

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

**TY2 RETROTRANSPOZONU TRANSKRİPSİYONUNUN DÜZENLENMESİNE
KROMATİN MODİFİYE EDİCİ FAKTÖRLERİN ETKİLERİNİN ANALİZİ**

Bükay YENİCE

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

BURSA 2005

II

T.C
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TY2 RETROTRANSPOZONU TRANSKRİPSİYONUNUN DÜZENLENMESİNE
KROMATİN MODİFİYE EDİCİ FAKTÖRLERİN ETKİLERİNİN ANALİZİ

Bükay YENİCE

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİMDALİ

Bu tez 29/09/2005 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sezai TÜRKEKEL
(Danışman)

Prof. Dr. Naciye İŞBİL
BÜYÜKÇOŞKUN

Doç. Dr.Şule ÖZTÜRK

ÖZET:**Ty2 Retrotranspozonu Transkripsiyonunun düzenlenmesine kromatin modifiye edici faktörlerin etkilerinin analizi**

Eukaryotlarda kromatin yapısı genlerin ifadesinin kontrolüne çok fazla etki eder. Nükleozomlar ve non-histon proteinler oldukça düzenli kromatin yapısını oluşturan başlıca faktörlerdir. Kromatin yapısını değiştiren kompleksler spesifik transkripsiyon faktörlerine etki ederek veya hedef genlerin kontrol bölgelerindeki kromatin yapısını değiştirerek gen ifadesini değiştirebilirler.

Bu çalışmada Ty2-lacZ gen füzyonları ve özel mutant *S. cerevisiae* suşları kullanılarak kromatin yapısını değiştiren komplekslerin retrotranspozon Ty2-917 transkripsiyonuna etkileri araştırıldı. Retrotranspozonlar herhangi bir hastalığa neden olmazlar fakat patojenik retrovirüslere genetik olarak benzerlik gösterirler. Bundan dolayı retrotranspozon Ty2-917 retrovirüslerde gen ifadesinin kontrol mekanizmalarını analiz etmek için iyi bir model sistem olarak çok yoğun olarak kullanılmaktadır.

Bu tez araştırmalarının sonuçları Ty2 transkripsiyonunun da kromatin yapısını değiştiren kompleksler tarafından düzenlendiğini göstermektedir. Non-histon proteinleri ve histon asetil transferaz aktivitesinin yokluğu Ty2-917 transkripsiyonun da birkaç kat azalma ile sonuçlandı. Fakat elde ettiğimiz sonuçlar histon deasetilazların Ty2-917 transkripsiyonuna herhangi bir etkisinin olmadığını da gösterdi. Bunlara ek olarak, bu araştırmada elde edilen diğer sonuçlar da Ty2-917 transkripsiyonun düzenlenmesi için Med2p gibi bazı transkripsiyon mediatörlerinin de gerekli olduğunu gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Transkripsiyon, Kromatin, Ty elementleri, *S. cerevisiae*, Retrotranspozon.

ABSTRACT**Analysis of the Effects of chromatin modifying factors on the regulation of Retrotransposon Ty2 transcription**

Chromatin structure has the large effects on the regulation of gene expression in eukaryotes. Nucleosomes and non-histone proteins are the major factors that form highly ordered chromatin structures. Chromatin modifying complexes can alter the gene expression either by acting on the specific transcription factors or by changing the chromatin structure over the control regions of the target genes.

In this study, the effects of chromatin modifying complexes on the transcription of retrotransposon Ty2-917 were investigated using Ty2-lacZ gene fusions and the specific mutant *S. cerevisiae* strains. Retrotransposons do not cause any disease but they have genetic similarities to pathogenic retroviruses. Hence, retrotransposon Ty2-917 has been extensively used as a good model system to analyze the control mechanisms of gene expression in retroviruses.

Results of this thesis research indicated that the transcription of Ty2 is also regulated by chromatin modifying complexes. Lack of non-histone proteins and histone acetyl transferase activity resulted in several fold decrease in the transcription of Ty2-917. However, our results also showed that histone deacetylases have no effects on the Ty2-917 transcription. In addition, results of this study also indicated that the some of the transcription mediators such as Med2p are essential for the transcriptional regulation of Ty2-917.

Key Words: Transcription, Chromatin, Ty elements, *S. cerevisiae*, Retrotransposon.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Eukaryotlarda Transkripsiyonun Genel Özellikleri.....	3
2.1.1. Bazal Transkripsiyon Faktörleri.....	4
2.1.2. Eukaryotlarda Transkripsiyonun Kontrol Mekanizmaları.....	5
2.2. Eukaryotlarda Kromatin Yapısı.....	6
2.2.1. Eukaryotlarda Kromatin Yapısının Değişimi.....	7
2.2.2. Histon Asetil Transferaz ve Histon Deasetilazlar.....	8
2.3. Retrotranspozonlar ve Retrovirüsler.....	10
2.3.1. <i>S. cerevisiae</i> 'da Ty Elementleri.....	13
2.3.2. Ty2-917'nin Yapısal Özellikleri ve Transkripsiyonu.....	14
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	18
3.1. Araştırmada Kullanılan Maya Suşları.....	18
3.2. <i>S. cerevisiae</i> Suşlarının Üretilmesi.....	19
3.3. Araştırmada Kullanılan Plazmidler.....	19
3.4. Plazmidlerin <i>E.coli</i> 'ye Transformasyonu ve Saflaştırılması.....	20
3.5. Plazmidlerin <i>S. cerevisiae</i> 'ya ya Transformasyonu.....	21
3.6. β -galaktosidaz Aktivitelerinin Ölçülmesi.....	20
4. SONUÇLAR.....	23
4.1. Non-histon Protein 6A/B'nin Ty2 Transkripsiyonuna Etkileri.....	23
4.2. Histon Deasetilaz Kompleksinin Ty2 Transkripsiyonuna Etkileri.....	24
4.3. Medyatörlerin Ty2 Transkripsiyonuna Etkileri.....	25

4.4. Nhp10'un Ty2 Transkripsiyonuna Etkileri.....	27
4.5. Iswi2'nin Ty2 Transkripsiyonuna Etkileri.....	28
4.6. SAGA Kompleksinin Ty2'de Transkripsiyona Etkileri.....	29
5. TARTIŞMA.....	31
6. KAYNAKLAR.....	34
EKLER.....	40
Ek 1. Araştırmada Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltilerin Hazırlanması.....	40
Ek 2. β -Galaktozidaz Aktivitesinin Hesaplanması.....	43
TEŞEKKÜR.....	44
ÖZGEÇMİŞ	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP	- Adenosine Trifosfat
CTD	- Carboxy Terminal Domain
CYC	- Iso-1-Cytochrome
DAS	- Downstream Activating Site
DRS	- Downstream Repressing Site
ENV	- Envelop (Viral kılıf proteini)
GCR	- Glycolysis Regulatory Protein
H2A	- Histon Proteini
HAT	- Histon Asetil Transferaz
HDAC	- Histon Deasetilaz Kompleksi
HDA1	- Histon Deasetilaz 1
HMG	- High Mobility Group
ISWI	- Imitation of Switch
LB	- Luria Broth
LTR	- Long Terminal Repeat
MAT	- Mating Type
MED2	- Mediator 2
MIG1	- Multicopy Inhibitor of GAL Genes-1
MÜ	- Miller Ünitesi
MRNA	- Mesenger RNA
NHP	- Non Histone Protein
OD	- Optical Density
ONPG	- Orto Nitro Phenyl Galactoside
PEG	- Poly Etilen Glikol
RNA	- Ribonükleik Asit
RNase-H	- Ribonükleaz-H
RPD3	- Reduced Potassium Dependency
rpm	- Revolution Per Minute

VIII

RSC	- Remodel the Structure of Chromatin
SAGA	- Spt-Ada-Gcn5-Acetylase
SAP30	- SIT4 Protein Phosphatase Associated Protein
SC	- Synthetic Complete
SIN3	- Switch Independent-3
SIR2	- Silent Information Regulator-2
SNF	- Sucrose Non-Fermenting
SPT	- Supressor of Ty
SRB	- Supressor of RNA polymerase B
SSN6	- Supressor of Snf-6
SUC2	- Sucrose Fermentation-2
SWI	- Switch
TBP	- TATA Binding Protein
TF	- Transkripsiyon Faktörü
tRNA	- Transfer RNA
TUP1	- Timidin Uptake-1
Ty	- Transposon Yeast
UAS	- Upstream Activating Sequence
URA	- Urasil Sentezi
UME	- Unscheduled Meiotic Gene Expression
YNB	- Yeast Nitrogen Base
YPAD	- Yeast Extract Peptone Adenin Dextrose
YP	- Yeast Extract and Peptone
YPD	- Yeast Extract Peptone Dextrose
VLP	- Virus Like Particle
α	- Alfa
β	- Beta
bp	- Base Pair
g	- Gram
kbp	- Kilo Base Pair

kDa	- Kilo Dalton
M	- Molar
MDa	- Mega Dalton
ml	: Mililitre
nm	- Nano Metre
μ l	- Mikrolitre
μ g	- Mikro Gram
W/V	- Weight / Volume
$^{\circ}$ C	- Santigrad
Δ	- Delta (Delesyon)
%	- Yüzde

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil.</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Eukaryotlarda nükleozomların organizasyonu.....	10
2.2. Retrotranspozonların hayat döngüsü.....	11
2.3. Retrovirüslerde genom yapısının genel organizasyonu.....	12
2.4. Ty2-917'de transkripsiyon kontrol bölgeleri.....	16
3.1. Ty2-555-lacZ gen füzyonunu içeren plazmidin yapısı.....	20

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Bu araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşlarının genotipleri.....	18
4.1. Nhp6A/B'nin Ty2 transkripsiyonuna etkileri.....	24
4.2. Rpd3p ve Hda1p'nin Ty2 transkripsiyonuna etkileri.....	25
4.3. Med2p ve Srb10'nin Ty2 transkripsiyonuna etkileri.....	26
4.4. <i>S. cerevisiae</i> Nhp10p'nin Ty2 transkripsiyonuna etkileri.....	27
4.5. <i>S. cerevisiae</i> Iswi2p'nin Ty2 transkripsiyonuna etkileri.....	28
4.6. SAGA kompleksinin Ty2 transkripsiyonuna etkileri.....	29

1- GİRİŞ.

Eukaryotlarda kromozomlar hücre döngüsünün interfaz sırasında da nükleusda yoğun kromatin şeklinde bulunur. Kromatin oluşumunu sağlayan faktörlerden en önemlisi histon proteinlerinden oluşan nükleozomlardır. Nükleozomlardan başka genel olarak non-histon proteinler olarak bilinen bir gurup proteinin de kromatin oluşumunu sağladığı bilinmektedir. Fakat kromatin çok dinamik bir yapı olup çeşitli faktörlerce sürekli olarak yapısal değişikliklere uğratılmaktadır. Nükleozomların DNA'ya bağlandığı bölgeler değiştirilebilmekte veya nükleozomlar tümüyle DNA'dan atılabilmektedir.

Eukaryotlarda DNA'nın açık kromatin yapısı şeklinde olmayıp farklı proteinler ile kompleks oluşturan yoğun bir yapı olması genlerden transkripsiyon yapılmasını da engellemektedir. Bu nedenle genlerin işleyişinde birinci aşama olan transkripsiyonun başlatılabilmesi için bazal transkripsiyon faktörleri ve RNA Polimerazların bağlandığı promotor bölgelerinin açık kromatin bölgeleri olarak bulunması gerekmektedir. Kromatin yapısının açılması daha çok nükleozomları oluşturan histonların asetillenerek DNA ile etkileşimlerinin bozulması sonucu olmaktadır. Histon asetil transferaz olarak bilinen büyük enzim kompleksleri nükleozomlardaki histonlara asetil gurupları ekleyip nükleozomların DNA'dan çözülmesini, böylece genlerin promotor bölgelerinin transkripsiyon için açılmasını sağlamaktadır (Wu ve Grunstein 2000). Bunun dışında histonların deasetillenmesini sağlayıp nükleozomların DNA'ya bağlanmasını sağlayan faktörler de bulunmaktadır. Bu faktörler de kromatin oluşumunu sağlayıp daha çok genlerden yapılan transkripsiyonun baskılanmasını sağlamaktadır (Shidlovski ve Nabirachkina 2005).

Nükleozomların dışında *S. cerevisiae*'da ve diğer eukaryotik canlılarda kromatin oluşturan önemli bir nükleer protein gurubu da non-histon proteinleridir. Bu proteinler high mobility gurup proteinler olarak da adlandırılırlar ve farklı genlerin transkripsiyonlarının aktivasyonu veya baskılanmasını sağlarlar (Moreira ve Holmberg 2000).

Eukaryotlarda transkripsiyonun aktivasyonu için aktivatör proteinlere ek olarak mediatör kompleksi olarak bilinen başka bir gurup proteinin de gerekli olduğu bulunmuştur (Guglielmi ve ark. 2004). Mediatör kompleksinin transkripsiyon

düzenleyici aktivatörler ile bazal transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz arasındaki bağlantıyı sağlayan faktörler olduğu gösterilmiştir (Malik ve Roeder 2000).

