarlı olarak gerçekleştirildi.

Ayrıca veriler GraphPad Programı Two-way ANOVA ile hücrelerin tüm demir dozlarında 24.saatteki canlılıkları analiz edildi. Her bir ırkın demir içermeyen MML besi ortamındaki üremeleri kontrol grubu olarak kullanıldı. Gruplar arasındaki fark $P < 0,05$ değerine sahip olduğunda sonuçlar anlamlı kabul edildi.

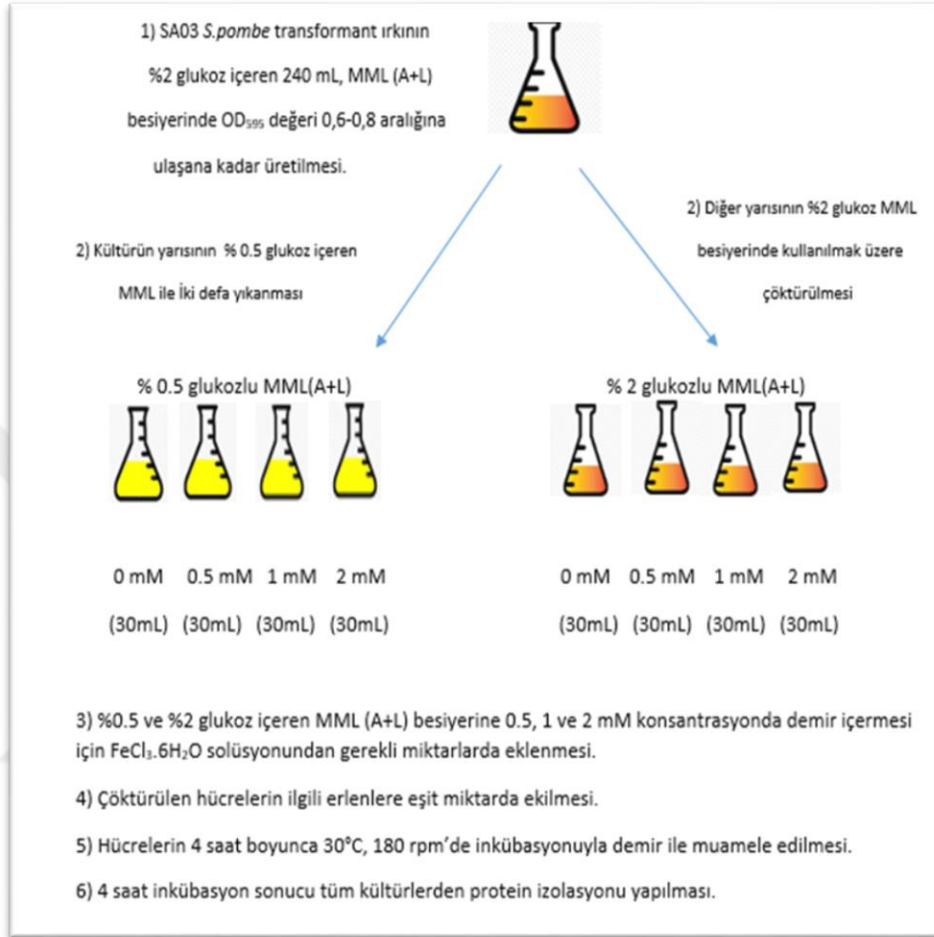
Tablo 3.19: Demir stresi için hazırlanan stok solüsyon.

3.2 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (10mL)	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	5.2 gr
Distile Su	10 mL

3.4.3. SA03 *S. Pombe* Transformant İrkına Western Blot Analizi İçin Demir Stresi Uygulaması

Demir stresinin *ght5* geninin anlatımına olan etkisini belirlemek amacıyla, SA03 transformant ırkına %0,5 ve %2 glukoz içeren MML (A+L) besiyerinde farklı derişimlerde demir stresi uygulandı. İlk olarak SA03 ırkı, %2 glukoz içeren MML besiyerinde 30°C, 180 rpm'de, 1 gün boyunca üretilerek canlandırıldı. Sonra yine %2 glukoz içeren 240 mL MML besiyerine ekimi yapıldı ve ertesi gün logaritmik faza (OD_{600} : 0.6-0.8) ulaşmış olan kültür 4255 xg'de 5 dk çöktürüldü. Pelletin yarısı %2 glukozlu MML besiyerinde kullanılmak üzere ayrılırken, diğer yarısı iki defa % 0.5 glukoz içeren MML besiyeri ile süspanse edilerek yıkandı ve aynı koşullarda çöktürüldü. Diğer taraftan her biri 30 mL %0,5 glukozlu MML besiyeri içeren 4 tane erlen ve yine her biri 30 mL %2 glukozlu MML besiyeri içeren 4 tane erlen hazırlandı ve iki farklı besiyerine de 0 mM, 0.5 mM, 1 mM ve 2 mM demir içerecek şekilde Tablo 3.19'da belirtilen demir solüsyonundan eklendi. %0,5 glukozlu MML ile yıkanan hücreler %0,5 glukozlu farklı konsantrasyonlarda demir içeren erlenlere eşit miktarda pipet yardımıyla ekildi. Başta çöktürülen hücre pelletinin diğer yarısı da %2 glukozlu farklı derişimlerde demir içeren erlenlere aynı şekilde ekildi. Ardından tüm hücreler 4 saat boyunca 30°C, 180 rpm'de inkübe

edildi. Daha sonra tüm kültürlerden Bölüm 3.5.1’de anlatıldığı gibi protein izolasyonu yapıldı. Deney akış şeması ayrıca şekil 3.7’de verildi.



Şekil 3.7: SA03 *S. pombe* ırkına western blot analizi için demir stresi uygulamasının şematik gösterimi.

3.5. PROTEİN ANALİZLERİ

3.5.1. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini

Konak olarak kullanılan *S. pombe* parental ırkı ve bu çalışmada elde edilen *S. pombe* transformant ırklarından ve demir stresi uygulanan transformant ırklarından protein izolasyonu, Grallert ve Hagan (2017)’ın yöntemi kullanılarak yapıldı. İzolasyon için kullanılan tampon Tablo 3.20’de belirtildiği gibi hazırlandı.

Tablo 3.20: Protein izolasyonunda kullanılan tampon ve içeriği.

Tamponun Adı	Tamponun Bileşenleri
RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay) Tamponu (pH:7,4)	140 mM NaCl 25 mM Tris-HCl 1 mM EDTA %1 NP-40 %0,1 SDS

Protein izolasyonu basamakları:

1. İzolasyonda kullanılacak olan her bir ırk, %2 glukoz içeren MML besiyerinde OD₆₀₀ değeri yaklaşık 1 olana kadar üretildi. Durağan faza geçmiş olan kültürlerden 15 mL'lik falkon tüplere 10 mL alındı ve 8000 xg'de +4°C'de 3 dk boyunca santrifüj edildi.
2. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellete 1 mL soğuk PBS eklenerek hücreler pipetaj ile süspanse edildi. Bu süspansiyon buzda bekletilerek soğutulmuş 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
3. Mikrosantrifüj tüpleri 8000 xg'de +4°C'de 3 dk santrifüj edildi ve süpernatnat uzaklaştırıldı. Ardından tüpler -80°C'de 5 dk bekletilerek pelletin donması sağlandı.
4. İnkübasyon sonunda donan pelletin üzerine 400 mg cam boncuk ve 250 µL RIPA buffer eklendi.
5. Tüpler -20°C 5 dk bekletildi ve daha sonra 1 dakika vortekslenerek hücrelerin parçalanması sağlandı. Bu aşama 3-4 defa tekrarlandı.
6. Ardından tüpün altı steril ve kızgın bir iğne ile delinerek boş bir 1,5 mL mikrosantrifüj tüpün içine koyuldu.
7. Üst üste yerleştirilen iki tüpün 3000 xg'de +4°C'de 1 dakika santriüj edilmesiyle ve üst tüpteki sıvının tamamen alttaki tüpe geçmesi sağlandı.
8. Daha sonra tüpler +4°C'de 16000 xg'de 20 dakika santrifüj edildi.
9. Santrifüj bitiminde süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpe alınarak -20°C'de daha sonra kullanılmak üzere muhafaza edildi.

İzole edilen proteinlerin miktarları hem spektrofotometrede ("Nanodrop 8000", Thermo Scientific) hem de Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific/23225) ile ölçüldü.

Nanodrop ile miktar tayininde öncelikle 2 μ L RIPA tamponu “blank” olarak cihaza okutulduktan sonra örneklerden 2 μ L alınarak ölçümleri A280 nm’de yapıldı. Kit ile protein tayini yapılırken firmanın önerdiği iki farklı protokolden, microplate protokolü uygulandı. Öncelikle bir standart oluşturmak için önerilen şekilde BSA (Sığır Serum Albumini) kullanılarak farklı konsantrasyonlara sahip bir seri sulandırım hazırlandı. Daha sonra standart ve protein örneklerinden iki tekrarlı olacak şekilde 25 μ L örnek alınarak mikropłaka kuyularına koyuldu. İzolasyonda kullanılan RIPA tamponu kör örnek olarak seçildi. Tüm örneklerin üzerine 200’er μ L kitin çalışma solüsyonu eklendi. Mikropłaka 30 sn orbital çalkalayıcıya koyularak örneklerin ve çalışma solüsyonun homojen şekilde karışması sağlandı. Ardından 30 dakika 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası mikropłakanın 562 nm dalga boyunda ölçümü alınarak örneklerin protein konsantrasyonu belirlendi.

3.5.2. Proteinlerin Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi (SDS-PAGE) ile Görüntülenmesi

Yapılan protein izolasyonlarının western blotta kullanılabilirliğini test etmek için, örnekler ilk olarak SDS-PAGE’de yürütüldü. SDS-PAGE hem manuel olarak hem de kit (Biorad, TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit, 12%) yardımı ile hazırlandı. Çalışmada kullanılan jeller ve içerikleri Tablo 3.21 ve 3.22’de verildiği gibi hazırlandı.

Tablo 3.21: Manuel SDS-PAGE jel bileşenleri.

Jel	İçerik	Miktar (10 mL için)
Resolving (Ayırma) Jel	%30 akrilamid/bisakrilamid 1,5 M Tris-HCl pH: 8,8 ddH ₂ O SDS(%10) Tetrametiletilendiamin(TEMED) %10 Amonyum Persülfat (APS)	3.32 mL 2.5 mL 4 mL 100 μ L 5 μ L 80 μ L
Stacking (Yükleme) Jel	%30 akrilamid/bisakrilamid 0,5 M Tris-HCl pH: 6,8 ddH ₂ O SDS(%10) Tetrametiletilendiamin(TEMED) %10 Amonyum Persülfat (APS)	1.32 mL 2.52 mL 6 mL 100 μ L 10 μ L 160 μ L

Resolving (ayırma) jelinin yaklaşık 4 mL’si ile dikey elektrofözezin cam plakaları arasına pipet yardımı ile döküldü. Jelinin üst kısmının düz olması için üzerine 500 μ L isopropanol eklendi ve polimerizasyona bırakıldı. Sonrasında peçete ile jelin üzerindeki isopropanol uzaklaştırıldı.

Ardından stacking (yükleme) jeli hazırlanarak pipet ile ayırma jelinin üzerine, kasetinin üst sınırına ulaşana dek döküldü ve jel tarağı yerleştirildi. Ardından jel polimerizasyona bırakıldı. Böylece kasetinin alt kısmında %10'luk ayırma jeli ve üst kısmında %4'lük yükleme jeli elde edildi.

Tablo 3.22: Biorad, TGX™ FastCast™ SDS-PAGE jel bileşenleri.

Jel	İçerik	Miktar (1 jel için)
Resolver	Resolver A Solüsyonu	3 mL
	Resolver B Solüsyonu	3 mL
	TEMED	3 µL
	APS	30 µL
Stacker	Stacker A Solüsyonu	1 mL
	Stacker B Solüsyonu	1 mL
	TEMED	2 µL
	APS	10 µL

Resolver ve stacker jeller Tablo 3.22'de belirtildiği gibi hazırlanarak ardarda cam plakalar arasına döküldü ve jel tarağı yerleştirildi. Ardından jelin polimerizasyonu için 30-45 dk beklenildi. Bu şekilde kasetinin alt kısmında %12'lik ayırma jeli ve üst kısmında %4'lük yüklem jeli elde edildi. Polimerizasyon sonrası tarak çıkarılarak, kaset elektroforez tankının içerisine yerleştirildi ve 1X yürütme tamponu (Tablo 3.23) eklendi.

Tablo 3.23: SDS-PAGE için kullanılan tamponlar ve bileşenleri.

Tamponun Adı	Tamponun İçeriği
6X Laemmli Buffer	375 mM Tris-HCl pH: 6,8 %6 SDS %4,8 Gliserol %9 2-Merkaptoetanol %0,03 Bromofenol mavisi
1X Yürütme Tamponu (pH: 8,3)	25 mM Tris Baz 192 mM Glisin %0,1 SDS

Protein örneklerinin her birinden toplam 20 µg alındı ve üzerlerine 6:1 oranında Laemmli buffer eklendi (Tablo 3.23). Buffer ile örnekler karıştırıldıktan sonra tüpler 95°C'de 5 dakika bekletildi ve ardından oda sıcaklığına gelene kadar soğumaya bırakıldı. Daha sonra jele yüklenen protein örnekleri önce 80 V'da 30 dk daha sonra 100V'da 1,5 saat yürümeye bırakıldı. Sonrasında manuel olarak hazırlanan jel boyama tamponu (Tablo 3.24) içerisine alınarak 20 gece boyu orbital çalkalayıcıda (50 rpm) inkübe edildi.

Ardından boya ağartıcı solüsyon (Tablo 3.24) ile yaklaşık 4 saat çalkalanarak (50 rpm) sadece boyalı protein bantlarının görüntülenmesi sağlandı.

Tablo 3.24: Coomassie boyama için gerekli solüsyonlar ve içerikleri.