Bu araştırmada *S. cerevisiae* retrotranspozonu Ty2-917'de transkripsiyonun kontrolüne kromatin modifiye edici faktörler ve mediatör kompleksinin etkileri araştırılmıştır. *S. cerevisiae*'da bulunan 5 farklı guruptaki retrotranspozonlardan biri olan Ty2-917'de transkripsiyonun baskılanması ve aktivasyonu için gerekli olan düzenleyici elementler bu retrotranspozonun 5' LTR bölgesinde daha önce yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir (Farabaugh ve ark. 1989). Ty2-917'de transkripsiyonu aktive eden ve baskılayan düzenleyici bölgeler promotor bölgesinin 5' ve 3' tarafında bulunmaktadır. Düzenleyici elementlerin Ty2-917'de çok kısa bir DNA bölgesinde çok yoğun olarak bulunduğu da belirlenmiştir (Farabaugh ve ark. 1993). Ty2-917'de düzenleyici elementlerin bu şekilde yer alması transkripsiyonun başlaması için promotor bölgesindeki kromatin yapısında önemli katlanmalar olmasını gerektirmektedir. Kromatin yapısındaki katlanmaları sağlayan faktörler de eukaryotlardaki nükleozomlar ve diğer kromatin modifiye edici komplekslerdir. Bu araştırma sonucunda elde edilen sonuçlar bazı kromatin faktörleri ve kromatin yapısını değiştiren faktörlerin Ty2-917'de transkripsiyonun kontrolü için gerekli olduğunu göstermiştir. Kromatin yapısını değiştiren faktörlere ek olarak Ty2-917 transkripsiyonunun düzenlenmesinde mediatör kompleksinin de gerekli olduğu bulunmuştur.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2. 1. Eukaryotlarda Transkripsiyonun Genel Özellikleri

Eukaryotik organizmalarda genlerin transkripsiyonu üç farklı RNA polimeraz tarafından yapılmaktadır. Bu RNA polimerazlardan RNA polimeraz I ribozomal RNA genlerini, RNA polimeraz II protein kodlayan genleri transkribe eder. RNA polimeraz III de tRNA ve diğer kısa RNA'ların kodlandığı genlerin transkripsiyonunu gerçekleştirir (Archambault ve Friesen 1993).

Eukaryotik RNA polimerazların transkribe ettikleri genlerin promotor bölgelerine spesifik olarak bağlanabilme özellikleri yoktur. Herbir RNA polimerazın canlı türüne göre değişmekle birlikte yaklaşık 14 alt birimden oluşan büyük bir protein kompleksi olduğu bilinmektedir. Eukaryotik RNA polimerazlarda bazı alt birimler ortaktır (Woychik ve Young 1990, Archambault ve Friesen 1993).

Bu tez araştırmasının konusu olan *S. cerevisiae* retrotranspozonu Ty2 elementinin transkripsiyonu da RNA polimeraz II tarafından yapıldığından, bu bölümde sadece RNA polimeraz II tarafından yapılan transkripsiyonun genel özellikleri ve kontrol mekanizmaları açıklanacaktır.

RNA polimeraz II ilgili genlerde transkripsiyonun başlatıldığı bölgeye yani genlerin promotor bölgelerine direkt olarak bağlanamaz. RNA polimeraz II'nin transkripsiyonu başlatabilmesi için promotor bölgesinin önce bazal transkripsiyon faktörlerince tanınması gerekmektedir. RNA polimeraz II ancak bazal transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek promotor bölgesine bağlanabilir (Sawadogo ve Sentenac 1990). Eukaryotlarda kromozomların nükleusda kromatin olarak bulunması bazı genlerin promotor bölgelerine transkripsiyon faktörlerinin bağlanmalarını da engelleyebilir. Bu nedenle eukaryotlarda genellikle genlerin transkripsiyonlarında ilk adım promotor bölgelerindeki kromatin yapısının açılmasıdır.

RNA polimeraz II tarafından yapılan transkripsiyon çeşitli düzenleyici faktörlerce hücrenin metabolik durumu ve çevresel uyarılar gibi faktörler ile kontrol edilmektedir. Sadece RNA polimeraz II tarafından yapılan bazal transkripsiyon çok az seviyede olup hücrede metabolik olayların yürütülebilmesi için yeterli değildir. Hücrelerin metabolik durumu veya gelişim aşamasına göre transkripsiyon aktive edilir veya baskılanabilir.

Transkripsiyon faktörlerinin aktiviteleri de metabolik sinyallere göre düzenlenebilmektedir (Karin 1990, Hunter ve Karin 1992).

2. 1. 1. Bazal Transkripsiyon Faktörleri

Protein kodlayan genlerin transkripsiyonundaki ilk basamak promotör bölgesinin bazal transkripsiyon faktörlerinden TFII-D kompleksi tarafından tanınmasıdır. Fakat bunun için promotör bölgesinin açık olması gerekmektedir. TFII-D çok alt birimli bir protein olup özellikle DNA'daki TATAAA dizisi ile spesifik olarak etkileşen alt birimi TBP'dir (TATA Binding Protein).

TFII-D'nin promotörü tanıyıp bağlanmasından sonra bu yapıya diğer bazal transkripsiyon faktörleri katılmaya başlar. Sırasıyla önce TFII-B ve TFIIA; TFII-D ile etkileşerek daha stabil bir kompleks oluştururlar (Buratowski ve ark. 1989). Bu komplekse TFII-H, TFII-E faktörleri de bağlandıktan sonra RNA polimeraz II de yapıya katılır ve ön başlatma kompleksinin oluşumu tamamlanır (Archambault ve Friesen 1993). Bu bazal transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz II kompleksinin in-vitro transkripsiyon için yeterli olduğu gösterilmiştir (Malik ve Roeder 2000)

S. cerevisiae'da RNA polimeraz II'nin yapısı belirlenmiştir. *S. cerevisiae*'da RNA polimeraz II molekül ağırlığının 0.5MDa olduğu ve 12 alt birimden oluştuğu belirlenmiştir (Woychik ve Young 1990).

RNA polimeraz II'nin en büyük alt birimi bütün eukaryotlarda olduğu gibi *S. cerevisiae*'da da transkripsiyonun başlangıç aşamasında önemli bir işleve sahiptir. Transkripsiyonun başlangıç aşamasından devam (elongation) yani mRNA sentezi aşamasına geçilebilmesi için RNA polimeraz II'nin en büyük alt birimini oluşturan proteinin karboksil ucunun (C-terminal Domain, CTD) protein kinazlarca fosforlanması gerekmektedir. Transkripsiyonun devamı ancak CTD fosforilasyonundan sonra gerçekleşmektedir (Young 1991). CTD 7 aminoasit dizisinin tekrarlarını içerir. Bu motif eukaryotların evrimi sırasında korunmuştur fakat tekrar sayıları türlere göre değişir. Mayalarda 26, memelilerde 52 adet bulunur (Palancade ve Bensaude 2003).

S. cerevisiae'da genlerin promotör bölgelerinde TATAAA dizisinden başka çeşitli kontrol bölgeleri de belirlenmiştir. Bu kontrol bölgeleri genlerden yapılacak olan transkripsiyonun metabolik veya çevresel sinyallere göre yapılabilmesi için gereklidir. TATAAA dizisi genellikle transkripsiyonun başlama noktasından 30-160 nükleotid

kadar üst bölgede olabilir. Transkripsiyon aktivatörlerinin bağlandığı bölgelere *S. cerevisiae*'da geleneksel olarak UAS (Upstream Activating Sequence) denilmektedir. Fakat sonradan bazı aktivatörlerin transkripsiyon başlama noktasından alt bölgelere yani genin transkribe edilen bölgelerine de bağlanabildiği gösterilmiştir (Türkel ve Farabaugh 1993, Türkel ve ark. 1997). Birden çok aktivatörün bağlandığı bölgelere de enhancer bölgesi denilmektedir. Ayrıca, transkripsiyon represörlerinin bağlandığı bölgeler de promotor bölgesinde bulunabilir (Struhl 1987).

Transkripsiyonu kontrol eden faktörler bazen direkt olarak bazal transkripsiyon faktörleri veya RNA polimeraz ile etkileşemez. Bazı genlerde transkripsiyonu kontrol eden düzenleyici faktörlerin mediatör kompleksi olarak adlandırılan proteinler aracılığı ile bazal transkripsiyona etki ettikleri gösterilmiştir. *S. cerevisiae*'da mediatör kompleksinin genel transkripsiyon faktörleri ile etkileştiği ve RNA polimeraz II'nin transkripsiyonu başlatması için gerekli olduğu gösterilmiştir (Malik ve Roeder 2000). Mediator kompleksi alt birimleri çeşitli genlerde promotora özel etkileşimler ile ilgili genlerin transkripsiyonlarının düzenlenmesini sağlarlar.

2. 1. 2. Eukaryotlarda Transkripsiyonun Kontrol mekanizmaları

Eukaryotlarda protein kodlayan genlerin transkripsiyonu birçok kontrol mekanizması ile düzenlenir. Bu kontrol mekanizmaları her hangi bir gene veya gen gurubuna özel olabilir. Transkripsiyonun kontrolü hücrenel veya çevresel şartlara göre transkripsiyonun baskılanması veya aktivasyonu şeklinde olabilir.

En sık görülen kontrol mekanizmalarından biri aktivatör veya represör proteinlerin protein kinazlar tarafından fosforlanması sonucu ilgili transkripsiyon faktörünün aktif/inaktif forma dönüştürülmesidir (Karin 1990, Hunter ve Karin 1992).

Transkripsiyon faktörlerinin inaktif şekilde sitoplazmada bir proteine bağlı olarak tutulması da ayrı bir kontrol mekanizmasıdır. Bu durumda aktivatör gerekli oluncaya kadar sitoplazmada tutulur ve daha sonra transkripsiyonun yapıldığı nükleusa geçer. Bazı promotorlarda da aktivatör ve represör proteinleri çakışık olarak bulunan bağlanma bölgelerine bağlanmak için birbiri ile yarıştığı görülmüştür. Bu durumda aktivatör veya represörün ilgili promotora bağlanması diğerinin bağlanmasını fiziksel olarak engellemektedir (Park ve Craig 1991).

Eukaryotlarda yaygın olarak görülen bir diğer kontrol mekanizması da nükleozomların promotor bölgesine bağlanmasıyla transkripsiyonun baskılanması ve engellenmesidir. Bu tür kontrol mekanizmasında bir veya birkaç nükleozom represör proteinler ile de etkileşerek ilgili genin promotor bölgesinde katlanmalar oluşturur. Bu tür katlanmış promotor bölgelerine de bazal transkripsiyon faktörlerinin ve transkripsiyon aktivatörlerinin bağlanması engellenir. Çok yaygın olarak görülen bu tür kontrol mekanizmasına en iyi örnek *S. cerevisiae*'da *SUC2* geni transkripsiyonunun baskılanmasıdır (Wu ve Winston 1997).

2. 2. Eukaryotlarda Kromatin Yapısı

Eukaryotik organizmalarda kromozomlar nükleusta kromatin olarak bulunurlar. Kromatin yapısını oluşturan faktörler DNA'ya bağlanabilen proteinlerdir. Bu proteinler bazen büyük DNA/protein kompleksleri oluşturup DNA'nın çok fazla katlanmasını da sağlayabilirler. Çeşitli protein faktörlerince sıkı şekilde paketlenmiş kromozomlardaki genlerin transkripsiyonları için ilk şart kromatinin sürekli veya en azından geçici bir süre için açılması, çözülmesidir (Elgin 1988, Kornberg ve Lorch 1992).

Eukaryotlarda DNA heterokromatin ve eukromatin olmak üzere iki şekilde bulunur. İnterfaz nükleusunda aşırı yoğunlaşma gösteren bölgeler heterokromatin yapısındadır. Nükleusta genellikle daha açık renkli görülen bölgeler, aktif DNA'nın bulunduğu eukromatin bölgeleridir. Metafaz nükleusunda kromozomlar yüksek seviyede paketlenmiş halde bulunurlar. Genetik materyalin yapısal durumu ile transkripsiyonel aktivite arasında karşılıklı bir ilişki söz konusudur. Fazla katlanmış durumdaki kromatinden transkripsiyon yapılamaz. Mitotik hücrelerde, hücre bölünmesi sırasında transkripsiyon durmuş gibidir.

Kromatin yapısını oluşturan proteinler histonlar ve non-histonlardır. Kromatin yapısının oluşmasında en önemli alt birim nükleozomlardır. Nükleozomlar histon kompleksleridir ve H2A, H2B, H3, H4 dimerlerinden oluşan bir oktomer yapısındadır. DNA paketlenirken bu oktomerin etrafında yaklaşık 1.65 kez sarılır. Bu sarılan DNA'nın uzunluğu 146 baz çiftidir (Bernstein ve Schreiber 2002). H1 histonu iki nükleozom arasındaki DNA ile etkileşir fakat direkt olarak nükleozom yapısına katılmaz (Shidlovskii ve Nabirochkina 2000). Kromatin nükleusta açık, 10 nm'lik bir nükleozom iplikçığı halinden paketlenirken 30 nm'lik supersarmal oluşturularak solanoid

hal kazanır ve her dönüşte yaklaşık 6 nukleozom vardır. Böylece DNA daha sıkı şekilde paketlenmiş olur (Horn ve Peterson 2002).