Solüsyon Adı	İçerik
Boyama Solüsyonu	%40 Metanol %10 Glacial Asetik Asit %50 ddH ₂ O %0,1 Coomassie brilliant blue
Boya Ağartıcı Tampon	%7 Glacial Asetik asit %5 Metanol %82 ddH ₂ O

Kit ile hazırlanan SDS-PAGE'e de örnekler manuel jeldeki miktarlar kadar yüklendi ve yine aynı koşullarda yürütüldü. Daha sonra jel, UV 302 nm dalga boyunda aktivasyon için 1-2 dk boyunca bekletilerek protein bantlarının görüntülenmesi sağlanarak fotoğrafı çekildi.

3.5.3. Western Blot

HA tag proteine füzyonu yapılmış ght5 geninin, transformant *S. pombe parental* ırklarında protein üretiminin gösterilmesi için Western Blot analizi yapıldı. Kontrol protein olarak α -tubulin kullanıldı. α -tubuline ve HA tag rapörtör proteinine özgü olan primer ve sekonder antikorlar seçildi. Seçilen antikorların özellikleri tablo 3.25'te verildiği gibidir.

Tablo 3.25: Western Blot çalışmasında kullanılan primer ve sekonder antikorlar.

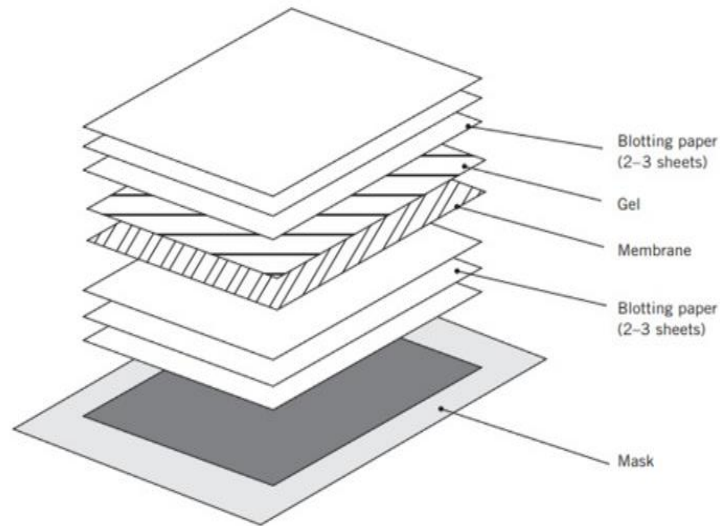
Hedef Protein	Marka	Katalog Numarası	Antikor Adı
α -Tubulin	Novus Biologicals	NB100-1639	Rat monoclonal tubulin antibody
α -Tubulin	Novus Biologicals	NB7126	Goat polyclonal goat anti rat IgG2A secondary antibody-HRP-
HA Tag	Novus Biologicals	NB600-363	Rabbit polyclonal HA tag antibody
HA Tag	Thermo Fisher Scientific	31460	Goat anti rabbit IgG (H+L) secondary antibody-HRP-

İlk olarak protein örnekleri SDS-PAGE jele yüklendi ve yürütüldü (Bölüm 3.3.4). Bu şekilde biri α -Tubulin proteini ve diğeri HA-Ght5 füzyon proteininin tespit edilmesinde kullanılmak üzere iki jel hazırlandı. Yürütme işlemi bittikten sonra Western Blotta transfer aşamalarına geçildi. Western Blot için kullanılan tamponlar ve içerikleri Tablo 3.26'da verildiği gibidir.

Tablo 3.26: Western Blot çalışmasında kullanılan tamponlar ve içerikleri.

Tampon Adı	İçeriği
Bloklama Solüsyonu	1X TBST %5 Skim Milk
Antikorların İnkübe Edildiği Solüsyon	1X TBST %1 Skim Milk
1X TBST	150 mM NaCl 20 mM Tris %0,1 Tween 20
1X TBS (pH 7.6)	150 mM NaCl 20 mM Tris
Transfer Tamponu	25 mM Tris Base 192 mM Glisin %20 Metanol

Çalışmada PVDF (Polivinilidin Florür) tipi membran kullanıldı. Membran ve jeller uygun boyutlarda kesilerek ve fazlalıklardan kurtularak transfer için hazırlandı. Membran transfer öncesi saf metanolde 1 dk bekletilerek aktif hale getirildi. Ardından membran, jeller ve transferde kullanılacak filtre kağıtları 10 dk boyunca transfer bufferda bekletildi. Jeller, membran ve filtre kağıtları, Şekil 3.5'te gösterildiği gibi sandviç yapılarak transfer cihazına yerleştirildi. Proteinlerin PVDF membrana transferi 40 mA'da 2 saat 10 dk boyunca gerçekleşti.

**Şekil 3.8:** Proteinlerin jelden membrana aktarılması için sandviç yapısının oluşturulması..

Transfer bitimi sonrası membranlar 1XTBST ile 1 dk yıkandı. Ardından 20 mL bloklama solüsyonunda 1 saat boyunca 50 xg çalkalayıcıda oda sıcaklığında bekletildi. Bloklamanın hemen ardından membranlara primer antikorlar uygulandı. Bir membrana α -Tubulin diğerine

HA tag primer antikor uygulaması yapıldı. Antikor uygulama tapmonunda α -Tubulin primer antikoru 4000:1 oranında, HA Tag 3000:1 oranında dilue edilerek kullanıldı. Bu işlem 50 mL falkon tüp içerisinde, +4°C’de ve 10 xg hızındaki tüp çeviricide tüm gece boyunca gerçekleştirildi.

Ertesi sabah membranlar 1X TBST içerisinde 50 xg’de 5 dakika boyunca çalkalanarak yıkandı. Yıkama işlemi her seferinde tamponun değiştirilmesi ile 5 defa yapıldı. Ardından α -Tubulin primer antikoruna özgü olan sekonder antikor 10000:1 oranında, HA Tag primer antikoruna özgü olan sekonder antikor ise 12500:1 oranında uygulama solüsyonuna eklenerek ilgili membranlara uygulandı. Uygulama oda sıcaklığında 50 xg hızdaki orbital çalkalayıcıda 1 saat boyunca gerçekleştirildi. Ardından membranlar tekrar yıkama işlemine alındı. 1X TBST ile 50 xg’de 5 dakika boyunca çalkalanarak yıkandı. Bu aşama 5 defa tekrarlandı. Ardından karanlık alanda membranlara Pierce ECL Plus Western Blotting 48 Substrate (Thermo Fisher Scientific/32132) solüsyonu firmanın önerdiği protokole göre hazırlanarak uygulandı. Membranlar 5 dakika süre ile solüsyon içerisinde bekletildi ve cihazda görüntülenerek (Vilber, Fusion Solo S) fotoğrafı çekildi.

4. BULGULAR

4.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN IRKLARIN ÜREME ÖZELLİKLERİ

Bu çalışmada *Schizosaccharomyces pombe* 972h⁻ yabani ırkı ve parental (EDD666) ırkı genomik DNA izolasyonu ve transformosyan aşamalarında kullanıldı. Bu aşamalardan önce ırkların genotipik özellikleri seçici besiyerlerindeki üremeleri izlenerek kontrol edildi. Yabani ırk tüm besiyerlerinde üreme gösterirken, parental ırk adenin, lösin ve urasil mutanlığı olduğundan sadece bu metabolitlerin eklendiği besiyerinde üredi.

Tablo 4.1: Çalışmada kullanılan 972h⁻ ve parental (EDD666) ırklarının genotipik kontrolleri.

İrklar Besiyeri	MMA	MMA+ A	MMA+ U	MMA+L	MMA+ A+U	MMA+ A+L	MMA+ U+L	MMA+A +U+L
972h ⁻	+	+	+	+	+	+	+	+
Parental (EDD666)	-	-	-	-	-	-	-	+

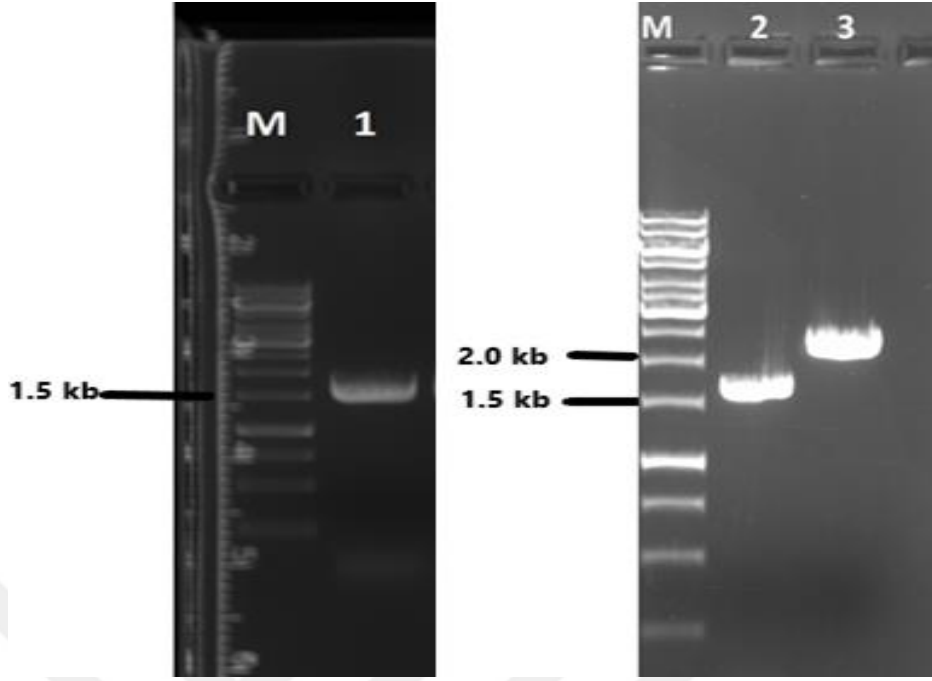
(A: Adenin, L: Lösin, U:Urasil + üreme var, - üreme yok).

4.2. *S. pombe* GHT5 GENİNİN PSLF172 VE PSLF173 EKSPRESYON VEKTÖRLERİNE KLONLANMASI

Bu çalışmada *S. pombe*'nin *ght5* geninin 1641 bp'lık tam boydaki okuma çerçevesi ile oluşturulan DNA dizisi pSLF172 ve pSLF173 plazmidlerine ve ayrıca *ght5* geninin okuma çerçevesine ek olarak promotorünü ve 5' UTR bölgesini kapsayan 612 nükleotidlik bölgenin de dahil olduğu 2253 bp'lık DNA parçası ise pSLF172 plazmidine, *S. pombe* ekspresyon analizleri için klonlandı.

4.2.1. *S. pombe*'de İnsört 1, İnsört 2 ve İnsört 3 Dizilerinin PZR ile Çoğaltılması

Rekombinant plazmid vektörler oluşturmak için *ght5*'in tam boydaki ve *ght5*'e promotorünün de dahil edildiği DNA dizileri, Tablo 3.5'te verilen 5' ve 3' uçlarına birer restriksiyon enzimi tanıma dizisi eklenen özgün primer çiftleri ile *S. pombe* 972h⁻ ırkından izole edilen genomik DNA'nın kalıp olarak kullanılmasıyla PZR'da çoğaltıldı. Çoğaltım ürünleri insört 1 ve insört 2'nin 1.6 kb'lık, insört 3'ün 2.2 kb'lık boyutları %1'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4.1).

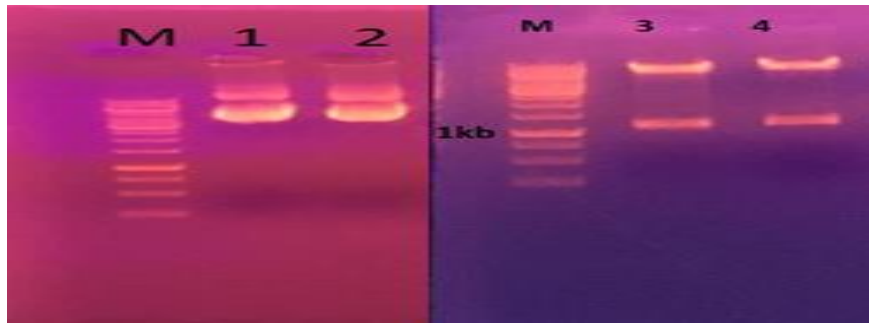


Şekil 4.1: İnsört 1, insört 2 ve insört 3 dizilerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri.

M: "Marker" DNA, 1 ve 2: ght5 tam boy ürünü ; 3: Promotörlü ght5 ürünü

4.2.2. pSLF172, pSLF173 Plazmidlerinin ve PZR Ürünlerinin Kesimi

Bölüm 3.3.9'da anlatıldığı gibi *E. coli XL10-Gold*'dan izole edilen pSLF172 ve pSLF173 plazmidlerinin doğruluğu *EcoRI* (NEB) restriksiyon endonükleazıyla kesim yapılarak kontrol edildi. Kesim reaksiyonu (Bölüm 3.3.5) sonrası agaroz jel elektroforezinde beklenen 7.3 kb ve 1.2 kb boyutlu iki bant ayrıldı (Şekil 4.2). Plazmid miktarları sırasıyla 565,8 ng/μL ve 635,6 ng/μL olarak ölçüldü.



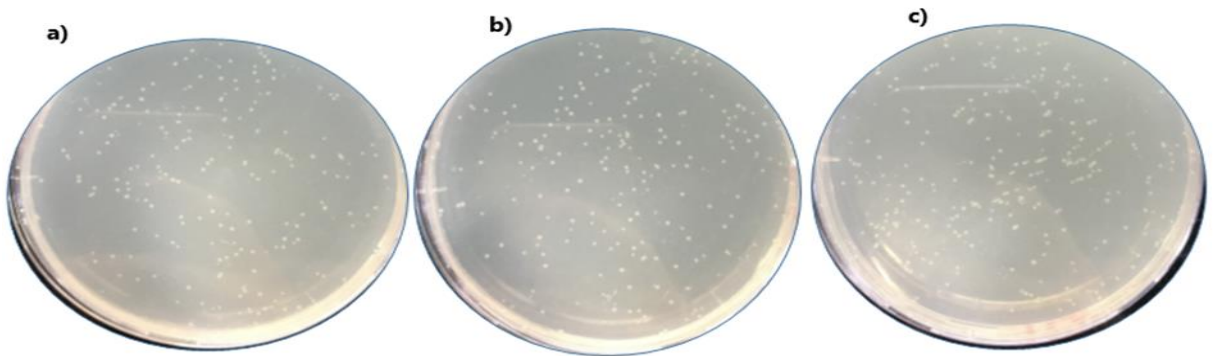
Şekil 4.2: pSLF172 ve pSLF173 plazmidlerinin *EcorI* ile kontrol kesimi

M: "Marker DNA, 1 ve 2: pSLF172'nin *EcorI* ile, 3 ve 4: pSLF173'ün *EcorI* ile kesimi

pSLF173 plazmidini *SalI* ve *SmaI* enzimleriyle ikili kesime uğratarak bir ucu küt diğer ucu yapışkan doğrusal bir plazmid elde edildi. pSLF172 plazmidini ise bir tarafta *NotI* ve *BglII*: diğer tarafta ise *NotI* ve *PstI* endonükleaz enzimleriyle kesilerek uçları farklı ve her iki ucu da yapışkan vektörler elde edildi. DNA ürünleri ise 5' ve 3' uçlarında sahip oldukları restriksiyon enzimi tanıma dizilerine göre insört 1: *SalI* ve *SmaI*, insört 2: *NotI* ve *BglII*, insört 3: *NotI* ve *PstI* ile kesildiğinde elde edilen kesim ürünleri rekombinant vektörleri oluşturmak üzere Bölüm 3.3.6'da anlatıldığı gibi elde edildi. Elde edilen ürünler insört 1: 69 ng/μL, insört 2: 66 ng/μL, insört 3: 78,25 ng/μL, pSLF173 plazmidini 208,9 ng/μL, pSLF172'nin *NotI* ve *BglII* ile kesimi sonrası 109,7 ng/μL, pSLF172'nin *NotI* ve *PstI* ile kesimi sonrası 113,2 ng/μL konsantrasyonunda elde edildi.

4.2.3. Plazmidler ile PZR Ürünlerinin Ligasyonu ve *E.coli XL10-Gold*'a Transformasyonu

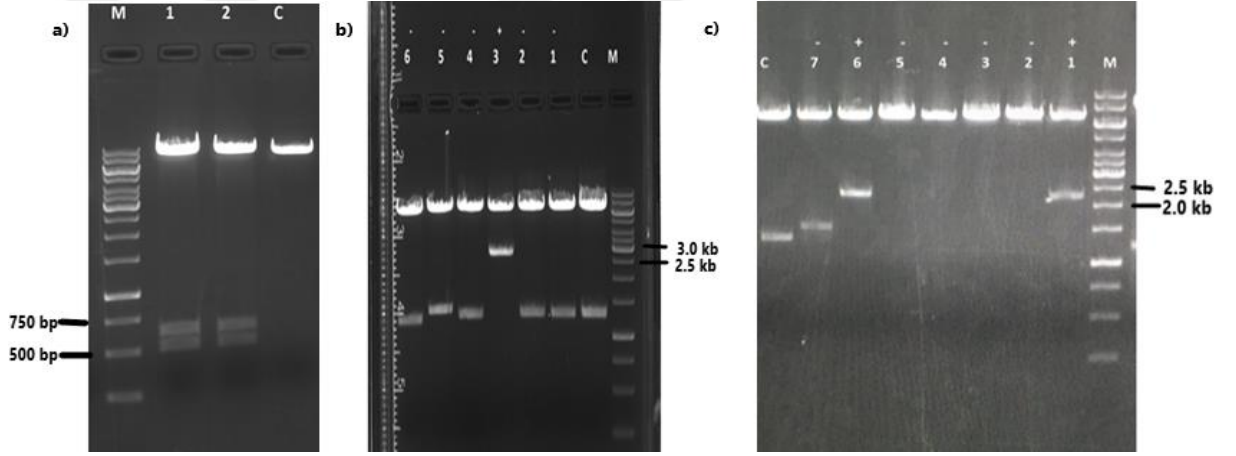
SalI ve *SmaI* enzimleriyle kesilmiş pSLF173 plazmidini aynı enzimlerle kesilmiş insört 1 ile, *NotI* ve *BglII* enzimleriyle kesilmiş pSLF172 aynı enzimlerle kesime uğratılmış insört 2 ile, *NotI* ve *PstI* ile kesilmiş pSLF172 vektörü ise aynı enzimlerle kesilmiş insört 3 ile Bölüm 3.3.7'de anlatıldığı gibi, ligasyona uğratıldı. Ligasyon sonucu elde edilen SA01, SA02 ve SA03 rekombinant plazmidleri ile pSLF173 plazmidini süper yeterli *E.coli XL10-Gold* ırkına Bölüm 3.3.8'de belirtildiği gibi transfer edildi. Transformasyon karışımlarının tamamı LBA+Amp petrilere ekildi ve 37°C'da bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucu petrilere oluşan koloni görüntüleri Şekil 4.3'te verildi. Petrilere 500-1000 koloni gözlemlendi.



Şekil 4.3: Rekombinant plazmitlerin *E. coli*'ye transformasyonu sonucu elde edilen koloniler.

a: SA01, b: SA02, c: SA03 rekombinant plazmitleri

Transformasyon sonrasında Bölüm 3.3.8’de anlatıldığı gibi plazmid izolasyonu yapıldı. İnsört 1, insört 2 ve insört 3 DNA ürünlerinin ilgili plazmidlere yerleşip yerleşmediğini kontrol etmek için Bölüm 3.3.8’de belirtildiği gibi kesim reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrası sonuçların kontrolü agaroz jel elektroforezi ile yapıldı. Enzim kesimi sonucunda SA01’in *Bam*HI+*Kpn*I ile kesimi sonucu beklenen ~ 8 kb, 0.6 kb ve 0.5 kb boyutlarındaki; SA02 plazmidinin *Pst*I+*Bam*HI ile kesimi sonucu beklenen ~ 7 kb ve 2.9 kb boyutlarındaki; SA03’ün *Pst*I+*Bam*HI ile kesimi sonucu beklenen ~ 7.2 kb ve 2.3 kb’lık DNA fragmentleri Şekil 4.4’te görülmektedir.

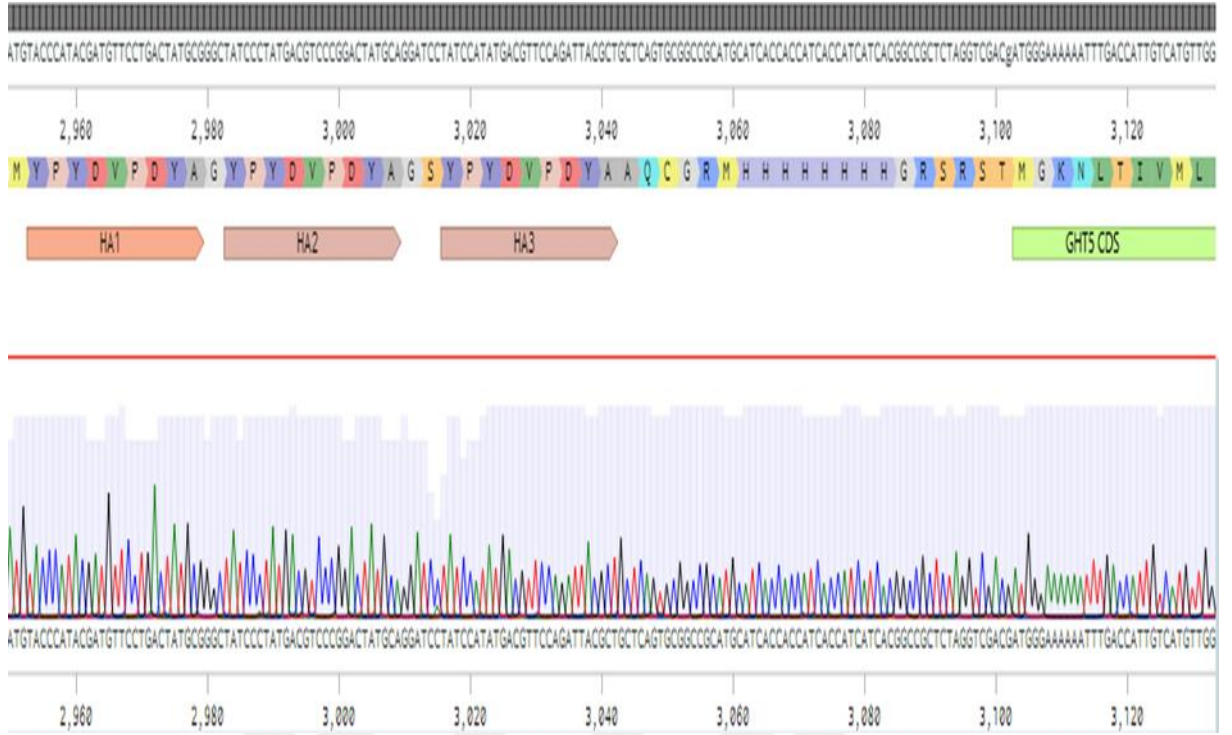


Şekil 4.4: Rekombinant plazmidlerin endonükleaz enzimleriyle kesim kontrolü.

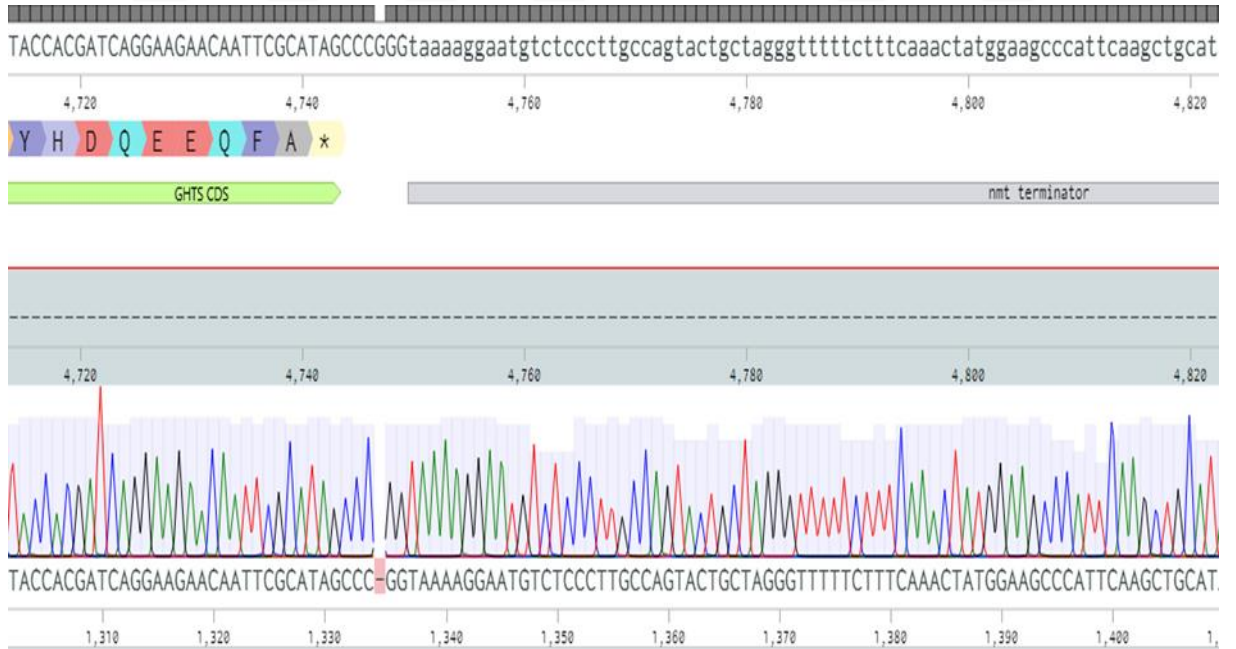
M: “Marker” DNA, C: İnsört içermeyen ve ilgili klonlamada kullanılmış boş plazmid, a: SA01 plazmidinin *Bam*HI+*Kpn*I ile kesimi 1 ve 2 pozitif, b: SA02 plazmidinin *Pst*I ve *Bam*HI ile kesimi 3 pozitif, c: SA03 plazmidinin *Pst*I+*Bam*HI ile kesimi 1 ve 6 pozitif sonuçlar.