Eukaryotlarda kromatin oluşumuna katılan bir diğer protein gurubu HMG (High Mobility Group) proteinleridir. Bu proteinler elektroforezde ayrıştırma esnasında yüksek hızda hareket ettiklerinden High Mobility Group proteinler olarak adlandırılmışlardır. HMG proteinleri çok çeşitli olarak bulunur. Bazılarının dokulara özel oldukları öne sürülmektedir.

HMG gurubu proteinler *S. cerevisiae*'da da bulunmaktadır (Lu ve ark. 1996). *S. cerevisiae*'daki HMG proteinleri Non-Histon Proteinler (NHP) olarak adlandırılmışlardır. Bunlardan Nhp6A ve Nhp6B'nin (Nhp6A/B) *S. cerevisiae*'da birbirine çok fazla homoloji gösteren iki genden kodlandığı gösterilmiştir. *S. cerevisiae*'da Nhp6A/B'nin çok sayıda genin transkripsiyonunun aktivasyonu veya baskılanması için gerekli olduğu gösterilmiştir (Moreira ve Holmberg 2000).

Nükleozomlara ek olarak Non-histon proteinler ile beraber nükleusta bulunan nükleer matriks proteinleri ve histon variantlarının da DNA'ya bağlanıp mitotik kromozomların oluşumuna katıldıkları görülmüştür (Horn ve Peterson 2002).

2. 2. 1 Eukaryotlarda Kromatin Yapısının Değişimi

Eukaryotlarda nükleusda çok sayıda proteinin DNA'ya bağlanmasıyla oluşan kromatin yapısı interfaz süresince çok dinamik bir yapıdır. Yapısı sürekli olarak değişir. Nükleus içinde bazı bölgelerde katlanmalar veya çözülmeler, açılmalar olur. *S. cerevisiae*'da kromatin yapısını değiştiren faktörler dört alt grupta incelenmektedir. Bu sınıflandırma bu faktörlerin etki mekanizmalarına göre yapılmıştır. Bunlar;

- a- ATP bağımlı Snf/Swi kompleksi
- b- ATP bağımlı Iswi gurubu faktörler
- c- Histon Asetil Transferase (HAT) kompleksi (SAGA).
- d- Histon deasetilaz kompleksleri'dir (HDAC).

Bu komplekslerden Snf/Swi ve Iswi gurubu proteinler kromatin üzerindeki nükleozomları ATP kullanarak kromatin yapısından ayırırlar. Histon asetil transferazlar histonlara asetil gurubu bağlayıp nükleozomların kromatin yapısından çözülerek ayrılmasını sağlar (Vignali ve ark. 2000). Histon deasetilazlar da histonlardan asetil

gurubunun ayrılmasını katalizleyerek Nükleozomların kromatine bağlanmasını sağlamaktadırlar (Vignali ve ark. 2000, Verdin ve ark. 2003).

Snf/Swi kompleksi 2-MDa büyüklüğünde ve 12 alt birimden oluşan oldukça büyük bir protein kompleksidir (Shidlovskii ve Nabirochkina 2005). *S. cerevisiae*'da birçok genin aktivasyonu veya baskılanması için gereklidir. Snf/Swi kompleksinin bazı alt birimleri DNA ve RNA helikazlarıyla homoloji gösterirler ki bu enzimleri ATP'nin hidrolizi sonucu ortaya çıkan enerjiyi nükleik asit- protein etkileşimini bozmak için kullanırlar. Transkripsiyonal olarak aktif kromatin bölgeleri, inaktif bölgelere göre DNase'lara karşı daha duyarlıdır. Histon oktomerlerine sarılı DNA, enzimin parçalamasından kısmen korunur. Saflaştırılmış Snf/Swi kompleksi varlığında ise bu nükleozomal DNA, DNase1'e karşı daha duyarlı hale gelir. Bu da bize DNA' nın nükleozom yüzeyinden geçici olarak ayrılmasını kolaylaştırdığını gösterir (Elgin 1988). Snf/Swi kompleksinin direk olarak DNA'ya bağlanma özelliği yoktur. Snf/Swi ilgili genlerin promotorlarına aktivatör veya repressör proteinler aracılığı ile bağlanır. ATP kullanarak bulunduğu kromatin bölgesinde açılmaları neden olur (Vignali ve ark. 2000, Shidlovskii ve Nabirochkina 2005).

Snf/Swi kompleksinin biyokimyasal aktiviteleri; nükleozom remodeling, nükleozom kayması ve oktomer transferidir. *S. cerevisiae*'da Snf/Swi kompleksleriyle bağlı bulunan başka bir gurup protein de RSC'dir. RSC'nin de *S. cerevisiae*'da kromatin üzerinde histon oktomerini aktarma işlevi olduğu gösterilmiştir (Sudarsanam ve Winston 2000).

Iswi gurubu kromatin değiştiren kompleksler yapısal olarak Snf/Swi gurubundan daha küçüktür. Molekül ağırlıkları 400-800 kDa aralığında olup genellikle 2-4 alt birim içerebilirler. Bu grupta yer alan faktörlerin de genlerin transkripsiyonunun kontrolunda görevleri oldukları gösterilmiştir. Kromatinde katlanmalar oluşturup bazı genlerden transkripsiyonun baskılanmasına bazı genlerden de transkripsiyonun aktive edilmesine neden olurlar (Corona ve Tamkun 2004, Shidlovskii ve Nabirochkina 2005)

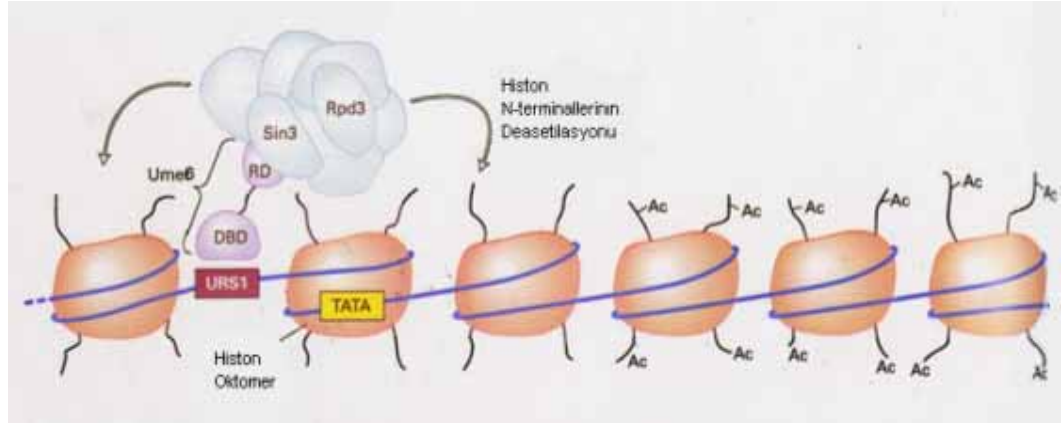
2. 2. 2 Histon Asetil Transferaz ve Histon Deasetilazlar

Nükleozomların eukaryotlarda genlerin promotor bölgelerine bağlanarak transkripsiyonu baskılayabildikleri bilinmektedir (Sundarsanam ve Winston 2000). Nükleozom yapısını oluşturan histonlara enzimatik olarak asetil, fosfat, metil gibi yan

gruplar bağlanmaktadır (Lewin 2004a). Histonların yapısında oluşan bu tür kimyasal modifikasyonlar nükleozomların DNA ile etkileşimlerini de etkilemektedir.

Histonlara asetil gruplarının Histon Asetil Transferaz (HAT) aktivitesi olan enzim komplekslerince eklenmesiyle nükleozomların DNA ile etkileşimleri zayıflamaktadır (Vignali ve ark. 2000). Negatif yüklü olan asetil grupları DNA'nın negatif yükü ile etkileşemediği için asetillenmiş histon içeren nükleozomlar kromatinden ayrılırlar. Nükleozom yapısındaki histonlara asetil gruplarını enzimatik olarak bağlayabilen protein kompleksi *S. cerevisiae*'da SAGA kompleksi olarak belirlenmiştir (Dudley ve ark. 1999). SAGA kompleksi nükleozomlardan başka transkripsiyon aktivatörleri ve bazı bazal transkripsiyon faktörleri ile de etkileşebilmektedir (Sterner ve Berger 2000, Bhaumik ve Green 2002).

Histon deasetilasyonu genellikle transkripsiyonun baskılanmasına neden olur. Birçok represör proteinin direkt olarak veya bir adaptör aracılığı ile histon deasetilaz kompleksleri (HDAC) ile etkileştiği bilinmektedir. *S. cerevisiae*'da histon deasetilaz aktivitesi olan üç farklı protein gurubu belirlenmiştir. Bunlar Rpd3p, Hda1p ve Sir2p'dir. Rpd3p büyük bir protein kompleksi içinde yer alır. Bu komplekse HDAC-I gurubu kompleks denilir. *S. cerevisiae*'da 1 MDa büyüklüğünde bir protein kompleksi olup Sin3, Sap30, Ume1 gibi alt birimleri bulunmaktadır (Grozinger ve Schreiber 2002). *S. cerevisiae*'da bulunan diğer bir histon deasetilaz gurubu da HDAC-II gurubudur. *S. cerevisiae*'da HDAC-II gurubu histon deasetilaz olarak Hda1p belirlenmiştir. Hda1p'nin Tup1p ile etkileştiği gösterilmiştir (Verdin ve ark. 2003, Davie ve ark. 2003) (Şekil 2.1). Tup1p DNA'ya bağlanan Mig1p proteini ile de etkileşerek Hda1p'nin ilgili promotor bölgesine taşınmasını sağlar. Bunun sonucu olarak da Mig1p-Tup1p-Hda1p kompleksinin bulunduğu bölgedeki nükleozomlar deasetillenerek ilgili, hedef genlerin promotor bölgeleri nükleozomlarca kapatılır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Eukaryotlarda nükleozomaların organizasyonu. Represör protein tarafından kromatin üzerine taşınan HDAC kompleksinin nükleozomlarda yaptığı deasetilasyon gösterilmektedir (Lewin 2004a).

2.3. Retrotranspozonlar ve Retrovirüsler

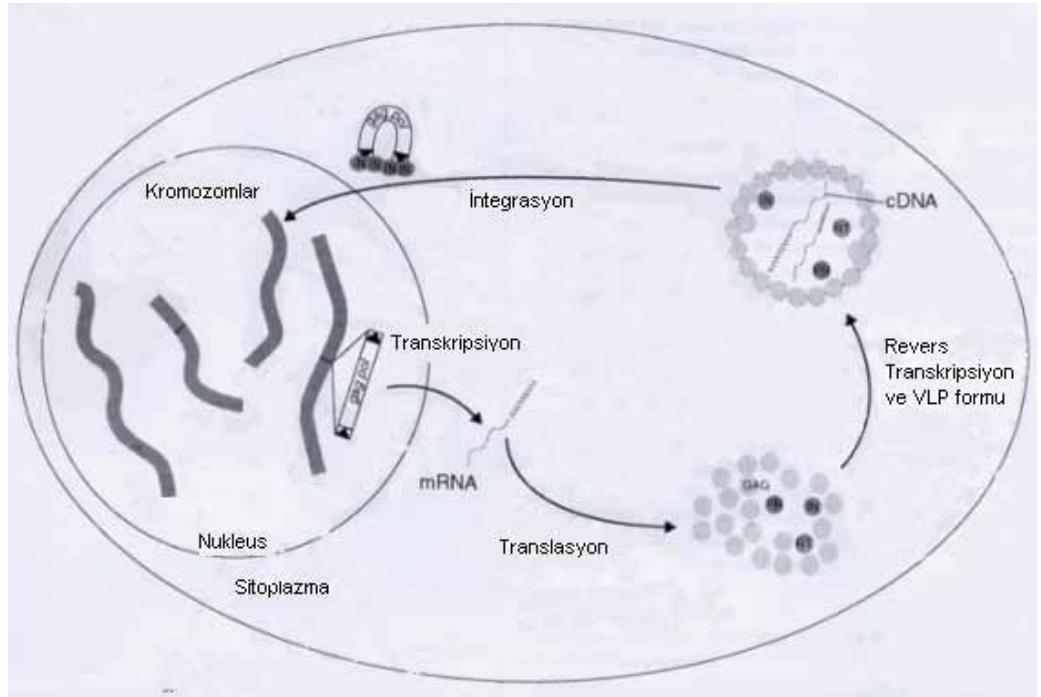
Eukaryotlarda genom içinde yer değiştiren hareketli elementlere transpozon denilmektedir. Retrotranspozonlarda da genom içinde yer değiştirme RNA aracılığı ile yapılır. Retrotranspozonlar 3 sınıfa ayrılır. Bu gruplar ve kısa özellikleri aşağıda verilmiştir (Lewin 2004b).