4.2.4. Rekombinant Plazmidlerin Dizi Analizleri

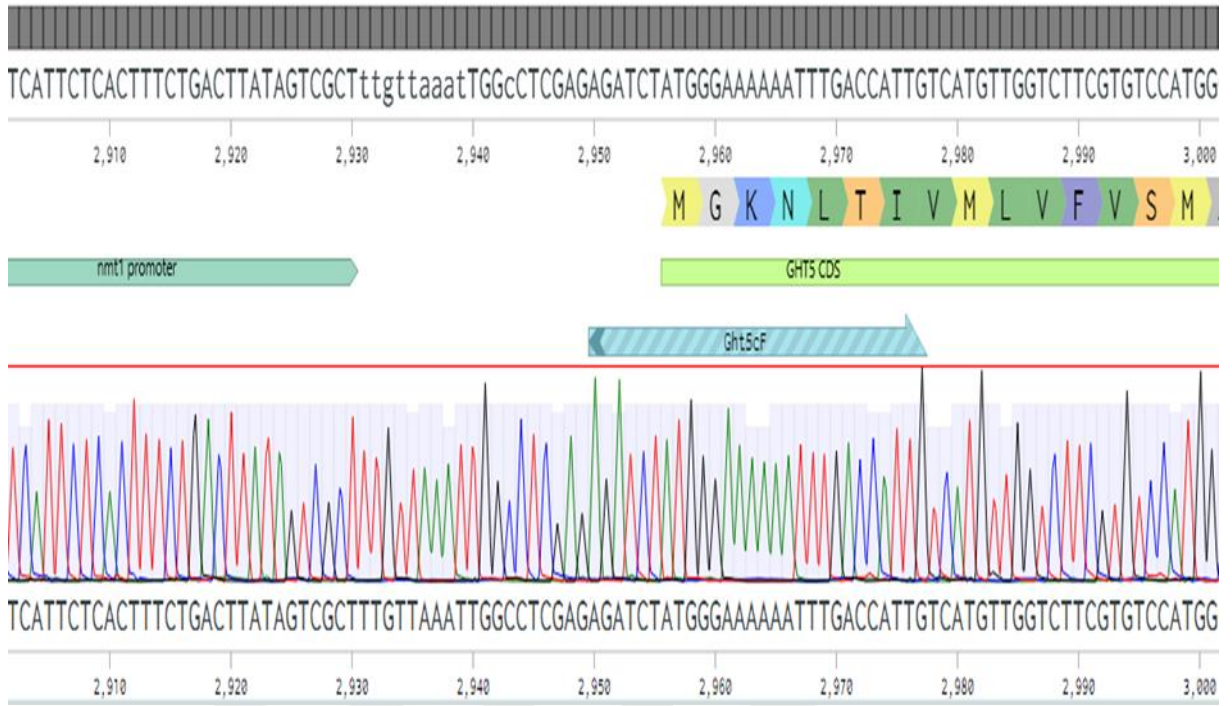
Rekomninant plazmidlerin restriksiyon enzimleri ile kesilip doğrulanmasının ardından, vektörlerin çerçeve kayması içerip içermediğinin belirlenmesi için dizi analizi yapıldı. Dizileme sonuçlarına göre *ght5* geninin tüm rekombinant plazmidler için “ATG” başlangıç kodonu ile başladığı ve HA tag ile füzyonunu gerçekleştirdiği görüldü.



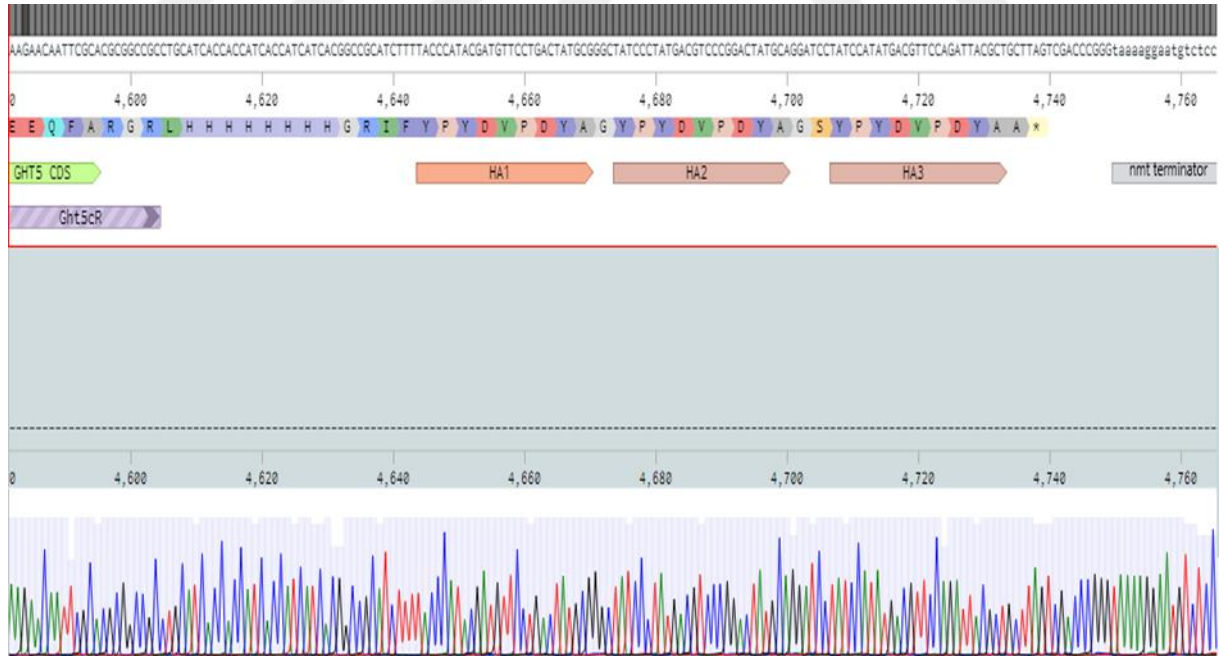
Şekil 4.5: SA01 rekombinant plazmidin *nmt1* forward primeri ile yapılan dizi okuması.



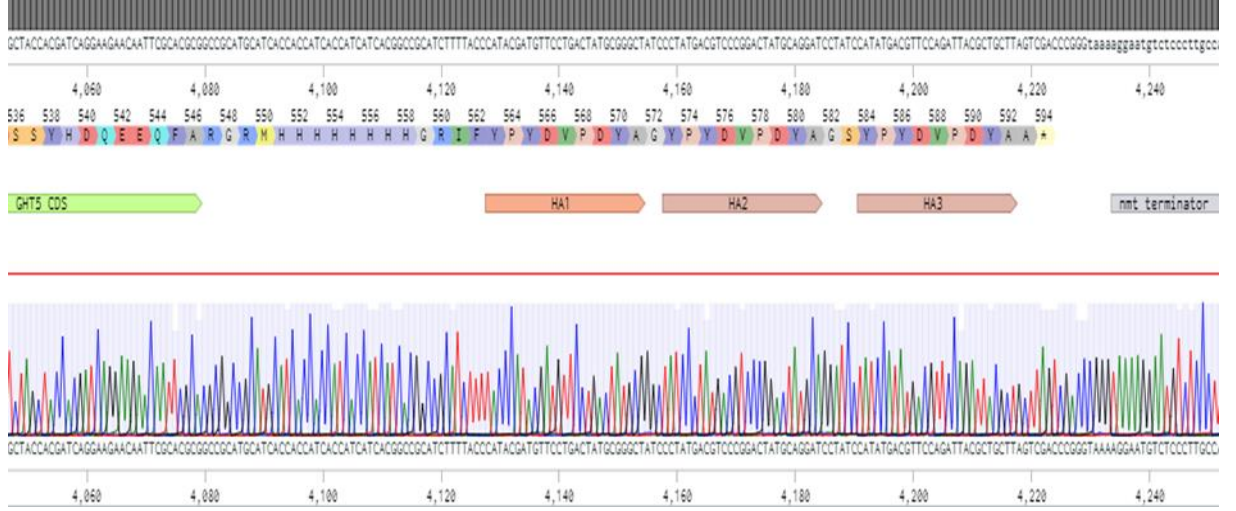
Şekil 4.6: SA01 rekombinant plazmidin *nmt1* revers primeri ile yapılan dizi okuması.



Şekil 4.7: SA02 rekombinant plazmidin *nmt1* forward primeri ile yapılan dizi okuması.



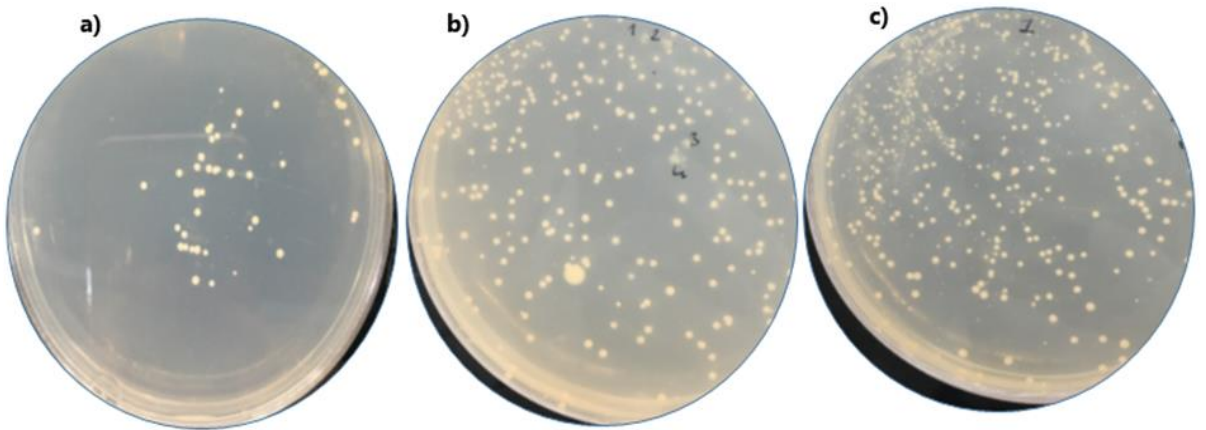
Şekil 4.8: SA02 rekombinant plazmidin *nmt1* revers primeri ile yapılan dizi okuması.



Şekil 4.9: SA03 rekombinant plazmidin *nmt1* revers primeri ile yapılan dizi okuması.

4.2.5. SA01, SA02 ve SA03 Rekombinant Plazmidlerinin *S. pombe* Parental (ED666) İrkına Transformasyonu

SA01, SA02 ve SA03 rekombinant plazmidleri *S. pombe* parental ırkına Bölüm 3.3.9’da belirtildiği gibi transfer edildi. Transformasyon karışımlarından 150-200’er μL MMA (Ade+Leu) petrilere ekildi. 30 °C etüvde 4-7 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonucu her petride farklı sayıda (50-400 koloni/petri) elde edildi. Buna göre transformasyon etkinliği ortalama $1-4 \times 10^3$ olarak hesaplandı (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: Rekombinant plazmidlerin *S. pombe*’ye transformasyonu sonucu oluşan koloniler.

a: SA01’in, b: SA02’nin, c: SA03’ün transformasyonu

4.3. REKOMBİNANT KLONLARIN ANALİZİ

4.3.1. Rekombinant Klonların Genetik Kontrolleri

Çalışmada elde edilen *S. pombe* pSLF173/Parental, SA01, SA02 ve SA03 rekombinant klonlarının seçici besi ortamlarındaki üreme durumlarına göre genotipik ve fizyolojik kontrolleri yapıldı (Tablo 4.2). Bu dört transformantta adenin, urasil, lösin genleri bakımından oksotrof oldukları ve transformasyonda kullanılan plazmid urasil sentezleyen geni taşıdığından, yalnızca MMA (Ade+Ura+Leu) ve MMA (Ade+Leu) besi ortamlarında üremişlerdir.

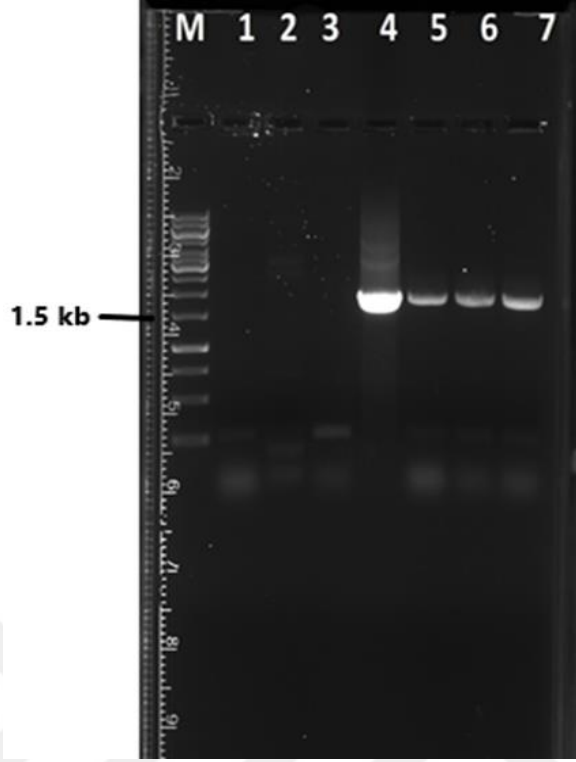
Tablo 4.2: Çalışmada kullanılan rekombinant *S. pombe* ırklarının genotipik kontrolleri.

İrklar / Besiyeri	MMA	MMA+A+U	MMA+A+L	MMA+A+U	MMA+A+U+L
pSLF173/Parental	-	-	+	-	+
SA01	-	-	+	-	+
SA02	-	-	+	-	+
SA03	-	-	+	-	+

(A: adenin, U: urasil, L: lösin, + üreme var, - üreme yok).

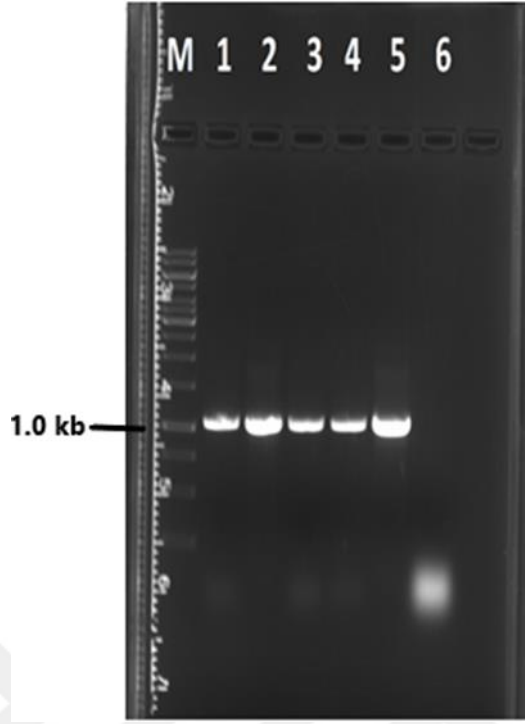
4.3.2. Rekombinant Transformant Kolonilerinin Koloni PCR ile Kontrol Edilmesi

Seçici besiyerinde üreyen koloniler uygun primer çiftleri ile koloni PZR uygulaması sonrası %1'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. Kontrol olarak kullanılan SA01 rekombinant plazmidinin ve SA01, SA02 ve SA03 rekombinant plazmidlerinin *S. pombe*'ye transformasyonu sonucu oluşan kolonilerden yapılan koloni PCR sonucunun beklenen bant boyutlarını verdiği (~ 1.0 ve ~1.5 kb) verildiği görüldü. Böylece *S. pombe* parental ırkına transformasyonunun başarılı şekilde gerçekleştiği gözlemlendi (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12).



Şekil 4.11: Rekombinant plazmidin (SA01) *Schizosaccharomyces pombe*'ye transformasyonu sonucu oluşan kolonilerin *ght5* Forward ve *nmt* Revers primerleri kullanılarak koloni PZR ile kontrolü.

1: Parental hücrenin 2: Boş plazmidin 3) Boş plazmidin transformasyonu sonucu oluşan kolonilerden birinin 4: SA01 plazmidinin 5: SA01 plazmidinin elektroporasyon ile transformasyonundan oluşan kolonilerden birinin 6 ,7: SA01 plazmidinin kimyasal transformasyonundan oluşan kolonilerin kalıp olarak kullanılması

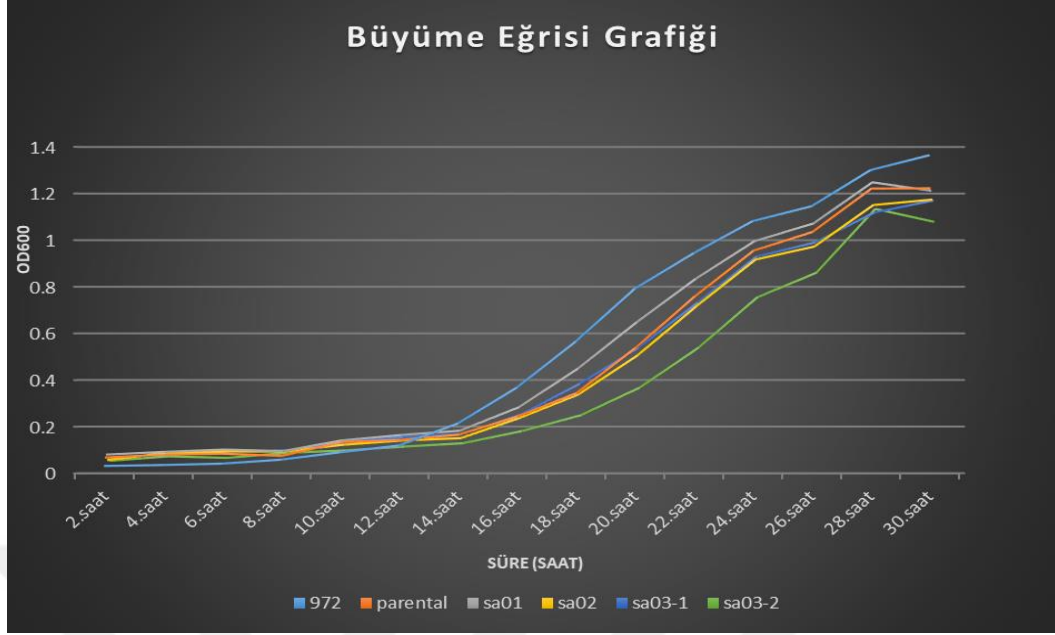


Şekil 4.12: Rekombinant plazmidlerin *S. pombe*'ye transformasyonu sonucu oluşan kolonilerin *ght5* real time forward ve *nmt* revers primerleri kullanılarak koloni pcr ile kontrolü.

1,2: SA02'nin transformasyonu sonucu oluşan kolonilerin 3,4,5: SA03'ün transformasyonu sonucu oluşan kolonilerin 6: Parental hücrenin kalıp olarak kullanılması

4.4.3. Rekombinant Klonların Belirlenen Üreme Özellikleri

Çalışmada elde edilen *S. pombe* SA01, SA02 ve SA03 rekombinant klonlarının ve yabani ırk 972h⁻ ile parental ırklarının %2 glukoz içeren MML besi ortamında üremesi izlendi. Kültürlerin başlangıç değeri OD₆₀₀'de 0,05 olacak şekilde ayarlandı ve 2 saat aralıklarla 30 saat boyunca ölçüm alındı. Her bir ırk iki tekrar ile çalışıldı. Ölçülen OD değerlerinin her bir ırk içinde kendi ortalaması alınarak Microsoft Excel programı ile grafik oluşturuldu ve üreme eğrisi elde edildi (Şekil 4.13).

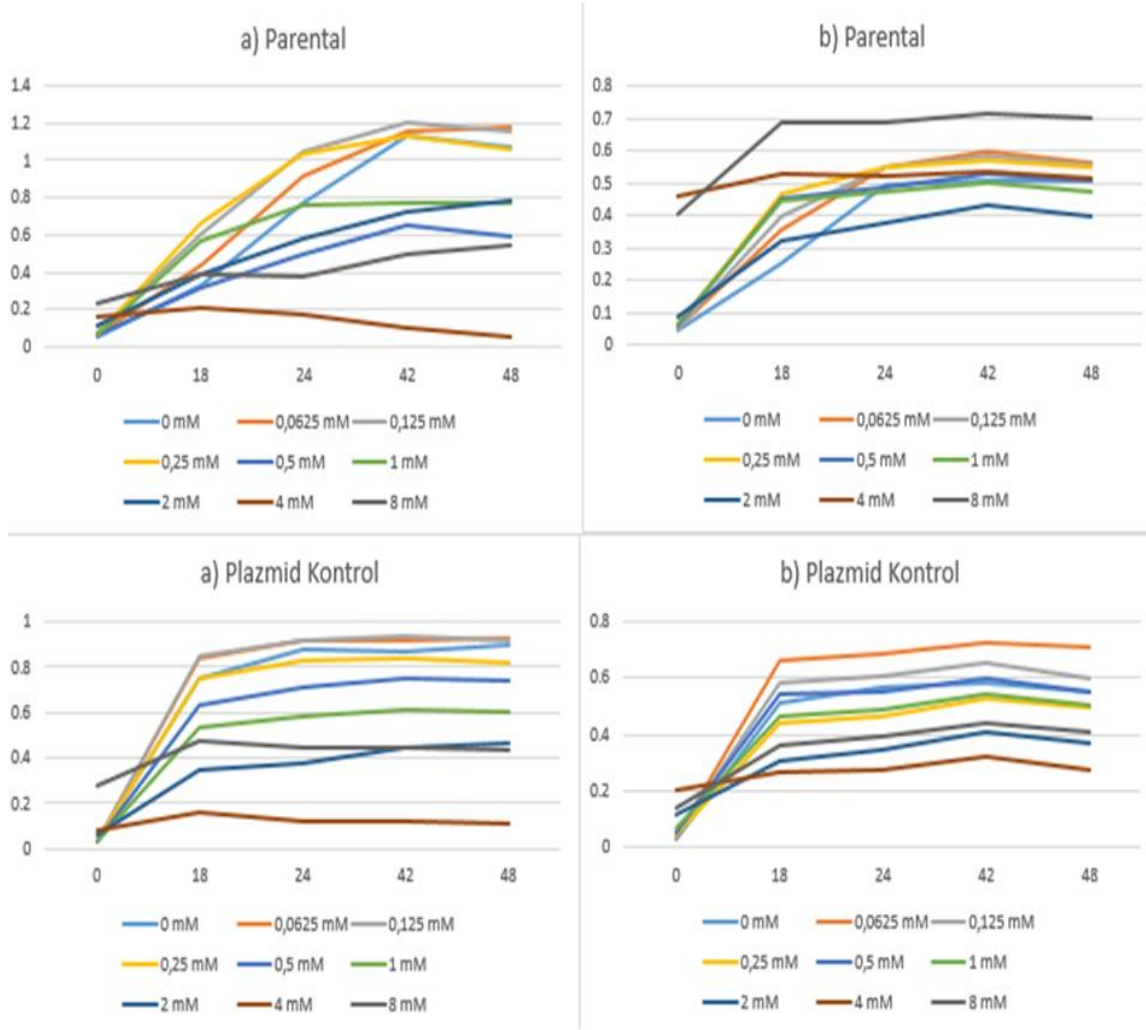


Şekil 4.13: *S. pombe* ırklarının %2 glukoz içeren MML besiyerindeki üreme eğrisi grafiği.

4.4. REKOMBİNANT VEKTÖR İÇEREN *S. pombe* IRKLARINA DEMİR STRESİ UYGULANMASI

4.4.1. Demir Stresi Uygulanan *S. pombe* Rekombinant Irklarının Üreme Grafikleri

Bu çalışmada elde edile rekombinat ve kontrol grubu olarak kullanılan parental ve parental+pSLF172 ırklarında demirin sitotoksik etkisi, karbon kaynağı olarak hem % 2 hem de % 0,5 glukoz içeren minimal besi ortamlarında (MML) farklı konsantrasyonlarda demir (0,0625 – 8 mM, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) uygulanarak takip edildi. Buna göre, tüm ırklarda %2 karbon kaynağında %0,5 karbon kaynağına kıyasla daha iyi üreme tespit edildi (Şekil 4.14). Demirin toksik etkisi her iki karbon kaynağında da 0.5 mM'dan itibaren gözlemlendi. %2 glukoz koşulunda 4 ve 8 Mm demir stresinin tüm ırklarda öldürücü olduğu görüldü. %0,5 glukoz koşulunda demir konsantrasyonlarına bağlı gelişen toksik etki arasında, %2 glukozdaki gibi bir korelasyon kurulamadı.



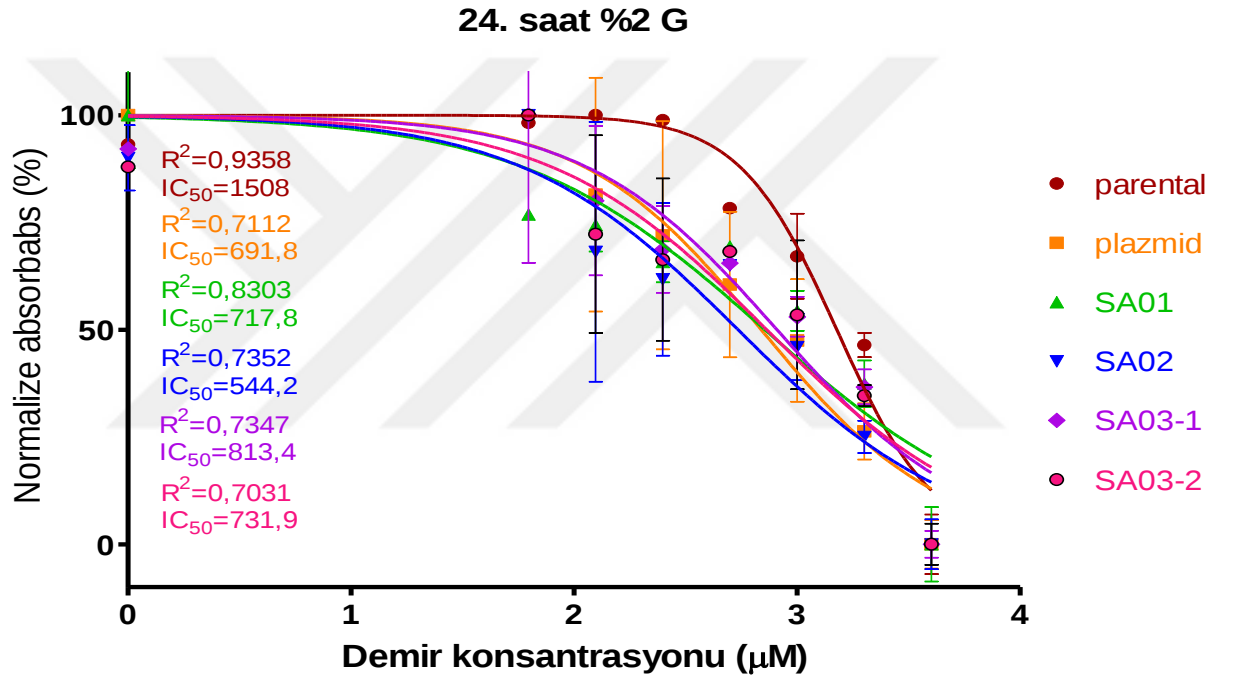
Şekil 4.14: Parental ve rekombinant plazmid içeren *S. pombe* ırklarının farklı demir konsantrasyonları içeren besiyerlerinde üreme grafikleri (a: %2 glukozlu MML, b: %0,5 glukozlu MML besiyeri).



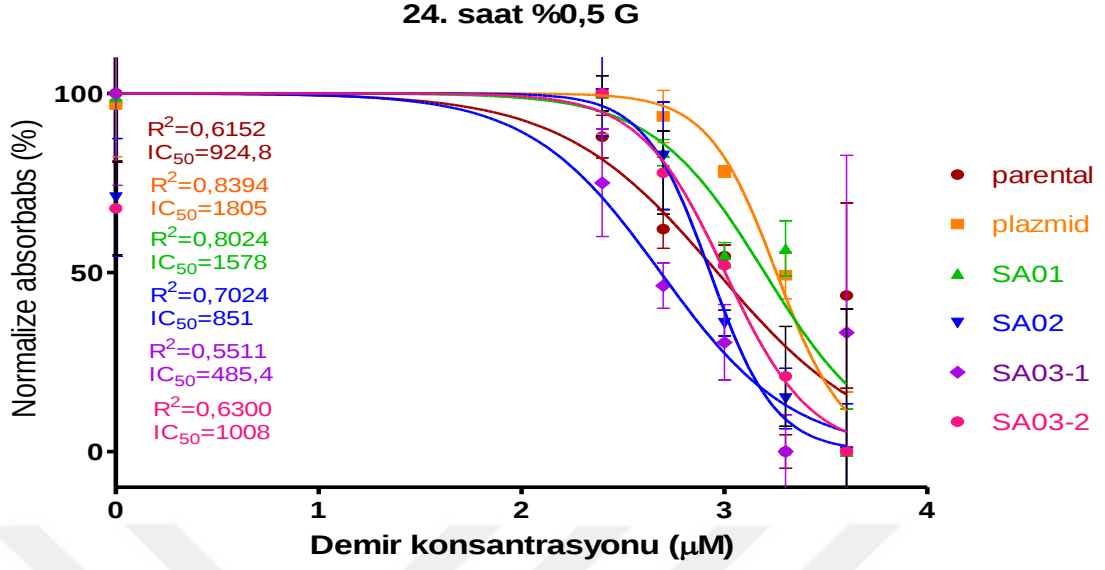
Şekil 4.14 (devam): Parental ve rekombinant plazmid içeren *S. pombe* ırklarının farklı demir konsantrasyonları içeren besiyerlerinde üreme grafikleri (a: %2 glukozlu MML, b: %0,5 glukozlu MML besiyeri).