1. sınıf retrotranspozonlar (retropozonlar): Retroviridae süper ailesindedir. Revers transkriptaz ve/veya integras aktivitesine sahip protein kodlar. Diğer retropozonlar gibi retrovirüslere benzer mekanizma ile çoğalırlar. Fakat bağımsız bulaşıcı formu yoktur. Bu grup retrotranspozonlara en iyi örnek *Drosophila*'daki Copia elementi ile *S. cerevisiae*'daki Ty elementleridir.

2. sınıf retropozonlar: LINE elementleridir. Bunlar da transkriptaz aktivitesine sahiplerdir. LTR'leri yoktur. Retrovirüslerden farklı bir mekanizmayla revers transkripsiyon yapılırlar. Bu elementlerin az bir kısmı kendi kendilerine transpozisyon yapabilirler.

3. sınıf retrotranspozonlar (retropozonlar): Non-viral süper ailedendir ve hücrel transkript orjinlidirler. Transpozisyon fonksiyonu olan protein kodlamazlar. En göze çarpan örneği SINE elementleridir.

Retrotranspozonların hayat döngüleri Şekil 2.2’de verilmiştir. Retrovirus parçacığı içinde genom olarak 2 adet mRNA bulunur. Bu mRNA genomu viral parçacık içinde önce reverse transkriptaz tarafından tek zincirli DNA’ya sonra da çift zincirli DNA’ya dönüştürülür. Çift zincirli retroviral DNA integraz etkisi ile genoma integre olur (Boeke ve Ark. 1985).



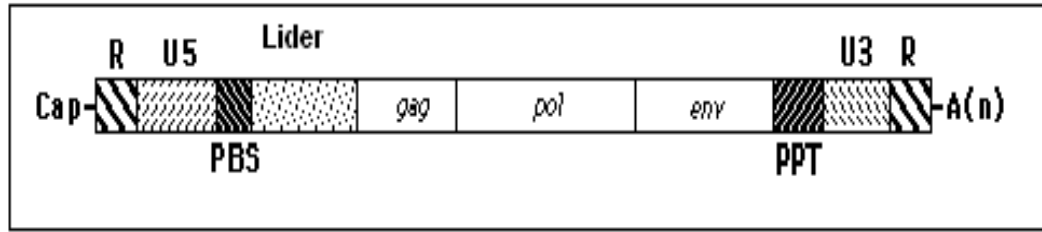
Şekil 2.2. Retrotranspozonların hayat döngüsü (Ericka veark. 2004)

Bazı retrovirüsler insanda çok tehlikeli hastalıklar oluşturabilirler. Fakat retrotranspozonların henüz patojenik bir özelliği gösterilmemiştir. Bununla birlikte, Retrotranspozonlar genom içinde mutasyona neden olabilirler. Nükleusta transpozisyon sonucu hücre fonksiyonları için gerekli olan genlerin yapı ve işleyişini değiştirebilir (Ciriacy 1995).

Retroviral genomdan polyprotein kodlanır. Tipik bir retrovirüs genomunda üç farklı kodlama bölgesi bulunmaktadır. Retrovirüs genomlarından tek promotordan tek çeşit mRNA transkribe edilmektedir (Farabaugh 1995, Farabaugh 1996). Transkripsiyon ile oluşan mRNA’da polyadenilasyon ile poly-A kuyruğu oluşur. Bu

mRNA'nın translasyonu sonucu retrovirus için gerekli olan yapısal proteinler (GAG) ve enzimatik özelliği olan revers transkriptase, integrase, RNaseH gibi (POL) proteinler oluşur. Translasyon sırasında GAG-POL polyproteininin oluşumu çerçeve kayması (Frame-shift) gerektirir. Bazı retrovirüslerde mRNA'nın kesilmesi (Splicing) sonucu oluşan ayrı bir RNA'dan Env proteininin translasyonu yapılır (Farabaugh 1995).

Her üç protein ürünü yani, GAG, GAG-POL füzyon proteini ve ENV proteini spesifik proteazlarca kesilerek çok sayıda daha kısa protein oluşur (Farabaugh 1995, Farabaugh 1996).



Şekil 2.3. Retrovirüslerde genom yapısının genel organizasyonu.

Tipik retrovirus genomunda üç kodlama bölgesi bulunur. Bu bölgeler GAG, GAG-POL ve ENV şeklinde sıralanır (Ciriacy 1995). Retroviral mRNA 5'ucu cap yapısı ve 3'ucu polyadenillenmiş şeklindedir. Genom yapısının bazı özellikleri ise şöyledir:

R (Repeated) bölgesi: Kısa (18-250 nt) bir bölgedir ve her iki uçta direk tekrarlı şekildedir

U5 (Unique 5'): genomda transkribe olan ilk parçadır 75-250 nt'lik non coding bir bölgedir.

PBS (Primer Binding Site): Özel bir tRNA aracılığı ile revers transkriptazın revers transkripsiyona başladığı 18 nt'lik kısım.

Lider: 90-500 nt lik transkripsiyon başlama bölgesinden sonra, translasyonu yapılmayan bölgedir. Bütün retroviral mRNA'larının 5' ucunda bulunur.

PPT (Polypurine Tract): Kısa, yaklaşık 10 nt'lik bir kısımdır. Revers transkripsiyon sırasında (+) zincirin başlamasından sorumludur

U3 (Unique 3'): 200-1200 nt lik kodlanmayan bölgedir. Revers transkripsiyon sonrası provirüsün 5' ucudur. Promotor elemanlarına sahiptir ve provirüsün transkripsiyonundan sorumludur.

mRNA'nın tamamının translasyonu ile GAG ve POL polyproteinleri oluşur. GAG ve POL farklı okuma çerçevelerindedir (Belcourt ve Farabaugh, 1990). Retrovirüslerde kapsid yapısını oluşturan GAG proteini ilk başlama kodonundan sonlandırma kodonuna kadar olan bölgeden sentez edilir. POL proteini sentezi için bu sonlandırma kodonu bölgesi ribozomların +1 frameshift mekanizmasıyla geçilir ve translasyon devam eder. Sentezlenen protein GAG-POL protein füzyonudur (Farabaugh 1995). GAG ve GAG-POL protein füzyonlarının sentezlenme oranlarında belirli bir denge vardır. Frameshift için farklı virüslerde farklı mekanizmalar kullanılmakla birlikte genellikle retroviral mRNA'dan % 70 oranında sadece GAG proteini sentez edilir. GAG-POL füzyonunun frameshift ile sentez edilme frekansı ise % 20-30'dur. Retrovirüslerin kapsid dışındaki protein zar yapısında bulunan ve Envelop proteinleri (ENV) olarak adlandırılan proteinler ise daha farklı şekilde sentez edilir. Retroviral mRNA'nın envelop proteinini kodlayan kısmı kesilerek kısa bir subgenomik mRNA oluşturulur.

Bir retroviral parçacık içinde kapsid proteinleri tarafından paketlenmiş olarak iki adet mRNA ve revers transkripsiyonun başlamasında primer olarak kullanılan bir tRNA bulunmaktadır. Primer olarak kullanılan tRNA'nın türü retrovirüse göre farklılık gösterir. Ty2'de revers transkriptaz tarafından primer olarak kullanılan tRNA normal olarak hücrede bulunan ve hücrede metionin taşıyan tRNA-met'dir (Voytas ve Boeke 1993, Roth 2000).

2. 3. 1. *S. cerevisiae*'da Ty Elementleri

Ty retrotranspozonları (Transposon Yeast), retrovirüslere benzer özellikleri olan ve RNA aracılığı ile *S. cerevisiae* genomunda yer değiştiren hareketli genetik elementlerdir (Cameron ve ark. 1979, Clark ve ark. 1988). *S. cerevisiae*'da 5 farklı sınıf Ty retrotranspozonu bulunmaktadır (Ty1-Ty5). Bu gruplar birbirlerinden 5' ve 3' uçlarındaki tekrarlı nükleotid dizilerinin (Long Terminal Repeat, LTR) özelliklerine göre ayırt edilirler. Bu LTR dizileri Ty1 ve Ty2'de "delta" elementleri olarak da adlandırılır (Cameron ve ark. 1979). *S. cerevisiae*'nin genomunun tamamlanmasıyla retrotranspozonların genomdaki toplam sayıları, yapısal özellikleri ve kromozomlara

göre dağılımları belirlenmiştir (Kim ve ark. 1998). *S. cerevisiae* genomu veri tabanından elde edilen bilgilere göre her genomda 217 Ty1, 34 Ty2, 41 Ty3, 32 Ty4 ve 7 adet de Ty5 elementi olmak üzere toplam 331 retrotransposon belirlenmiştir. Bu tam uzunluktaki Ty elementlerinden başka genom içinde rekombinasyon sonucu oluşan ve sadece Ty elementlerinin LTR bölgelerini (delta elementlerini) içeren kısa elementler de belirlenmiştir. *S. cerevisiae* genomunun yaklaşık %3,1'i retrotranspozonlardan oluşmaktadır (Kim ve ark. 1998).

Ty retrotranspozonları *S. cerevisiae*'da RNA pol II tarafından transkribe edilirler. Ty mRNA'sının translasyonu ile TYA ve TYA-TYB füzyonu şeklinde iki polipeptid oluşur. Bu polipeptidlerden TYA retrovirüslerdeki GAG proteini ve TYA-TYB füzyonu da retrovirüslerdeki GAG-POL protein füzyonuna benzerlik gösterir (Farabaugh 1996). TYA ve TYB peptidleri proteolitik olarak çeşitli proteinlere ayrıştırılır. Retroviral gag geni gibi TYA, Ty virüs benzeri parçacıkların ana komponentlerini kodlar (Farabaugh 1995, 1996). Ty elementleri *S. cerevisiae*'da virüs benzeri parçacıklar (VLP) oluştururlar (Roth 2000). Bu virüs benzeri parçacıklarda iki adet Ty mRNA'sı ve primer olarak kullanılmak üzere bir adet tRNA molekülü bulunmaktadır. Ty-VLP'nin dış, kapsid kısımlarında TYA proteini bulunurken, iç kısımda TYA-TYB füzyon proteininin enzimatik aktivitesini oluşturan bir grup enzim polipeptidi bulunur. TYB'nin proteolitik parçalanması sonucunda, proteaz, revers transkriptaz, RNaz-H ve integras proteinleri oluşur. Ty tarafından kodlanan proteinlerde retroviral ENV geninin bir homoloğu yoktur. Bu nedenle Ty retrotranspozonları bir hücreden diğerine geçemezler (Wickner 1989, Ciriacy 1995). Fakat buna rağmen doğada Ty elementi içermeyen *S. cerevisiae* suşlarına çok çok nadir olarak rastlanmaktadır (Garfinkel ve ark. 2003). Bunun nedeni olarak da *S. cerevisiae* hücrelerinin mating sonucu diploid hücreler oluşturması ve diploid hücrelerin de spor oluşturarak tekrar haploid hücreleri oluşturması gösterilmektedir.

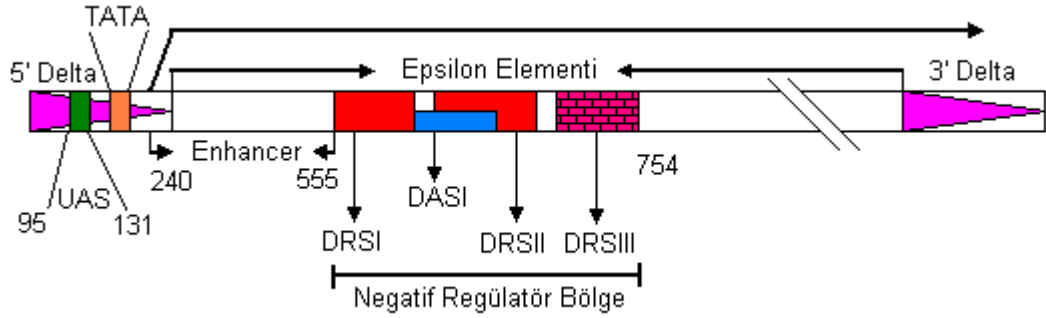
2. 3. 2. Retrotransposon Ty2-917'nin yapısal özellikleri ve transkripsiyonunun kontrolü

Retrotransposon Ty2-917 yapısal özellikleri nedeniyle *S. cerevisiae* retrotransposonlarının Ty2 gurubunda yer almaktadır. Toplam genom uzunluğu 5.9 Kbp olan Ty2-917 elementinin 5' ve 3' uçlarındaki tekrarlı dizilerin uzunluğu da 330-335 bp

kadardır. Bu tekrarlı dizilere LTR da denilmektedir (Cameron ve ark. 1979, Farabaugh ve Fink 1980). Ty2-917 retrotranspozonunun transkripsiyonunu düzenleyen bölgeleri, 5' delta elementini ve kodlama bölgesinin yaklaşık 600 bp'lik kısmını da içeren ilk 1 kbp'lik kısmında bulunur (Farabaugh ve ark. 1989). Transkripsiyon 5' delta elementinin içinde başlar ve 3' delta elementinin içinde sonlanır (Şekil2-4). 5' delta elementinin içinde bir bazal promotor elementi, TATAAA dizisi bulunur (Farabaugh ve Ark. 1989, Liao ve ark. 1987). TATAAA dizisinin 5' tarafında (Upstream bölgede) transkripsiyonun aktivasyonu için gerekli olan (UAS) bölge belirlenmiştir (Liao ve ark. 1987). UAS elementinin delesyonunun Ty2-917 transkripsiyonunda önemli miktarda azalmalara neden olduğu bulunmuştur (Liao ve ark 1987). Ty2-917 transkripsiyona pozitif etkili ikinci bir bölge de enhancer elementidir (Şekil2-4). Transkripsiyonu aktive eden bu bölge 240 bp'den 550 bp'ye uzanır ve Ty2 nin transkribe edilen bölgesi içinde yer alır (Farabaugh ve ark. 1989). Enhancer elementinin delesyonu sonucu da Ty2-917 transkripsiyonunda çok fazla miktarda azalma olduğu bulunmuştur (Farabaugh ve ark. 1989). Enhancer elementi tipik eukaryotik aktivatör elementleri gibi heterolog genlerin promotorlarından transkripsiyonu aktive edebilir.