4.4.2. *S. pombe* Rekombinant İrklarında Demirin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MIC) Belirlenmesi

Bu çalışmada elde edilen ve kullanılan tüm ırklarda demirin minimum inhibisyon konsantrasyonu 24.saatteki canlılıkları değerlendirilerek hesaplandı. Yüksek (%2) glukozlu ve düşük (%0,5) glukozlu MML besi ortamında, tüm ırklardaki IC₅₀ değerinin : 0.5 - 1.5 mM demir konsantrasyonu aralığında olduğu tespit edildi (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).



Şekil 4.15: %2 glukoz içeren MML besiyerinde , parental ve rekombinant plazmid içeren *S. pombe* ırklarındaki demir toksisite değerleri.



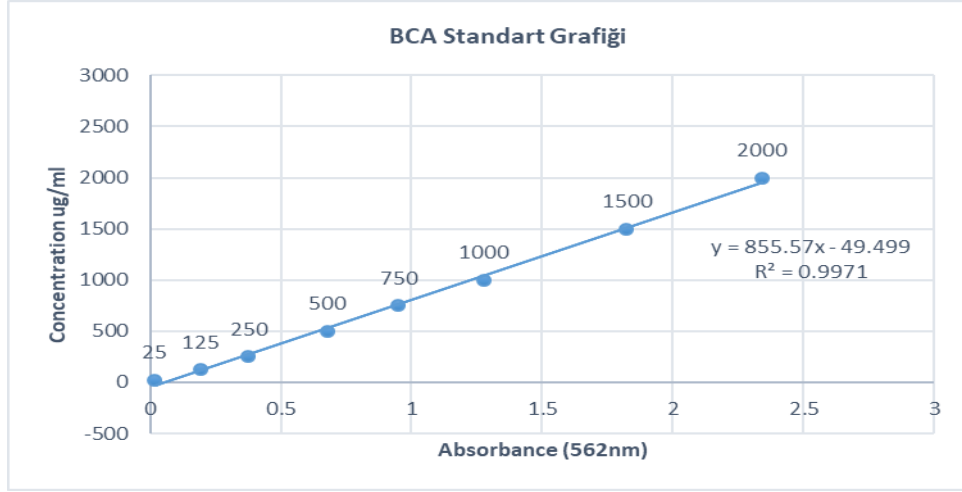
Şekil 4.16: %0,5 glukoz içeren MML besiyerinde , parental ve rekombinant plazmid içeren *S. pombe* ırklarındaki demir toksisite değerleri.

4.5. PROTEİN İZOLASYONU SONUÇLARI

Rekombinant vektörlerin parental ırkına transformasyonunun ardından, Ght5-HA füzyon proteininin transformant ırklarda üretildiğini tespit etmek ve yüksek ve düşük glukoz içeren besiyerinde transformant ırklarda minimal inhibisyon gösteren demir konsantrasyonlarının *ght5* geninin anlatımı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, demir stresi uygulanmış ve uygulanmamış tüm *S. pombe* ırklarından total protein izolasyonu yapıldı. İzole edilen proteinlerin konsantrasyonları nanodropta ölçülerek veya Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific/23225) kullanılarak belirlendi. Ardından western blot ile proteinlerin varlığı gösterildi.

4.5.1. Protein Miktarları ve SDS PAGE Sonucu

Protein konsantrasyonlarının belirlenmesi için nanodrop cihazı kullanılırken ölçümler A280 nm’de yapıldı (Tablo 4.3). Pierce BCA Protein Assay Kiti kullanılırken ise, önce ilk olarak kitin önerdiği konsantrasyonlarda hazırlanan BSA serilerinin 562 nm’de ölçümü alındı ve bir standart grafik oluşturuldu (Şekil 4.17).



Şekil 4.17: BSA standart grafiği.

Grafikten “ $y = 855.57x - 49.499$ ” formülü elde edildi. $R^2 = 0.9971$ elde edildiği ve 1’e yakın olduğu için standart grafiğin başarılı şekilde oluşturulduğu kabul edildi. Grafikteki formülde protein örneklerinin OD değerleri formülde x değeri yerine koyularak, protein konsantrasyonları (y değeri) belirlendi. Grafikteki formülün kullanılmasıyla proteinlerin miktarı belirlendi. İzole edilen protein örneklerinin 562 nm dalga boyundaki OD değerleri formülde yerine koyularak (y değeri), protein miktarları (x değeri) hesaplandı (Tablo 4.4).

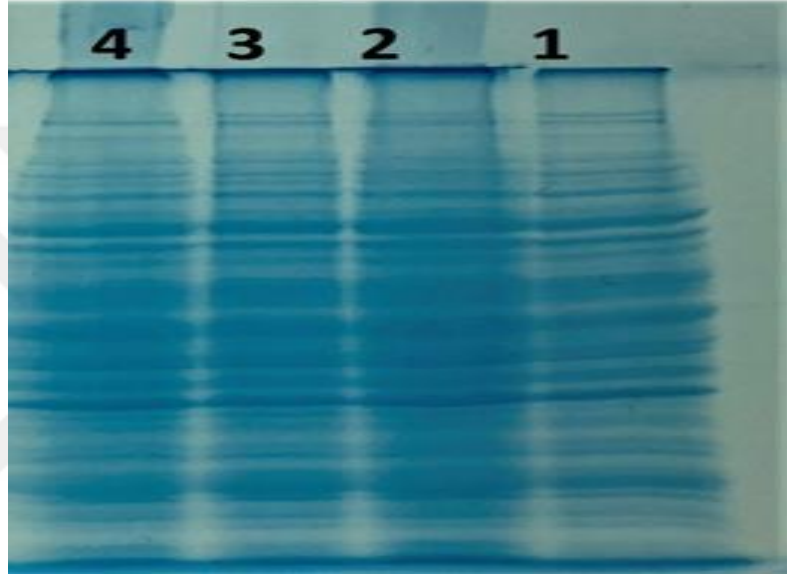
Tablo 4.3: *S. pombe* ırklarının protein örneklerinin miktarları (Nanodrop).

<i>S.Pombe</i> Irkları	Konsantrasyon(mg/mL)
1) Parental	25
2) SA01	20
3) SA02	20
4) SA03	35

Tablo 4.4: *S. pombe* ırklarının protein örneklerinin miktarları (Pierce BCA Kit).

<i>S.Pombe</i> Irkları	Konsantrasyon(ug/mL)
1) Parental	9.7
2) SA03-%0,5 glukoz-0 mM demir	4.9
3) SA03-%0,5 glukoz-0.5 mM demir	6.6
4) SA03-% 0,5 glukoz-1 mM demir	5.6
5) SA03-% 0,5 glukoz-2 mM demir	6.9
6) SA03-%2 glukoz-0 mM demir	4.4
7) SA03-%2 glukoz-0.5mM demir	8.2
8) SA03-%2 glukoz-1 mM demir	7.4
9) SA03-%2 glukoz-2 mM demir	3.6

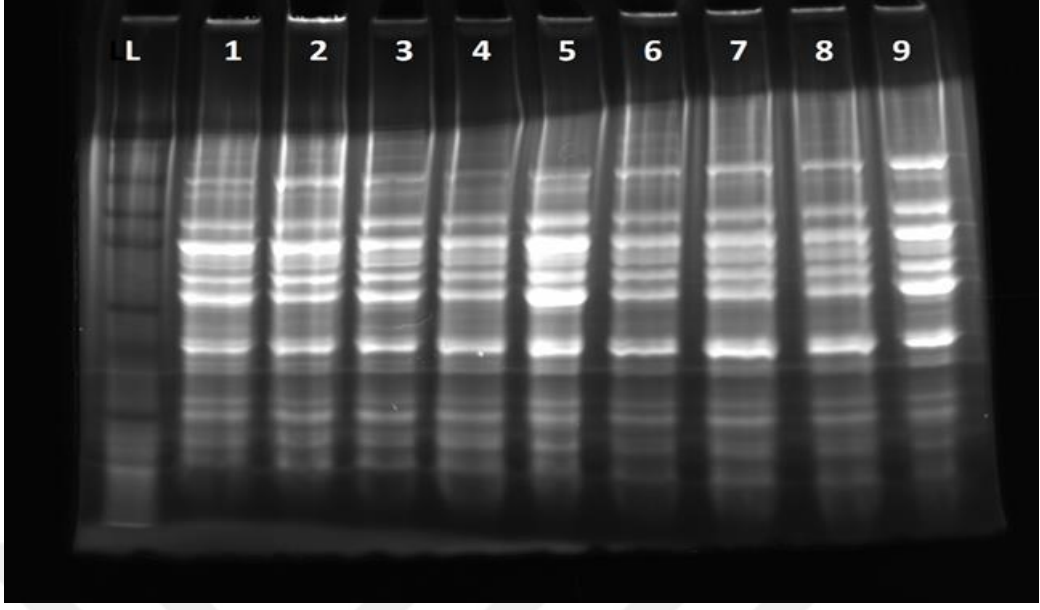
İzole edilen protein miktarların SDS-PAGE ve western blot için yeterli olduğu tespit edildi. Ardından, örnekler SDS-PAGE jelde yürütülerek western blot için kullanılabilirliği gözlemlendi. Her örnekten 90-100 μ g arası protein yüklenerek jelde yürütüldü ve ardından manuel olarak hazırlanan jel coomassie brilliant blue ile boyandı. Boya ağartma işleminin ardından jel görüntüsünde her protein örneğinin kaliteli bir protein paternine sahip olduğu ve western blotta kullanılabileceği tespit edildi (Şekil 4.18).



Şekil 4.18: Protein örneklerinin SDS PAGE görüntüsü.

1: Parental, 2: SA01, 3: SA02, 4:SA03

Biorad, TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit ile hazırlanan jele yüklenen protein örnekleri ise yürütüldükten sonra UV 302 nm’de görüntülendi. Görüntüleme sonucu izole edilen proteinlerin patternlerinde herhangi bir sıkıntı olmadığı ve western blotta kullanılabileceği anlaşıldı (Şekil 4.17).

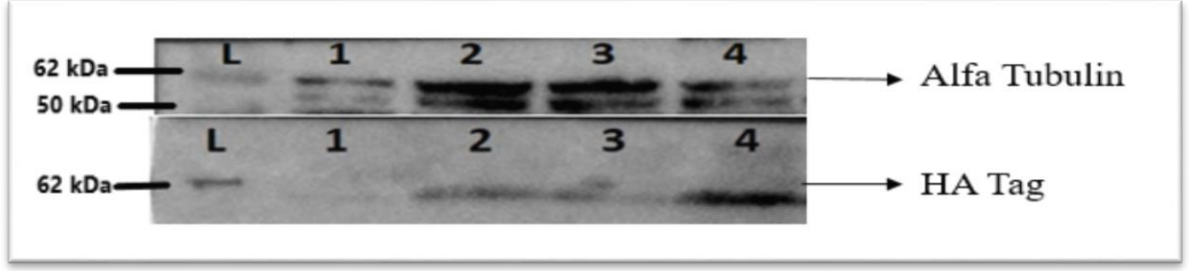


Şekil 4.19: Protein örneklerinin SDS PAGE görüntüsü (Kit ile).

L:Protein ladder, 1: Parental, 2: SA03-%0,5 glukoz-0 mM demir, 3:SA03-%0,5 glukoz-0.5 mM demir, 4:SA03-% 0,5 glukoz-1 mM demir, 5: SA03-% 0,5 glukoz-2 mM demir, 6: SA03-%2 glukoz-0 mM demir, 7: SA03-%2 glukoz-0.5mM demir, 8: SA03-%2 glukoz-1 mM demir, 9: SA03-%2 glukoz-2 mM demir

4.5.2.Western Blot Sonucu

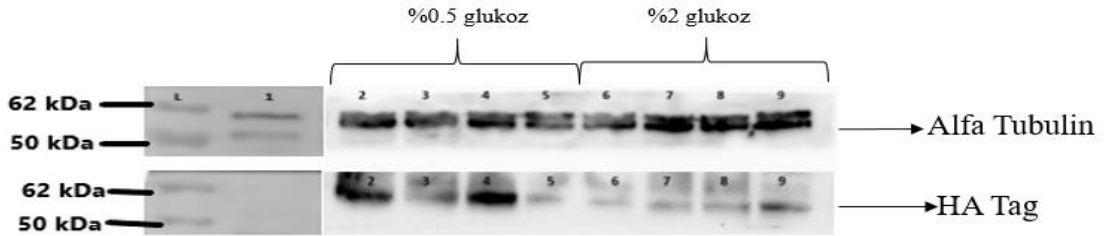
Western blot'ın çalıştığı hem α -tubulin hem de HA tag antikorların substrat ile ışıma vermesi sonucu kanıtlandı. Protein yüklemeinin tüm örnekler için aynı olduğunu doğrulamak ve hedef proteini normalize etmek için referans proteini olarak α -tubulin kullanıldı. α -tubulinin tüm *S. pombe* ırklarında ışıma verdiği gözlenirken, HA tag füzyonu gerçekleştirilmiş olan Ght5 proteinin sadece SA01, SA02 ve SA03 rekombinant transformant ırklarında ışıma verdiği gözlemlendi. Western blot analizi ile ght5 – HA tag füzyon geninin hücrede translasyonunun yapıldığı kanıtlandı (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: Western blot sonucu.

L:Ladder, 1: Parental, 2: SA01, 3: SA02, 4:SA03

Ayrıca, Bölüm 3.4.3'te anlatıldığı gibi, SA03 transformant *S. pombe* ırkına %0,5 ve %2 glukoz içeren MML (Ade+Leu) besiyerinde farklı derişimlerde demir stresi uygulanarak, demir stresinin *ght5* geninin anlatımına olan etkisine bakıldı. Referans proteini olarak kullanılan α -tubulin proteininin tüm koşullarda benzer parlaklıkta olduğu gözlemlendi. Demir stresi uygulanmayan SA03 ırkında %0,5 glukoz içeren ortamda, %2 glukoz içeren ortamda üretilene göre daha koyu ve kalın bir bant gözlemlendi. %0,5 glukoz içeren ortamda 1 mM demir içeren koşulda oldukça koyu ve kalın bir bant gözlenirken, 0.5 mM ve 2 mM demir stresinde daha açık bantların gözlenmesi, demirin *ght5* geninin anlatımı üzerinde etken olabileceğini biraz daha kuvvetle göstermektedir. Buna ek olarak, %2 glukoz içeren ortamda üretilen SA03 ırkından elde edilen bantlar, %0,5 glukoz ortamındakilere kıyasla daha açık olmakla beraber, artan demir stresine bağlı belirginleşen Ght5-HA bantlarının görülmesi, bu tezimizi daha da kuvvetlendirmektedir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21: SA03 için western blot sonucu.

1:Parental, 2: SA03-%0,5 glukoz 0 mM demir, 3:SA03-%0,5 glukoz-0.5 mM demir, 4:SA03-% 0.5 glukoz-1 mM demir, 5: SA03-% 0.5 glukoz-2 mM demir, 6: SA03-%2 glukoz-0 mM demir, 7: SA03-%2 glukoz-0.5mM demir, 8: SA03-%2 glukoz-1 mM demir, 9: SA03-%2 glukoz-2 mM demir

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Demir, hemen hemen tüm organizmalar için temel bir geçiş metalidir. Elektron alma ve verme özelliğiyle demir, birçok redoks reaksiyonunun biyolojik olarak kritik bir bileşenidir (Kaplan, 2009; Hentze, 2010; Cyert, 2013). Demirin biyolojik süreçlerde etken olmasını sağlayan özellikleri, onu aynı zamanda hücreler için de toksik hale getirmektedir. Demir fazla miktarda bulunduğu, O₂ ile etkileşir ve DNA, proteinler ve lipidler dahil hücresel makromoleküllerde oksidatif hasara neden olabilen reaktif oksijen türlerini üretir. Toksik oksidanları toksik olmayan ürünlere dönüştüren sistemlere ek olarak hücreler, transmembran demir taşınımını kontrol ederek ve toksik olmayan formlarda demiri izole ederek hücresel demir seviyelerini düzenlerler (Halliwell, 1992; Labbe ve diğ., 2007).

Ökaryotlarda enerji tüketen hücresel süreçlerin sürdürülmesi için gerekli olan temel karbon ve enerji kaynağı, glukoz, aynı zamanda çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde etkin rol oynayan önemli bir sinyal molekülüdür (Özcan ve Johnston, 1999; Crabtree, 1999; Rolland ve diğ., 2002). Tek hücreli ökaryot olarak *Saccharomyces cerevisiae* ve *Schizosaccharomyces pombe* gibi mayalar, glukozun gerek metabolize edilmesi gerekse hücresel süreçlerdeki düzenleyici rollerin araştırılmasında kullanılan önemli model organizmalardır. Mayalarda, glukoz varlığında alternatif karbon kaynaklarının (sukroz, fruktoz, mannoz, galaktoz vb.) kullanımı, solunum, stres yanıt yolları ve sporulasyon baskılanırken (katabolit represyon, glukoz baskılaması, represyon), heksos taşıyıcıların sentezi, glikoliz ve fermentasyon aktive edilir (glukoz aktivasyonu, indüksiyon) (Johnston, 1999; Özcan ve Johnston, 1999).

S. pombe genomunda sekiz farklı heksoz taşıyıcı tanımlanmıştır (Heiland ve diğ., 2000; Pombase database, [http:// www.pombase.org/](http://www.pombase.org/)). Bunlar *ght1*, *ght2*, *ght3*, *ght4*, *ght5*, *ght6*, *ght7* ve *ght8* olarak sıralanır (Saitoh ve diğ., 2014). Her taşıyıcı protein glukoz ve/veya ilgili monosakkaritler için farklı bir afiniteye sahiptir. Bu taşıyıcı proteinlerin arasında, yüksek glukoz varlığında *ght5*, *ght6* ve *ght8*'in anlatımları artarken, düşük glukoz varlığında sadece *ght5*'in anlatımı artmaktadır (Saitoh ve diğ., 2014).

Anlatımları glukoz sinyaline göre düzenlenen heksoz taşıyıcılarının, *S. pombe*'de ısı şoku, ozmotik, oksidatif ve ağır metal stresi gibi çeşitli faktörlerle etkileşimine ait yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bununla birlikte, literatürde, *S. cerevisiae*'de yüksek glukoz affiniteli *HXT2* ve *HXT4*'ün transkripsiyonlarının ozmotik stresle düzenlendiği (Türkel, 1999), glukoz

baskılama koşulunda, aşırı demirin toksik olduğu (Wiśnicka ve diğ., 1997), nikel ve kurşunun olmadığını (Soares ve diğ., 2003) ve bazı heksoz taşıyıcılarının arseniğin hücre içine alımını kolaylaştırdığını (Liu ve Rosen, 2004) rapor eden çalışmalara rastlanmaktadır. Ayrıca, glukoz varlığında, *HXT4*'ün transkripsiyonun demir ile 3 kat, kadmiyum ile 5 kat arttırdığı, buna karşın glukozun bulunmadığı (dereprese) koşulda, bu metallerin *HXT4*'ün transkripsiyonunu değiştirmediği bulunmuştur (Türkel, 2013). Bu kapsamda, araştırma grubumuz tarafından geliştirilen oksidatif strese karşı, glukoz açlığına bağlı adaptif bir stres yanıtı sergileyen *S. pombe* ird5'de ve kalori kısıtlamasına bağlı olmaksızın daima dirençli olan *S. pombe* ird11'de (Kıg ve diğ., 2005; Palabıyık ve diğ., 2012; Palabıyık ve diğ., 2013; Palabıyık ve diğ., 2014) glukoz varlığına (glukoz baskılama koşulu) rağmen, oksidatif stress altında tüm heksoz taşıyıcı proteinleri şifreleyen genlerinin arasında sadece *ght5* geninin transkripsiyonunun arttığı rapor edilmiştir (Kına ve Palabıyık, 2019). Devam eden çalışmalarımızda, başka bir oksidatif stres ajanı olan demirin glukoz alımını gerçekleştiren heksoz taşıyıcıları üzerindeki etkisi, *S. pombe* yabancı ırkında 2 ve 5 mM demir stresi altında, araştırıldı. Buna göre, sadece *ght5* geninin transkripsiyonunun glukoz baskılama koşulunda, artan demir dozu ile önemli ölçüde azaldığı gösterildi (Özkan ve diğ., 2019). İlk kez bu çalışma ile yüksek afiniteli heksoz taşıyıcısı olarak, Ght5 proteininin, demir stresinin algılanması ve sinyallenmesinde rol oynayabileceği öne sürülmüştür.

Bu nedenle, sunulan tez kapsamında ilk olarak, *ght5* geni hem 5' ucunda hemde 3' ucunda HA epitopu füzyonu oluşturulması için düzenlenebilir güçlü bir promotöre sahip olan pSLF173 ve pSLF172 plazmidlerine, sırasıyla klonlandı. Elde edilen HA-ght5- pSLF173 ve ght5- HA-pSLF172 rekombinant plazmidleri restriksiyon enzimleri (Şekil 4.4) ve sekans analizi ile doğrulandıktan (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8) sonra *S. pombe* parental ED666 ırkına transfer edilerek SA01 ve SA02 adı verilen *S. pombe* ırkları elde edildi. Irkların kontrolleri önce koloni PZR ile yapıldı (Şeki 4.11, Şekil 4.12). Bu klonlama çalışmasında konak olarak kullanılan parental ırkın kendi *ght5* geni bulunmaktadır. Ancak, SA01 ve SA02 ırklarında *nmt1* promotörü kontrolünde gerçekleşen *ght5* geninin anlatımı, HA epitopuna komplementer tasarlanan HA antikorumun western melezleme tekniğinde beklenen HA-Ght5/Ght5-HA protein bantının gözlenmesi ile takip edildi (Şekil 4.120). Bu deneyde, sistemin işleyişi referans proteini olarak α -tubulin proteini kullanılarak da doğrulanmıştır. Ek olarak, SA01,SA02 ırklarının üretildiği sentetik minimal besiyerinde kullanılan YNB'nin içindeki 0,4 μ g/mL tiaminin (Tablo 3.2) bulunması, *nmt1* promotörünü baskılamadığı anlaşılmıştır. Zaten, *S.*

pombe nmt1 promotörünün >5 µg/mL thiamin varlığında baskılandığı bilinmektedir (Forsburg ve Sherman, 1997). Bu deneyde varılan bir diğer sonuç da, HA epitopunun Ght5 proteinin karboksi ya da amino ucunda olmasının (Ght5-HA ya da HA-Ght5) fark etmediği, her iki durumda da çalıştığıdır.

İkinci olarak, *ght5* geninin demir stresinin algılanması ve sinyalizasyonundaki işlevinin araştırılmasında model olarak kullanılacak *S. pombe* ırkının geliştirilmesi için yukarıdaki klonlama stratejisi tekrarlandı. Bu kez, *ght5* geni kendi promotörü ile *nmt1* promotörü çıkarılan pSLF172 plazmidine klonlanarak promotörlü ght5-HA pSLF172 rekombinantı elde edildi. Restriksiyon enzim kesimleri ve sekans analizi ile doğrulanan rekombinant plazmid yine *S. pombe* ED666 ırkına transfer edildi. Promotörlü ght5-HA pSLF172 rekombinant plazmidini içeren *S. pombe* ırkı, sekans analizi (Şekil 4.9) ve koloni PZR ile doğrulandıktan sonra SA03 olarak adlandırıldı (Şekil 4.12).

Yüksek glukoz varlığında *ght5*, *ght6* ve *ght8* genlerinin anlatımları artarken, düşük glukoz varlığında sadece ght5'in anlatımının arttığı bilindiğinden (Saitoh ve diğ., 2014), bu tez çalışması kapsamında yapılan çalışmalarda elde edilen SA01, SA02 ve SA03 ırklarının yanında kontrol grubu olarak parental ve pSLF173 plazmidini içeren parental ırklarında demirin (0,0625 – 8 mM, FeCl₃.6H₂O) sitotoksik etkisi, glukoz baskılamasının olduğu (% 2 glukoz) ve olmadığı (% 0.5 glukoz) koşullarda izlendi. Buna göre, tüm ırklarda %2 glukoz varlığında %0,5 glukoz varlığına kıyasla daha iyi üreme tespit edildi (Şekil 4.14). Bu durum, *S. pombe* yabancı ırkında, glukoz baskılama koşulunda, 2 ve 5 mM demir konsantrasyonlarına maruz kalan hücrelerde glukoz tüketiminin 1,5 kat arttığını (Özkan ve diğ., 2019) rapor eden grubumuz tarafından çıkarılan bu çalışma ile de desteklenmektedir. Demirin toksik etkisi her iki karbon kaynağında da 0.5 Mm'dan itibaren gözlemlendi. %2 glukoz koşulunda 4 ve 8 mM demir stresinin tüm ırklarda öldürücü olduğu; %0,5 glukoz koşulunda, %2 glukozdaki gibi demir konsantrasyonlarına bağlı gelişen toksik etkide bir korelasyon kurulamadı. Bu deney sonuçları kullanılarak GrapPad 5.0 da tüm ırklar için minimum inhibisyon konsantrasyonları 24. saatteki canlılıkları değerlendirilerek hesaplandı. Yüksek (%2) ve düşük (%0,5) glukoz koşulunda, tüm ırklardaki IC₅₀ değerinin 0.5 - 1.5 mM demir konsantrasyonu aralığında olduğu tespit edildi (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).

Yüksek (%2) ve düşük (%0,5) glukoz koşullarında ve farklı derişimlerde (0, 0.5, 1 ve 2 mM) demir uygulanarak üretilen SA03 ırkında, kendi promotörü kontrolünde gerçekleşen *ght5*

geninin anlatımı, HA epitopuna komplementer tasarlanan HA antikorunun western melezleme tekniğinde beklenen Ght5-HA protein bantının gözlenmesi ile incelendi (Şekil 4.21). Bu deneyde, referans proteini olarak kullanılan α -tubulin proteininin tüm koşullarda benzer parlaklıkta olduğu önemlidir. Demir stresi uygulanmayan SA03 ırkında %0,5 glukoz içeren ortamda, %2 glukoz içeren ortamda üretilene göre daha koyu ve kalın bir bant gözlenmesi yüksek glukoz affiniteli olduğu bilinen *ght5* geninin anlatım profilini doğrulamaktadır (Heiland ve diğ., 2000; Saitoh ve diğ., 2015). %0,5 glukoz içeren ortamda 1 mM demir içeren koşulda oldukça koyu ve kalın bir bant gözlenirken, 0.5 mM ve 2 mM demir stresinde daha açık bantların gözlenmesi, demirin *ght5* geninin anlatımı üzerinde etken olabileceğini biraz daha kuvvetle göstermektedir. Buna ek olarak, %2 glukoz içeren ortamda üretilen SA03 ırkında, %0,5 glukoz ortamındakiler kıyasla daha açık olmakla beraber, artan demir stresine bağlı belirginleşen Ght5-HA bantlarının görülmesi, bu tezimizi daha da kuvvetlendirmektedir.