Ty2-917 elementinin UAS ve enhancer bölgelerine spesifik olarak bağlanıp transkripsiyonu aktive eden faktörler Gcr1p ve Gcr2p olarak belirlenmiştir (Türkel ve ark. 1997, Türkel 2002). Gcr1p'nin hem UAS ve hem de enhancer elementi içinde bir çok bölgeye spesifik olarak bağlandığı DNA foot-print tekniği kullanılarak gösterilmiştir. Bu in-vitro sonuçlara ek olarak, *gcr1* ve *gcr2* mutanları *S. cerevisiae* hücrelerinde Ty2-917 elementi transkripsiyonun yaklaşık 100 kat azaldığı da bulunmuştur (Türkel ve ark. 1997, Türkel 2002).

Ty2-917 elementinde transkripsiyonun baskılanmasını sağlayan bir DNA bölgesi de belirlenmiştir. Negatif düzenleyici bölge olarak adlandırılan bu bölge Enhancer bölgesinin 3' yönünde yer alır. Yaklaşık 200 bp uzunluğundaki bu kontrol bölgesi Ty2-917 elementinde 555. nükleotit'den 754. nükleotide kadar uzanan bölgede yer almaktadır (Farabaugh ve ark 1993). Bu negatif düzenleyici bölge Ty2-917 transkripsiyonunda yaklaşık 8-kat bir azalmaya neden olur. Negatif düzenleyici bölgeye bağlanıp transkripsiyonun baskılanmasına neden olan transkripsiyon faktörleri henüz belirlenememiştir.



Şekil 2.4. Ty2-917’de transkripsiyon kontrol bölgeleri. Numaralandırma Ty2-917’de 1. Nükleotide göre yapılmıştır (Bayram 2003).

S. cerevisiae’da Ty1 veya delta elementine bağlı olarak yapılan transkripsiyonuna etki eden bazı kromatin faktörleri de belirlenmiştir. Bu faktörlerin çoğunlukla kromatin yapısını değiştiren *SPT* gurubu faktörler olduğu gösterilmiştir (Hahn ve ark.1989, Eisenmann ve ark. 1992, Yamaguchi ve ark. 2001). Ty veya Ty delta elementine bağlı olarak yapılan transkripsiyona etki eden bazı *SPT* faktörlerinin de aslında *S. cerevisiae*’daki histon proteinleri olduğu bulunmuştur. Bunlardan SPT11 ve SPT12’nin H2A ve H2B genleri tarafından kodlanan proteinler oldukları gösterilmiştir (Sherwood ve Osley 1991). Bunların dışında SPT4, SPT5 ve SPT6 faktörlerinin de Ty1 ve Ty1 delta elementine bağlı transkripsiyon için gerekli oldukları gösterilmiştir (Swanson ve Winston 1992).

SPT proteinleri dışında Ty1 delta elementine bağlı olarak yapılan transkripsiyona SAGA kompleksinin etki ettiği de gösterilmiştir (Dudley ve ark. 1999a). SAGA kompleksini oluşturan SPT3 veya SPT20 altbirimlerinde oluşan mutasyonun Ty1 delta elementine bağlı olarak yapılan transkripsiyonda 10 kat kadar azalma olduğu bulunmuştur (Dudley ve ark. 1999a). Ty1 retrotranspozonu transkripsiyonunun genom içinde bulunduğu bölgelere göre kromatin yapısındaki değişiklikler nedeniyle transkripsiyonunda 50-kat kadar azalma olabildiği de gösterilmiştir (Morillon ve ark. 2002).

Kromatin faktörlerinin *S. cerevisiae*’da retrotranspozonlara etkilerinin analizinde Ty1 elementi veya delta elementlerinin kullanıldığı görülmektedir. Ty2-917

transkripsiyonuna *S. cerevisiae* kromatin faktörlerinin etkileri henüz analiz edilmemiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3. 1. Araştırmada Kullanılan Maya Suşları

Bu araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşlarından YST150 ve YST151 Dr. N. Lehming'den sağlandı (University of Singapour-Singapour). Diğer suşlar ise Frankfurt Üniversitesi'nden sağlandı. *S. cerevisiae* suşlarının genotipleri çizelge 3.1.'de verildi.

Çizelge 3.1. Bu araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşlarının genotipleri.

Maya Suşu	Genotipi ve ilgili mutasyon
YST 124	MAT a <i>his3Δ; leu2Δ0; Met15Δ0; ura3Δ0</i> (Yaban Tip)
YST 150	MAT a <i>Ura3-52, leu2-3, his3Δ200, lys2-801, trp1Δ63, ade2::hisG</i> (Yaban tip)
YST 151	MAT a <i>Ura3-52, leu2-3, his3Δ200, lys2-801, trp1Δ63, ade2::hisG Δnhp6A, Δnhp6B</i> (nhp6A/B mutanı)
YST 161	MAT a <i>his3Δ1; leu2Δ0; Met15Δ0; ura3Δ0. YNL330c::kanMX4</i> (rpd3 mutanı)
YST 162	MAT a <i>his3Δ1; leu2Δ0; Met15Δ0; ura3Δ0. YNL021c::kanMX4</i> (hda1 mutanı)
YST 163	MAT a <i>his3Δ1; leu2Δ0; Met15Δ0; ura3Δ0. YPL042c::kanMX4</i> (srb10 mutanı)
YST 164	MAT a <i>his3Δ1; leu2Δ0; Met15Δ0; ura3Δ0. YOR304c::kanMX4</i> (iswi2 mutanı)
YST 165	MAT α <i>his3Δ1; leu2Δ0; Met15Δ0; lys2Δ0 ura3Δ0. YDL005c::kanMX4</i> YST (med2 mutanı)
YST 166	MAT a <i>his3Δ1; leu2Δ0; Met15Δ0; ura3Δ0. YDL002c::kanMX4</i> (nhp10 mutanı)
YST 167	MAT a <i>his3Δ1; leu2Δ0; Met15Δ0; ura3Δ0. YBR081c::kanMX4</i> (spt7 mutanı)

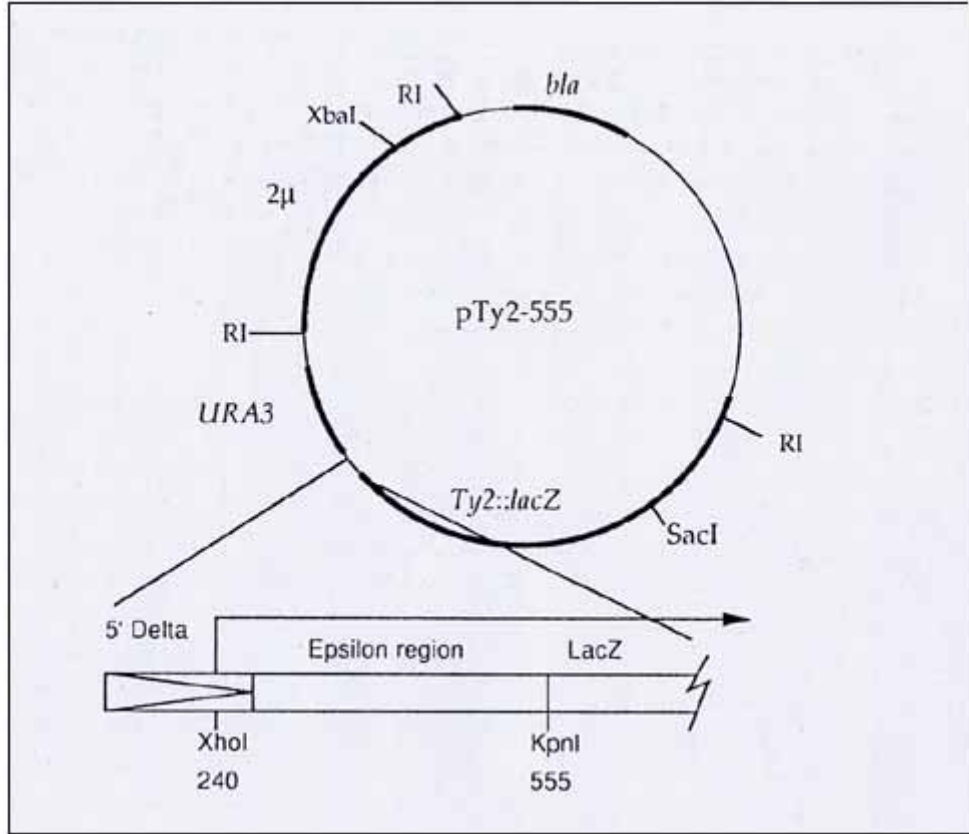
3. 2. *S. cerevisiae* Suşlarının Üretilmesi

Araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşları rutin çalışmalar için zengin ortam olarak kullanılan YPD (%1 yeast extract, %2 peptone, 2% glikoz) üreme ortamında, adenin mutanlığı olan YST150 ve YST151 suşları da YPAD (YPD + % 0.2 g adenin) ortamlarında üretildi (Rose ve ark. 1990) (Ek 1). Bu stoklardan katı besi yerine (YPD +%2 agar veya YPAD +%2 agar) ekim yapılarak stoklar oluşturuldu. Deneylerimiz boyunca taze *S. cerevisiae* kültürlerinin hazırlanmasında YPD veya YPAD petriplerinde üretilen bu stoklar kullanıldı. Maya stokları petriplerde 4 °C’de saklandı. Araştırmada kullanılan çözeltilerin içerikleri ve hazırlanması ek-1’de verildi.

Transformantlar urasil içermeyen sentetik tam (-Ura, SC) üreme ortamlarında üretildi (Rose ve ark. 1990) (Ek-1).

3. 3. Araştırmada Kullanılan Plazmidler

Bu araştırmada, pTy2-555-lacZ, pTy2-754-lacZ, pEnc-lacZ, pCyc1-lacZ plazmidleri kullanıldı. Ty2-lacZ, Suc2-lacZ Cyc1-lacZ gen füzyonlarını içeren plazmidler daha önceki araştırmalarda hazırlanmıştır (Guarente ve Ptashne 1981, Farabaugh ve ark. 1989, Sarokin ve Carlson 1985). Plazmidler *E. coli-S. cerevisiae* mekik türü vektörler olup *S. cerevisiae*’da replikasyon ve mitotik stabilite için 2µ plazmidinin bir bölümünü içerirler. *S. cerevisiae*’da seçici marker gen olarak URA3 genini içermektedirler. Ayrıca, bu plazmidler *E. coli*’de çoğaltma ve replikasyon için Ampisilin’e direnç geni (β -laktamaz) ve ColE replikasyon orijini de içermektedirler.



Şekil 3.1. Ty2-555-lacZ gen füzyonunu içeren plazmidin yapısı (Farabaugh ve ark. 1993).

3. 4 Plazmidlerin *E.coli*'ye Transformasyonu ve Saflaştırılması

Araştırmada kullanılan gen füzyonlarının bulunduğu plazmidler *E. coli*'de çoğaltıldı. Bunun için önce *E. coli* DH5α hücreleri 10 ml LB (%1 Bacto- tripton, %0.5 yeast extract, %1 NaCl) sıvı ortamda logaritmik faza kadar 37 °C'de üretildi (Ek-1). Bakteri hücreleri MgCl₂, CaCl₂ yöntemi kullanılarak kompetant hale getirildi (Ausubel ve ark. 1987). Kompetant bakteriden 150 µl alındı ve yaklaşık 0,1-0,5 µg plazmid eklendi. Plazmidlerin *E. coli*'ye transformasyonu standart yöntemlerle yapıldı (Ausubel ve ark. 1987). Plazmid *E. coli* karışımı buz içinde 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda 42 °C'de 2 dakika ısı şokuna uğratıldı ve tekrar 2 dakika buzda bekletildi. Daha sonra bakteri-plazmid karışımına 850 µl LB ilave edildi ve 37 °C'de 1 saat bekletildi. Bu işlemden sonra da transformant bakterilerin seçimi için 100 µl'lik bakteri karışımı LB-Ampisilin petrilere ekildi ve petrilere 37 °C'de 1 gece bekletildi (Ausubel ve ark. 1987). LB-Ampisilin'de üreyip, koloni oluşturan transformantlardan tek koloni alınarak

tekrar LB-ampisilinli petrilere ekim yapıldı. Plazmid izolasyonu için bu petrilere sıvı 10 ml LB-ampisilin ortamına ekim yapıldı ve karıştırmalı inkübatörde 37 °C 140 dönüş/dakika hızda üretildi.

E.coli'ye transform edilen plazmidler Amresco-Cyclo-Prep miniprep plazmid DNA saflaştırma kiti kullanılarak izole edildi. Bu kit sayesinde 1ml *E.coli*'den 2-15µg plazmid DNA'sı ($A_{260}/A_{280} \geq 1,8$) elde edildi. Saflaştırma işleminde üretici firma tarafından verilen yöntem izlendi. Plazmid DNA'ları 100 µl'lik 1x TE (pH:7.4) çözeltisi içinde -70°C de saklandı.

3. 5. Plazmidlerin *S. cerevisiae*'ya Transformasyonu

Plazmidlerin *S. cerevisiae* hücrelerine transformasyonunda daha önce tanımlandığı şekilde lityum asetat polyetilen glikol yöntemi kullanıldı (Ito ve ark. 1983). Transformasyon için önce *S. cerevisiae* suşları 10 ml YPAD ortamında logaritmik aşamaya kadar üretildi (Rose ve ark. 1990). Daha sonra hücreler santrifüjde çöktürülüp 10 ml steril saf su ile yıkandı ve tekrar santrifuj ile 2000 g'de çöktürüldü. Sıvı faz atılıp çöken *S. cerevisiae* hücreleri 3.5 ml taze hazırlanmış steril 0.1M lityum asetat çözeltisi ile bir saat karıştırmalı etüde 140 dönüş/dakika hızda bekletildi. Bu süre sonunda hücrelerden 500 µl steril mikrofuj tüplerine alınarak üzerlerine 3-5 µg plazmid DNA'sı ve 1-2 µg denatüre edilmiş herring sperm DNA'sı ilave edilip 30 °C'de 30 dakika bekletildi. Daha sonra bu hücrelerin üzerine 1ml %50'lik steril polyetilen glikol (PEG-4000) ilave edilip 30 °C'de 1 saat bekletildi. Bekleme süresi sonunda *S. cerevisiae* hücreleri ısı şoku için 42 °C'de 5 dakika bekletildi. Bundan sonra hücreler mikrosantrifüjde 12500 rpm'de çöktürüldü ve 1 ml steril su ile yıkandı. Tekrar çöktürülen maya hücreleri 150 µl steril saf suda çözündü ve bu hücre süspansiyonundan 75 µl alınıp urasil içermeyen sentetik tam minimal üreme ortamı (-Ura, SC + %2 glukoz) petrilere ekim yapıldı. Transformantlar yaklaşık 3-4 gün sonra seçilip yeni petrilere üretilerek β-galaktozidaz deneyi için daha önce tanımlandığı şekilde hazırlandı (Guarente 1983).

3. 6. β-Galaktosidaz Aktivitelerinin Ölçülmesi

Maya transformantları önce 3'lü olarak 5ml -ura SC %2 glukoz içeren üreme ortamında durağan faza kadar üretildi (yaklaşık 20-24 saat). Adenin mutantları için

üreme ortamına %0.2 g Adenin ilave edildi. Daha sonra bu transformantlardan 50µL alınıp 5 ml taze -Ura, SC + %2 glukoz üreme ortamına ekim yapılarak aynı şartlarda logaritmik faza kadar (A_{600} : 1.0) üremeleri sağlandı. Bu süre sonunda hücrelerin yoğunluğu OD_{600} değerleri ölçülerek belirlendi. Hücreler santrifüj ile 2000 rpm' de çöktürüldü. Çöktürülen hücreler 1 ml steril saf su ile bir kez yıkanıp tekrar çöktürüldü. Bu hücreler mikrofüj tüplerinde çöktürüldükten sonra üzerlerindeki sıvı kısım atıldı ve hücre çökeltisinin üzerine 200µL Breaking Buffer eklendi (Ek-1). Hücreler bu şekilde -70 C⁰'de donmaya bırakıldı.

β -Galaktozidaz aktivitelerinin ölçülmesi için dondurulan ve daha sonra oda sıcaklığında çözülen hücre süspansiyonlarına permeabilizasyon için 20 µl saf kloroform ve 20 µl 0.1%'lik SDS ilave edilerek 10-15 saniye vortekslendi. Permeabilize edilen hücre süspansiyonlarından 20-40 µl'lik bir karışım alınarak toplam hacim 1ml olacak şekilde β -galaktozidaz tampon çözeltisi (Z-Buffer) içine kondu. Daha sonra bu deney çözeltisine 200 µl ONPG eklenerek 30 °C'de açık sarı renk oluşuncaya kadar beklenerek geçen süre belirlendi. Bekleme süresi sonunda reaksiyon 500 µl 1M sodyum karbonat ilave edilerek durduruldu. Reaksiyon tüpleri 1000 g'de santrifj edildi, hücreler çöktürüldü. Çözelti absorbansı 420'nm'de belirlendi. Deneylerde her suş için 3 transformant kullanıldı. Deneyler üçlü olarak yapıldı ve en az iki kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçlarda standart sapmanın %10'nun altında olduğu bulundu. β -galaktozidaz aktiviteleri Ek-2'de verilen yöntemle göre hesaplandı ve Miller Ünitesi (MÜ) olarak verildi.

4. SONUÇLAR

4. 1. Non-histon Protein 6A/B'nin Ty2 Transkripsiyonuna Etkileri

Non-histon proteinleri 6A ve 6B *S. cerevisiae*'da kromatin oluşumuna katılan faktörler olup farklı genlerin transkripsiyonlarına olan etkileri daha önce rapor edilmiştir (Moreira ve Holmberg 2000, Yu ve ark. 2000). Nhp6A/B proteinlerinin DNA'da katlanmalara neden olduğu da daha önce belirlenmiştir (Paull ve Johnson 1995).

S. cerevisiae'da kromatin oluşumuna önemli etkileri olduğu bilinen Nhp6A/B'nin Ty2-917 transkripsiyonuna etkisi olup olmadığı araştırıldı. Ty2-917'nin farklı bölümlerini gen füzyonu olarak içeren plazmidler işlevsel Nhp6A/B proteinini içeren ve bu faktör için yaban tip suş olan YST150 ve *nhp6A/B* mutant suşlarına ayrı ayrı transform edildi. Yaban tip ve mutant *S. cerevisiae* suşlarından yapılan Ty2-lacZ gen füzyonu transkriptlerinin seviyeleri karşılaştırıldığında Nhp6A/B proteinlerinin Ty2-917 transkripsiyonu için mutlaka gerekli oldukları görüldü. Ty2-917 elementinin UAS ve enhancer bölgesini içeren Ty2-555-lacZ gen füzyonunun transkripsiyonunun *nhp6A/B* mutant suşunda yaklaşık 20 kat azaldığı bulundu (Çizelge 4-1). Benzer şekilde Ty2-754 ve enhancer elementine bağlı transkripsiyon miktarlarında da sırasıyla 6 ve 30 kat azalma olduğu belirlendi. Elde edilen bu sonuçlar Ty2-917 transkripsiyonunun kromatin faktörleri olan Nhp6A/B'ye bağlı olduğunu gösterdi.

Kontrol gen füzyonu olarak kullanılan Cyc1-lacZ gen füzyonunun transkripsiyonunda da *nhp6A/B* mutant suşunda yaban tip suş ile kıyaslandığında yaklaşık 6 kat'lık bir azalma olduğu görüldü (Çizelge 4-1). *CYCI* geni transkripsiyonunun Nhp6A/B'ye bağımlı olduğu ve *nhp6A/B* mutant suşlarında 9-20 kadar azaldığı daha önce de rapor edilmiştir (Moreira ve Holmberg 2000). *CYCI*'e ek olarak *S. cerevisiae* *SUC2* geni de ikinci bir kontrol gen füzyonu olarak kullanıldı. Suc2-lacZ gen füzyonundan yapılan bazal seviyedeki transkripsiyonun Nhp6A/B faktörlerinden etkilenmediği görüldü.

Çizelge 4. 1. Nhp6A/B'nin Ty2 transkripsiyonuna etkileri.

Gen Füzyonları	β -Galaktozidaz Aktiviteleri (MÜ)	
	YST150 (Yaban Tip)	YST151 (Δ nhp6A/B)
Ty2-555-lacZ	185	9
Ty2-754-lacZ	20	3
Ty2 Enhancer-lacZ	94	3
Suc2-lacZ	1	2
Cyc1-lacZ	30	5

4. 2. Histon Deasetilaz Kompleksinin Ty2 Transkripsiyonuna Etkileri

Birinci tip histon deasetilaz kompleksinin (HDAC-1) önemli bir alt birimi olan Rpd3p nükleozomlardaki histonların deasetillenmesine neden olur. Bunun sonucu olarak da nükleozomların kromatinde kalmalarını sağlayıp bazı genlerde transkripsiyonun baskılanmasına neden olur. Ty2-917 transkripsiyonunun nükleozom deasetilasyonuna bağlı olarak baskılanıp baskılanmadığını araştırmak için yaban tip ve *rpd3* mutantı maya suşlarında Ty2-lacZ gen füzyonlarından yapılan transkripsiyon seviyeleri belirlendi (Çizelge 4-2). Elde edilen sonuçlar Ty2-lacZ gen füzyonu transkripsiyonunun Rpd3p tarafından yapılan histon deasetilasyonuna bağlı olmadığını gösterdi. Ty2-555, Ty2-754 ve enhancer elementine bağlı transkripsiyonların hem yaban tip ve hem de *rpd3* mutant suşlarında yaklaşık olarak aynı miktarlarda yapıldığını gösterdi (Çizelge 4-2).

Ty2-917 transkripsiyonuna ikinci tip histon deasetilazların (HDAC-II) etkileri de araştırıldı. Bunun için Ty2-lacZ gen füzyonlarını içeren 2 μ M-URA3 plazmidleri *hda1* mutant suşuna transform edildi. *hda1* mutant suşunda da *rpd3* mutantı ile elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar elde edildi (Çizelge 4-2). Ty2-lacZ gen füzyonu transkripsiyonlarının yaban tip ve *hda1* mutant suşlarında yaklaşık olarak aynı seviyede oldukları belirlendi (Çizelge 4-2). Elde edilen bu sonuçlar Ty2-917 transkripsiyonunun

Çizelge 4. 2. Rpd3p ve Hda1p'nin Ty2 transkripsiyonuna etkileri

Gen Füzyonları	β -Galaktozidaz Aktiviteleri		
	YST124 (Yaban Tip)	YST161 (Δ rpd3)	YST162 (Δ hda1)
Ty2-555-lacZ	530	467	589
Ty2-754-lacZ	40	49	48
Ty2 Enhancer-lacZ	230	203	171
Suc2-lacZ	3	4	6
Cyc1-lacZ	39	57	58

HDAC-1 veya HDAC-II işlevine bağlı olarak oluşan histon deasetillenmesi ve buna bağlı olarak oluşan kromatin oluşumuna bağlı olmadığını gösterdi.

Kontrol gen füzyonu olarak kullanılan Cyc1-lacZ gen füzyonu transkripsiyonunda *rpd3* ve *hda1* mutantlarında oluşan artış CYC1 geni transkripsiyonunun histon deasetilaz aktivitesi ile kontrol edildiğini gösterdi (Çizelge 4-2). Bununla birlikte kontrol gen füzyonu olarak kullanılan Suc2-lacZ gen füzyonu bazal transkripsiyonunun HDAC1 ve HDAC-II komplekslerine bağlı olmadığını da buldu.

4. 3. Mediatörlerin Ty2 Transkripsiyonuna Etkileri

S. cerevisiae'da transkripsiyon aktivatörlerinin bazal promotora etki edebilmesi için mediatör kompleksi kullanılır. Mediatör kompleksinin çok fazla sayıda alt birimi olup her bir alt birim farklı transkripsiyon faktörleri ve farklı genlere göre transkripsiyonun aktivasyonu veya baskılanması için gereklidir (Guglielmi ve ark. 2004). Bu araştırmada da mediatör kompleksinin iki farklı alt biriminin (Srb10p ve Med2p) Ty2 transkripsiyonuna etkileri araştırıldı (Çizelge 4. 3). *srb10* mutanı *S. cerevisiae* suşunda Ty2-555 ve özellikle Ty2-754 gen füzyonlarından yapılan transkripsiyonda önemli miktarda artış olduğu bulundu. Ty2 enhancer elementine bağlı

olarak heterolog promotordan yapılan transkripsiyonda ise önemli bir değişiklik gözlenmedi.

Çizelge 4. 3. Med2p ve Srb10'nin Ty2 transkripsiyonuna etkileri.

Gen Füzyonları	β-Galaktozidaz Aktiviteleri		
	YST124 (Yaban Tip)	YST163 (Δsrb10)	YST165 (Δmed2)
Ty2-555-lacZ	530	791	182
Ty2-754-lacZ	40	115	62
Ty2 Enhancer-lacZ	230	227	85
Suc2-lacZ	3	1	7
Cyc1-lacZ	39	44	61

S. cerevisiae mediatör kompleksinde yer alan Srb10p'nin Ty2 transkripsiyonuna negatif yönde etki ettiği bulundu (Çizelge 4. 3). Srb10p'nin bazı transkripsiyon aktivatörlerine negatif yönde etki ettiği daha önce de gösterilmiştir (Chi ve ark. 2001).

Mediatör kompleksinde yer alan diğer bir alt birim olan Med2p'nin de Ty2 transkripsiyonunun aktivasyonu için gerekli olduğu bulundu. *med2* mutanı *S. cerevisiae* suşu olan YST165'de Ty2-555-lacZ gen füzyonu transkripsiyonunda yaklaşık 3 kat'lık bir azalma olması Med2p'nin Ty2-555-lacZ gen füzyonundan aktivasyon için gerekli olduğunu göstermektedir (Çizelge 4. 3). Benzer şekilde enhancer elementi tarafından aktive edilen transkripsiyonda da *med2* mutantında 2.7 kat azalma olduğu bulundu. Fakat Ty2-754-lacZ gen füzyonu transkripsiyonunda ise *med2* mutanı maya suşunda yaklaşık %50'lık bir artış olduğu görüldü. Bu sonuç daha önce rapor edildiği gibi promotor yapısında olan değişikliklerin mediatörlerin etki mekanizmasını da değiştirebileceğini göstermektedir (Balciunas ve ark. 1999).

Cyc1-lacZ gen füzyonu transkripsiyonunun Srb10p'ye bağı olmadığı bulundu. Cyc1-lacZ gen füzyonu transkripsiyonunun yaban tip ve *srb10* mutanıtı *S. cerevisiae* suşunda yaklaşık olarak aynı miktarlarda yapıldığı bulundu (Çizelge 4. 3). Fakat Cyc1-lacZ gen füzyonu transkripsiyonunda *med2* mutanıtında yaklaşık %50 kadar artış olduğı görüldü. Bu sonuç da Cyc1-LacZ transkripsiyonu için Med2p'nin gerekli olduğunu göstermektedir. Suc2-lacZ gen füzyonu transkripsiyonunun da hem *srb10* hem de *med2* mutanıt suşlarında yaklaşık aynı miktarda yapıldığı gösterildi (Çizelge 4. 3).

4. 4. Nhp10'un Ty2 Transkripsiyonuna Etkileri

S. cerevisiae'da bulunan bir diğerkromatin faktörü olan Non-histone protein 10'un da (Nhp10p) Ty2-917 transkripsiyonuna etkileri araştırıldı. Ty2-lacZ gen füzyonlarının transkripsiyonlarında *nhp10* mutanıtı *S. cerevisiae* suşunda herhangi bir değışiklik olmadığı görüldü (Çizelge 4. 4). Kontrol gen füzyonu olarak araştırmamızda kullanılan Cyc1-lacZ ve Suc2-lacZ gen füzyonlarının transkripsiyonlarında da mutanıt suşda herhangi bir değışikliğe rastlanmadı.

Çizelge 4. 4. *S. cerevisiae* Nhp10p'nin Ty2 transkripsiyonuna etkileri.

Gen Füzyonları	β -Galaktozidaz Aktiviteleri	
	YST124 (Yaban Tip)	YST166 ($\Delta nhp10$)
Ty2-555-lacZ	530	483
Ty2-754-lacZ	40	38
Ty2 Enhancer-lacZ	230	208
Suc2-lacZ	3	1
Cyc1-lacZ	39	43

4.5. Iswi2'nin Ty2 Transkripsiyonuna Etkileri

Iswi gurubu kromatin faktörleri ATP'ye bağlı olarak kromatin yapısını değiştirip hedef genlerin transkripsiyonlarının kontrol edilmesini sağlayan faktörlerden birisidir. Iswi2p'nin Ty2-917 transkripsiyonunun aktivasyonu için gerekli olduğu bulundu (Çizelge 4. 5). Ty2-555-lacZ gen füzyonu transkripsiyonunun *iswi2* mutantında yaklaşık 2 kat azalması Iswi2p'nin Ty2 transkripsiyonu aktivasyonu için gerekli olduğunu gösterdi. Ty2 enhancer elementine bağlı olarak yapılan transkripsiyonda da 2 kat azalma olması Iswi2p'nin Ty2 enhancer elementine bağlı transkripsiyon faktörleri için gerekli olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4. 5. *S. cerevisiae* Iswi2p'nin Ty2 transkripsiyonuna etkileri

Gen Füzyonları	β -Galaktozidaz Aktiviteleri	
	YST124 (Yaban Tip)	YST164 (Δ iswi2)
Ty2-555-lacZ	530	257
Ty2-754-lacZ	40	34
Ty2 Enhancer-lacZ	230	104
Suc2-lacZ	3	3
Cyc1-lacZ	39	51

Ty2-754-lacZ gen füzyonundan yapılan transkripsiyon bu gen füzyonunda yer alan negatif düzenleyici bölge nedeniyle Ty2-555-lacZ'ye göre yaklaşık 13 kat daha az miktarda yapılmaktadır. Buna rağmen Ty2-754-lacZ gen füzyonu transkripsiyonunda da bir miktar azalma olması Iswi2p'nin Ty2 -917 transkripsiyonunun aktivasyonu için gerekli olduğunu göstermektedir (Çizelge 4. 5).

Kontrol gen füzyonu Cyc1-lacZ transkripsiyonunda artış gözlenmesi Iswi2p'nin Cyc1 transkripsiyonunun baskılanmasında gerekli olduğunu gösterdi. Suc2-lacZ gen füzyonu bazal transkripsiyonunda ise yaban tip ve *iswi2* mutant suşları arasında önemli bir farklılık gözlenmedi (Çizelge 4. 5).

4.6. SAGA Kompleksinin Ty2’de Transkripsiyona Etkileri

SAGA kompleksinin de *S. cerevisiae*’da histonları asetilleyip kromatin yapısını lokal olarak değiştirdiği bilinmektedir. SAGA kompleksinin DNA bölgelerine taşınması DNA’ya bağlanan aktivatör veya represör proteinler aracılığı ile olmaktadır. SAGA kompleksinin Ty1 transkripsiyonunu veya delta elementine bağlı olarak yapılan transkripsiyonun aktivasyonu için gerekli olduğu daha önce gösterilmiştir (Dudley ve ark. 1999b). Bu araştırmada ise SAGA kompleksinin Ty2-917 transkripsiyonun etkileri araştırıldı.

SAGA kompleksinin histon asetil transferaz aktivitesine bağlı olarak hedef genlerin promotorlarında gerçekteşen yapısal değişikliğin Ty2 transkripsiyonu için de gerekli olduğu bulundu (Çizelge 4. 6). Ty2-lacZ gen füzyonlarının transkripsiyonlarında *spt7* mutanıtı *S. cerevisiae* suşunda yaban tip’de yapılan transkripsiyon miktarına göre önemli miktarda azalmalar olduğu bulundu (Çizelge 4. 6).

Çizelge 4. 6. SAGA kompleksinin Ty2 transkripsiyonuna etkileri

Gen Füzyonları	β -Galaktozidaz Aktiviteleri	
	YST124 (Yaban Tip)	YST167 (Δ spt7)
Ty2-555-lacZ	530	63
Ty2-754-lacZ	40	22
Ty2 Enhancer-lacZ	230	44
Suc2-lacZ	3	5
Cyc1-lacZ	39	35

Ty2-555-lacZ gen füzyonunda *spt7* mutant suşunda yapılan transkripsiyonda 8.4 kat azalma olduğu bulundu. Benzer şekilde, Enhancer elementine bağlı olarak heterolog gen promotorundan yapılan transkripsiyonda da yaklaşık 5 katlık bir düşüş olduğu gözlemlendi. Ty2-754-lacZ gen füzyonu transkripsiyonunda da 1.8 katlık bir azalmanın olması fonksiyonel SAGA kompleksinin Ty2-917 transkripsiyonunun aktivasyonu için gerekli olduğunu göstermektedir.

Kontrol gen füzyonları olarak kullanılan Cyc1-lacZ ve Suc2-lacZ genlerinin bazal transkripsiyon seviyelerinin *spt7* mutasyonundan etkilenmediği gösterildi.

5- TARTIŞMA

Eukaryotik genlerde transkripsiyonun başlatılabilmesi için genlerin promotor bölgelerinin açık DNA bölgeleri şeklinde olması gerekmektedir. Kromatin yapısını oluşturan faktörler *S. cerevisiae*'da da çok ayrıntılı olarak belirlenmiştir. Bunlar nükleozomlar ve non-histon proteinlerdir (Berstein ve ark. 2002, Lu ve ark. 1996). Kromatin yapısı oldukça dinamik bir yapı olup çeşitli faktörlerce açılmakta veya açık kromatin bölgeleri de sıkı paketlenmiş kromatine dönüştürülmektedir (Shidlovskii ve Nabirochkina 2005).

Eukaryotlarda transkripsiyonun işleyiş prensibine ilişkin bir çok araştırma *S. cerevisiae*'de yapılmaktadır. *S. cerevisiae*'nın kolay ve hızlı üretilmesi, transfromasyonunun ve mutant izolasyonunun kolay olması bu organizmanın ideal bir model sistem olmasını sağlamaktadır. *S. cerevisiae*'nin haploid ve diploid hücre tiplerinin bulunması da genlerin homozigot veya heterozigot olarak bulduklarındaki etkilerinin araştırılmasını, dominantlık ve resesiflik etkileşimlerinin kolay ve hızlı çalışılmasını sağlamaktadır.

Araştırmada kullanılan Ty2-917 *S. cerevisiae*'da daha önce belirlenmiş bir retrotranspozondur (Cameron ve ark. 1979). Ty2-917 eukaryotik retrovirüslere benzer özellikleri olan ve *S. cerevisiae*'da mRNA aracılığı ile çoğalan bir hareketli elementtir (Boeke ve ark. 1985). Retrotranspozon Ty2-917'nin retrovirüsler gibi hastalık yapma özelliği yoktur. Fakat *S. cerevisiae* genomunda integre olduğu bölgelerde mutasyonlara neden olabilir. Genlerin transkripsiyonlarının kontrolsüz yapılmasına veya delesyonlara da neden olabilir. Ty elementleri de model sistem olarak kullanılıp eukaryotik retrovirüslerde genlerin yapısal özellikleri ve işleyiş prensiplerinin anlaşılması sağlanmıştır (Farabaugh 1995).

Bu araştırmada da retrotranspozon Ty2-917 model sistem olarak kullanılarak retrotranspozonlarda transkripsiyonun kontrolüne çeşitli kromatin faktörlerinin etkileri araştırılmıştır. Ty2-917 retrotranspozonunun promotor yapısı daha önceki çalışmalarda ayrıntılı olarak belirlenmiştir (Farabaugh ve ark. 1993, Türkel ve Farabaugh 1993). Bu araştırmalardan elde edilen sonuçlar Ty2-917 promotorunun çok kompakt bir yapıda olduğu ve çok sayıda transkripsiyon düzenleme bölgesi içerdiğini göstermiş. Ayrıca, bu çalışmaların sonucu olarak Ty2-917'de transkripsiyonun düzenlenmesini sağlayan bütün kontrol elementlerinin ilk 754 bp'lik bölgede olduğu bulunmuştur (Farabaugh ve

ark. 1989). Bu nedenle araştırmalarımızda da Ty2-917'nin promotor bölgesi ile birlikte kontrol bölgelerini de içeren ilk 754 bp'lik bölgesi kullanılmıştır. Ty2-555 olarak gösterilen gen füzyonunda ise Ty2-917 transkripsiyonunun baskılanmasını sağlayan negatif düzenleyici bölge bulunmadığından bu gen füzyonundan yapılan transkripsiyon çok daha fazla miktardadır. Ty2-lacZ gen füzyonlarının klonlandıkları 2µM plazmidlerinin seçici üreme ortamlarında kopya sayılarının sabit olarak ve stabil şekilde transfrom edildikleri *S. cerevisiae* hücrelerinde buldukları da bilinmektedir (Farabaugh ve ark. 1989)

Ty elementleri kendi transkripsiyonları için herhangi bir düzenleyici faktör kodlamazlar. Transkripsiyonları ve bu transkripsiyonun kontrolü tümüyle konak olarak buldukları *S. cerevisiae* tarafından kodlanan transkripsiyon faktörlerince yapılmaktadır. Ty2-917 transkripsiyonunu aktive eden faktörün transkripsiyon faktörü Gcr1p kompleksi olduğu bulunmuştur (Türkel ve ark. 1997, Türkel 2002).

Ty2-917 transkripsiyonunu kontrol eden düzenleyici bölgeler promotorun 5' ve 3' tarafında bulunur. Kontrol elementlerinin bu şekilde yerleşmesi de düzenleyici faktörlerin bazal transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz II ile etkileşebilmeleri için Ty2-917 promotor bölgesinde kromatin yapısında yoğun değişiklikler ve hatta katlanmalar olmasını gerektirmektedir. Bundan dolayı bu tez araştırmasında farklı kromatin faktörlerinin Ty2-917 transkripsiyonuna etkileri araştırılmıştır. Ty2-917'nin farklı bölümleri de gen füzyonu olarak kullanılarak, kromatin faktörlerinin Ty2-917'de etki ettikleri kısım bulunmaya çalışılmıştır.

Non-histon proteinleri Nhp6A ve Nhp6B'nin *S. cerevisiae*'da bir çok genin transkripsiyonuna etki ettiği bilinmektedir (Moreira ve Holmberg 2000). Bu faktörlerin DNA'da katlanmalara neden olduğu da daha bulunmuştur (Paull ve Johnson 1995). Bu tez araştırmasında elde edilen sonuçlar da Nhp6A/B'nin Ty2 transkripsiyonu için mutlaka gerekli olduğunu göstermektedir. Ty2-lacZ gen füzyonlarının yaban tip ve *nhp6A/B* mutant suşlarındaki transkript miktarları kıyaslandığında mutant suşta önemli miktarda azalma olduğu görülmektedir. Bu sonuç Ty2-917 promotor bölgesinin büyük ölçüde Nhp6A/B tarafından organize edildiğini de göstermektedir. Nhp6A/B bulunmadığında Ty2-917 transkripsiyonunu aktive eden faktörlerin, örneğin Gcr1p kompleksinin, Ty2'ye bağlanamadığı veya bazal transkripsiyon faktörleri ile etkileşemediği öne sürülebilir.

Histon deasetilazların Ty2-917 transkripsiyonuna önemli bir etkisi olmadığı araştırma sonuçlarından görülmektedir. Buna benzer olarak Nhp10p'nin de Ty2-917 transkripsiyonuna herhangi bir etkisi belirlenememiştir. Bu sonuçlar histon deasetilasyonunun Ty2-917 transkripsiyonuna etki etmediğini göstermektedir.

Retrotranspozon Ty2-917'nin başlıca transkripsiyon aktivatörü Gcr1p kompleksidir. Gcr1p'in Ty2-917'nin transkripsiyonu aktive eden kontrol elementleri üzerinde bir çok bölgeye spesifik olarak bağlandığı gösterilmiştir (Türkel ve ark 1997, Türkel 2002). *med2* mutanları *S. cerevisiae* suşunda Ty2-555 transkripsiyonunun önemli ölçüde azalması Gcr1p'nin Med2p aracılığı ile transkripsiyonu aktive ettiğini göstermektedir. Fakat mediator kompleksinin diğer bir alt birimi olan Srb10p'nin de Ty2 transkripsiyonunun baskılanmasında işlevi olduğu bulunmuştur.

S. cerevisiae'da kromatin yapısını değiştiren faktörlerden ikisi SAGA kompleksi ve Iswi gurubu faktörlerdir. Her iki gurubun da nükleozomların buldukları bölgeden atılmalarını sağladığı bilinmektedir. Araştırma sonuçlarımız her iki faktörün de Ty2-917 transkripsiyonu için gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Hem *spt7* ve hemde *iswi* mutant suşunda Ty2-555 ve enhancer elementine bağlı olarak yapılan transkripsiyonda 2 – 8 kat azalma olması bu faktörlerin etki ettikleri bölgenin enhancer bölgesi olduğunu da göstermektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada SAGA kompleksinin Ty2-917'nin de transkripsiyonu için gerekli olan Gcr1p ile etkileştiği gösterilmiştir (Dudley ve ark. 1999b). Benzer etkileşimin SAGA kompleksi ile Ty2-917 transkripsiyonunu aktive eden faktörler ile de olduğu öne sürülebilir. Iswi ve özellikle SAGA kompleksinin Ty2 transkripsiyonu için gerekli olmaları Ty2-917 transkripsiyonunun aktivasyonu için kromatin yapısında değişiklik olması gerektiğini de göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

ARCHAMBAULT, J. ve J.D. FRIESEN. 1993. Genetics of Eukaryotic RNA Polymerases I, II, and III. *Microbiol. Rev.*, 57: 703-724.

AUSUBEL, F.M., R. BRENT, R.E. KINGSTON, D.D. MOORE, J.G. SEIDMAN, J.A. SMITH, ve K. STRUHL. 1987. *Current protocols in molecular biology*. Green Publ. Assoc. And Wiley Interscience, New York. USA. p.1.6.1-1.6.6.

BALCIUNAS, D., C. GALMA, H. RONNE, ve S. BJÖRKLUND. 1999. The med1 subunit of the yeast mediator complex is involved in both transcriptional activation and repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 376-381.

BAYRAM, Ö. 2003. Ortam şartlarının Ty2 retrotranspozonu transkripsiyonuna ve frameshift oranına etkilerinin analizi. Yüksek lisans tezi. Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Bursa. S. 11.

BELCOURT, M.F. ve P.J. FARABAUGH. 1990. Ribosomal frameshifting in the yeast retrotransposon Ty: tRNAs induce slippage on a 7 nucleotide minimal site. *Cell*, 62: 339-352.

BERNSTEIN, B.E. ve S.L. SCHREIBER. 2002. Global approaches to chromatin. *Chem. Biol.*, 9:1167-1173

BHAUMIK, S.R. ve M.R. GREEN. 2002. Differential requirement of SAGA components for recruitment of TATA-box-binding protein to promoters in vivo. *Mol. Cell. Biol.*, 22:7365-7371.

BOEKE, J.D, D.J. GARFINKEL, C.A. STYLES, ve G.R FINK. 1985. Ty elements transpose through an RNA intermediate. *Cell*, 40: 491-500.

BURATOWSKI, S., S. HAHN, L. GUARENTE, ve P.A. SHARP. 1989. Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell*, 56: 549-561.

CAMERON, J.R, E.Y. LOH, ve R.W. DAVIS 1979. Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell*, 16:739-751.

CHI, Y, M.J. HUDDLESTON, X. ZHANG, R.A. YOUNG, R.S. ANNAN, S.A. CARR, ve R.J. DESHAIES. 2001. Negative regulation of Gcn4 and Msn2 transcription factors by Srb10-cyclin-dependent kinase. *Genes. Dev.*, 15: 1078-1092

CIRIACY, M. 1995. Yeast Retrotransposons. "Kück, U., Editor". *The Mycota II, Genetics and Biotechnology*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. p. 227-245.

CLARK, D.J., V.W. BILANCHONE, L.J. HAYWOOD, SL. DILDINE, ve S.B. SANDMEYER. 1988. A yeast sigma composite element, Ty3, has properties of a retrotransposon. *J. Biol. Chem.*, 263: 1413-1423.

CORONA, D.F.V ve J.W. TAMKUN. 2004. Multiple roles for ISWI in transcription, chromosome organization and DNA replication. *Biochim. Biophys. Acta. Gene Struct. Exp.*, 1677: 113-119.

DAVIE, J.K., D.G. EDMONDSON, C.B. COCO, ve S.Y.R. DENT. 2003. Tup1-Ssn6 interacts with multiple class I histone deacetylases in vivo. *J. Biol. Chem.*, 278: 50158-50162.

DUDLEY, A. M., C. ROUGEULLE, ve F. WINSTON. 1999a. The Spt components of SAGA facilitate TBP binding to a promoter at a post-activator binding step in vivo. *Genes Dev.*, 13: 2940-2945.

DUDLEY, A.M., L.J. GANSHEROFF, ve F. WINSTON. 1999b. Specific components of the SAGA complex are required for Gcn4 and Gcr1 mediated activation of the his4-912 delta promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 151: 1365-1378.

EISENMANN, D.M., K.M. ARNDT, S.L. RICUPERO, J.W. ROONEY, ve F. WINSTON. 1992. SPT3 interacts with TFIID to allow normal transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, 6: 1319-1331.

ELGIN, S.C.R. 1988. The formation and function of DnaseI hypersensitive sites in the process of gene activation. *J. Biol. Chem.*, 263: 19259-19262.

ERICKA, R.H., X. GAO ve D.F. VOYTAS. 2004. The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biol.*, 5, 225: 1-6.

FARABAUGH, P.J., ve G.R. FINK. 1980. Insertion of the eukaryotic transposable element Ty1 creates a 5-base pair duplication. *Nature*, 286: 352-356.

FARABAUGH P.J, X.B. LIAO, M. BELCOURT, H. ZHAO, J. KAPAKOS, ve J. CLARE. 1989. Enhancer and silencer like sites within the transcribed portion of a Ty2 transposable element of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 9: 4824-4834.

FARABAUGH P.J, A. VIMALADITHAN, S. TÜRKEL, R. JOHNSON, ve H. ZHAO 1993. Three downstream sites repress transcription of a Ty2 retrotransposon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 13: 2081-2090.

FARABAUGH, P.J. 1995. Post-transcriptional regulation of transposition by Ty retrotransposons of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 270: 10361-10364.

FARABAUGH, P.J. 1996. Programmed translational frameshifting. *Microbiol. Rev.*, 60: 103-134.

GARFINKEL, D.J., K. NYSWANER, J. WANG, ve Y.-J. CHO. 2003. Post-transcriptional co-suppression of Ty1 retrotranspositions. *Genetics*, 165: 83-99.

GROZINGER, C.M ve S.L. SCHREIBER. 2002. Deacetylase enzymes: Biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem. Biol.*, 9: 3-16.

GUARENTE, L., ve M. PTASHNE. 1981. Fusion of *Escherichia coli* lacZ to the cytochrome c gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 2199-2203.

GUARENTE, L. 1983. Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol.*, 101: 181-191.

GUGLIELMI, B., N.L. van BERKUM, B. KLAPHOLZ, T. BIJMA, M. BOUBE, C. BOSCHIERO, H.-M. BOURBON, F.C.P. HOLSTEGE., ve M. WERNER. 2004. A high resolution protein interaction map of the yeast Mediator complex. *Nucleic Acids Res.*, 32: 5379-5391.

HAHN, S., S. BURATOWSKI, P.A. SHARP, ve L. GUARANTEE. 1989. Isolation of the gene encoding the yeast TATA binding protein TFIID: A gene identical to the SPT15 supressor of Ty element insertions. *Cell*, 58: 1173-1181.

HORN, P.J. ve C.L. PETERSON. 2002. Chromatin higher order folding: Wrapping up transcription. *Science*, 297: 1824-1827.

HUNTER, T., ve M. KARIN. 1992. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell*, 70: 375-387.

ITO, H., Y. FUKUDA, K. MURATA, ve A. KIMURA. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, 153: 163-168.

- KARIN, M., 1990. Too many transcription factors: Positive and negative interactions. *The New Biologist*, 2: 126-131.
- KIM, J.M., S. VANGURI, J.D. BOEKE, A. GABRIEL, ve D.F. VOYTAS. 1998. Transposable elements and genome organization: A comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *Genome Res.*, 8: 464-478.
- KORNBERG, R.D. ve Y. LORCH. 1992. Chromatin structure and transcription. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 8: 563-587.
- LEWIN, B. 2004a. *Genes VIII*. Pearson Prentice Hall, New Jersey, USA, p: 571-596.
- LEWIN, B. 2004b. *Genes VIII*. Pearson Prentice Hall, New Jersey, USA, p: 493-509.
- LIAO, X.-B., J.J. CLARE, ve P.J. FARABAUGH. 1987. The upstream activation site of a Ty2 element of yeast is necessary but not sufficient to promote maximal transcription of the element. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, 84: 8520-8524.
- LU, J., R. KOBAYASHI ve S.J. BRILL. 1996. Characterization of a high mobility group 1/2 homolog in yeast. *J. Biol. Chem.*, 271: 33678-33685.
- MALIK, S. ve R.G. ROEDER 2000. Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends Biochem. Sci.*, 25: 277-283.
- MOREIRA, J.M.A. ve S. HOLMBERG. 2000. Chromatin- mediated transcriptional regulation by the yeast architectural factors NHP6A and NHP6B. *EMBO J.*, 19: 6804-6813.
- MORILLON, A., L. BENARD, M. SPRINGER ve P. LASAGE. 2002. Differential effects of chromatin and Gcn4 on the 50-fold range of expression among individual yeast Ty1 retrotransposons. *Mol. Cell. Biol.*, 22: 2078-2088.
- PALANCADE, B. ve B. BENSAUDE. 2003. Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *Eur. J. Biochem.*, 270: 3859-3870.
- PARK, H. O. ve E. A. CRAIG. 1991. Transcriptional regulation of a yeast HSP70 gene by heat shock factor and an upstream repression site-binding factor. *Genes. Dev.*, 5: 1299-1308.
- PAULL, T