Sonuç olarak, SA03 ırkında represe ve dereprese koşullarda değişen demir stresine karşı gözlenen Ght5-HA protein bantlarındaki farklılık, demir stresinin algılanması ve sinyalizasyonunda *ght5* geninin, önemli rol oynadığını düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., 2000, The genome sequence of *Drosophila melanogaster*, *Science*, 287 (5461), 2185-2195.
- Askwith, C., Kaplan, J., 1997, An oxidase-permease-based iron transport system in *Schizosaccharomyces pombe* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of biological chemistry*, 272 (1), 401-405.
- Benchling, 2021, <http://www.benchling.com>, [Ziyaret tarihi: 8 Haziran 2021].
- Boles, E., Hollenberg, C.P., 1997, The molecular genetics of hexose transport in yeasts, *FEMS microbiology reviews*, 21 (1), 85-111.
- Clark, D.P., 2009, *Molecular biology*: academic cell update edition, Academic Press, China
- Cyert, M.S., Philpott, C.C., 2013, Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, 193 (3), 677-713.
- de Jong-Gubbels, P., van Dijken, J.P., Pronk, J.T., 1996, Metabolic fluxes in chemostat cultures of *Schizosaccharomyces pombe* grown on mixtures of glucose and ethanol, *Microbiology*, 142 (6), 1399-1407.
- Decottignies, A., Goffeau, A., 1997, Complete inventory of the yeast ABC proteins, *Nature genetics*, 15 (2), 137-145.
- Decottignies, A., Sanchez-Perez, I., Nurse, P., 2003, *Schizosaccharomyces pombe* essential genes: a pilot study, *Genome research*, 13 (3), 399-406.
- Egel, R., 2004, *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*, Springer, ISBN 978-3642056314.
- Fiechter, A., Fuhrmann, G., Käppeli, O., 1981, Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells, *Advances in microbial physiology*, 22, 123-183.
- Forsburg, S.L., 2003, Introduction of DNA into *S. pombe* cells, *Current protocols in molecular biology*, 64 (1), 1-8.
- Forsburg, S.L., Sherman, D.A., 1997, General purpose tagging vectors for fission yeast, *Gene*, 191 (2), 191-195.
- Fraenkel, D.G., 1982, Carbohydrate metabolism, The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: metabolism and gene expression. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY*, 1-37.
- Freitag, S.I., Wong, J., Young, P.G., 2014, Genetic and physical interaction of Ssp1 CaMKK and Rad24 14-3-3 during low pH and osmotic stress in fission yeast, *Open biology*, 4 (1), 130127.

- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., 1996, Life with 6000 genes, *Science*, 274 (5287), 546-567.
- Gomes, F.C., Pataro, C., Guerra, J.B., Neves, M.J., Corrêa, S.R., Moreira, E.S., Rosa, C.A., 2002, Physiological diversity and trehalose accumulation in *Schizosaccharomyces pombe* strains isolated from spontaneous fermentations during the production of the artisanal Brazilian cachaça, *Canadian journal of microbiology*, 48 (5), 399-406.
- Grallert, A., Hagan, I.M., 2017, Small-scale immunoprecipitation from fission yeast cell extracts, *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017 (2), pdb. prot091587.
- Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U., Loprieno, N. 1974, 395–446. *Schizosaccharomyces pombe*, Handbook of Genetics, In: King, RC (ed.), *Plenum Press*, New York.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1992, Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation an update, *FEBS letters*, 307 (1), 108-112.
- Hanyu, Y., Imai, K.K., Kawasaki, Y., Nakamura, T., Nakaseko, Y., Nagao, K., Kokubu, A., Ebe, M., Fujisawa, A., Hayashi, T., 2009, *Schizosaccharomyces pombe* cell division cycle under limited glucose requires Ssp1 kinase, the putative CaMKK, and Sds23, a PP2A-related phosphatase inhibitor, *Genes to cells*, 14 (5), 539-554.
- Heiland, S., Radovanovic, N., Höfer, M., Winderickx, J., Lichtenberg, H., 2000, Multiple hexose transporters of *Schizosaccharomyces pombe*, *Journal of bacteriology*, 182 (8), 2153.
- Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., Galy, B., Camaschella, C., 2010, Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism, *Cell*, 142 (1), 24-38.
- Hoefer, M., Milbradt, B., Höfer, M., 1992, D-Gluconate is an alternative growth substrate for cultivation of *Schizosaccharomyces pombe* mutants, *Archives of microbiology*, 157 (2), 191-193.
- Hoffman, C.S., Wood, V., Fantes, P.A., 2015, An ancient yeast for young geneticists: a primer on the *Schizosaccharomyces pombe* model system, *Genetics*, 201 (2), 403-423.
- Hresko, R.C., Kruse, M., Strube, M., Mueckler, M., 1994, Topology of the Glut 1 glucose transporter deduced from glycosylation scanning mutagenesis, *Journal of biological chemistry*, 269 (32), 20482-20488.
- Ikai, N., Nakazawa, N., Hayashi, T., Yanagida, M., 2011, The reverse, but coordinated, roles of Tor2 (TORC1) and Tor1 (TORC2) kinases for growth, cell cycle and separase-mediated mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*, *Open biology*, 1 (3), 110007.
- Johnston, M., 1999, Feasting, fasting and fermenting: glucose sensing in yeast and other cells, *Trends in Genetics*, 15 (1), 29-33.
- Kaufer, N., Gutz, H., 2016, *Yeast genetics*, <http://www.tu-braunschweig.de/en>, [Ziyaret tarihi: 8 Haziran 2021].

- Kaplan, C.D., Kaplan, J., 2009, Iron acquisition and transcriptional regulation, *Chemical reviews*, 109 (10), 4536-4552.
- Kig, C., Turkel, S., Temizkan, G., 2005, Isolation and characterization of glucose derepressed invertase mutants from *Schizosaccharomyces pombe*, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69 (12), 2475-2478.
- Kına, U.Y., Palabiyik, B., 2019, Hydrogen peroxide-induced oxidative stress upregulates ght5 gene belonging to hexose transporters in *Schizosaccharomyces pombe*, *Cellular and Molecular Biology*, 65 (1), 41-45.
- Kohli, J., Hottinger, H., Munz, P., Strauss, A., Thuriaux, P., 1977, Genetic mapping in *Schizosaccharomyces pombe* by mitotic and meiotic analysis and induced haploidization, *Genetics*, 87 (3), 471-489.
- Labbé, S., Pelletier, B., Mercier, A., 2007, Iron homeostasis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Biomaterials*, 20 (3), 523-537.
- Lang, B.F., Wolf, K., 1984, The mitochondrial genome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Molecular and general genetics MGG*, 196 (3), 465-472.
- Liu, Z., Boles, E., Rosen, B.P., 2004, Arsenic trioxide uptake by hexose permeases in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biological Chemistry*, 279 (17), 17312-17318.
- Lxoke, M., 2011, Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications, *Biotechniques*, 50 (5), 325-328.
- Maier, A., Völker, B., Boles, E., Fuhrmann, G.F., 2002, Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters, *FEMS yeast research*, 2 (4), 539-550.
- Manolescu, A.R., Witkowska, K., Kinnaird, A., Cessford, T., Cheeseman, C., 2007, Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function, *Physiology*, 22 (4), 234-240.
- Marger, M.D., Saier Jr, M.H., 1993, A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport, *Trends in biochemical sciences*, 18 (1), 13-20.
- Mata, J., Wilbrey, A., Bähler, J., 2007, Transcriptional regulatory network for sexual differentiation in fission yeast, *Genome biology*, 8 (10), 1-10.
- Maundrell, K., 1993, Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast, *Gene*, 123 (1), 127-130.
- Mercier, A., Pelletier, B., Labbé, S., 2006, A transcription factor cascade involving Fep1 and the CCAAT-binding factor Php4 regulates gene expression in response to iron deficiency in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Eukaryotic cell*, 5 (11), 1866.

- Mercier, A., Watt, S., Bähler, J., Labbé, S., 2008, Key function for the CCAAT-binding factor Php4 to regulate gene expression in response to iron deficiency in fission yeast, *Eukaryotic cell*, 7 (3), 493.
- Milbradt, B., Höfer, M., 1994, Glucose-transport-deficient mutants of *Schizosaccharomyces pombe*: phenotype, genetics and use for genetic complementation, *Microbiology*, 140 (10), 2617-2623.
- Mitchison, J.M., 1957, The growth of single cells: I. *Schizosaccharomyces pombe*, *Experimental cell research*, 13 (2), 244-262.
- Moreno, S., Klar, A., Nurse, P., 1991, Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Methods in enzymology*, 194, 795-823.
- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blench, I., Morris, H.R., Allard, W.J., Lienhard, G.E., Lodish, H.F., 1985, Sequence and structure of a human glucose transporter, *Science*, 229 (4717), 941-945.
- Ncbi, 2021, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2539240>, [Ziyaret tarihi: 8 Haziran 2021].
- Özcan, S., Johnston, M., 1999, Function and regulation of yeast hexose transporters, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63 (3), 554.
- Özkan, E., Kartal, B., Yilmazer, M., Palabiyik, B., 2019, Iron regulates hexose transporters in *Schizosaccharomyces pombe*, *Journal of basic microbiology*, 59 (5), 458-464.
- Palabiyik, B., Ghods, F.J., Ucar, E.O., 2014, A potential protective role for thiamine in glucose-driven oxidative stress, *Genetics and Molecular Research*, 13 (3), 5582-5593.
- Palabiyik, B., Jafari Ghods, F., Onay Ucar, E., 2013, Effects of glucose sensing/signaling on oxidative stress response in glucose repression mutants of *Schizosaccharomyces pombe*, *Genetics and Molecular Research*, 12 (4), 5046-56.
- Palabiyik, B., Kig, C., Pekmez, M., Dalyan, L., Arda, N. & Temizkan, G., 2012, Investigation of the relationship between oxidative stress and glucose signaling in *Schizosaccharomyces pombe*, *Biochemical Genetics*, 50, 336-49.
- Paumi, C.M., Chuk, M., Chevelev, I., Stagljär, I., Michaelis, S., 2008, Negative regulation of the yeast ABC transporter Ycf1p by phosphorylation within its N-terminal extension, *Journal of Biological Chemistry*, 283 (40), 27079-27088.
- Pelletier, B., Beaudoin, J., Mukai, Y., Labbé, S., 2002, Fep1, an iron sensor regulating iron transporter gene expression in *Schizosaccharomyces pombe*, *Journal of Biological Chemistry*, 277 (25), 22950-22958.
- Pelletier, B., Beaudoin, J., Philpott, C.C., Labbé, S., 2003, Fep1 represses expression of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* siderophore-iron transport system, *Nucleic acids research*, 31 (15), 4332-4344.

- Pluskal, T., Hayashi, T., Saitoh, S., Fujisawa, A., Yanagida, M., 2011, Specific biomarkers for stochastic division patterns and starvation-induced quiescence under limited glucose levels in fission yeast, *The FEBS journal*, 278 (8), 1299-1315.
- Pombase, 2021, <http://www.pombase.org>, [Ziyaret tarihi: 13 Temmuz 2021].
- Pouliot, B., Jbel, M., Mercier, A., Labbé, S., 2010, *abc3+* encodes an iron-regulated vacuolar ABC-type transporter in *Schizosaccharomyces pombe*, *Eukaryotic cell*, 9 (1), 59.
- Reifenberger, E., Freidel, K., Ciriacy, M., 1995, Identification of novel HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux, *Molecular microbiology*, 16 (1), 157-167.
- Reizer, J., Reizer, A., Saier Jr, M.H., 1994, A functional superfamily of sodium/solute symporters, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1197 (2), 133-166.
- Rolland, F., Winderickx, J., Thevelein, J.M., 2001, Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells, *Trends in biochemical sciences*, 26 (5), 310-317.
- Roman, D.G., Dancis, A., Anderson, G.J., Klausner, R.D., 1993, The fission yeast ferric reductase gene *frp1+* is required for ferric iron uptake and encodes a protein that is homologous to the gp91-phox subunit of the human NADPH phagocyte oxidoreductase, *Molecular and cellular biology*, 13 (7), 4342.
- Rupes, I., Jia, Z., Young, P.G., 1999, Ssp1 promotes actin depolymerization and is involved in stress response and new end take-off control in fission yeast, *Molecular biology of the cell*, 10 (5), 1495-1510.
- 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.
- Schaak, J., Mao, J.-i., Söll, D., 1982, The 5.8 S RNA gene sequence and the ribosomal repeat of *Schizosaccharomyces pombe*, *Nucleic acids research*, 10 (9), 2851-2864.
- Schmidt, M. W., Houseman, A., Ivanov, A. R. & Wolf, D. A. 2007. Comparative proteomic and transcriptomic profiling of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Molecular Systems Biology*, 3.
- Schrettl, M., Winkelmann, G., Haas, H., 2004, Ferrichrome in *Schizosaccharomyces pombe*—an iron transport and iron storage compound, *Biometals*, 17 (6), 647-654.
- Soares, E.V., Hebbelinck, K., Soares, H.M., 2003, Toxic effects caused by heavy metals in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a comparative study, *Canadian journal of microbiology*, 49 (5), 336-343.
- Tsai, C., Mitton, K.P., Johnson, B.F., 1989, Acetate assimilation by the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*, *Biochemistry and Cell Biology*, 67 (8), 464-467.

- Tsai, C., Shi, J.-L., Beehler, B., Beck, B., 1992, Enzyme activities of D-glucose metabolism in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Canadian journal of microbiology*, 38 (12), 1313-1319.
- Türkel S., 2013, Transcription of *HXT4* gene is activated by iron stress in *S. cerevisiae*, 31. *Small Meeting on Yeast Transport and Energetics*, 24-28 September, Antalya, TURKEY Abstract book: 51.
- Türkel, S., 1999, Hyperosmotic stress represses the transcription of *HXT2* and *HXT4* genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Folia microbiologica*, 44 (4), 372.
- Uldry, M., Thorens, B., 2004, The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters, *Pflügers Archiv*, 447 (5), 480-489.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., et al., 2001, The sequence of the human genome, *Science*, 291, 1304–1351.
- Wiśnicka, R., Krzepińko, A., Wawryn, J., Biliński, T., 1997, Iron toxicity in yeast, *Acta Microbiologica Polonica*, 46 (4), 339-347.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat N, Hayles J, Baker S ve diğ., 2002, The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*, *Nature*, 415, 871-80.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Sevim Nur AKYÜZ
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Necmettin Erbakan Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı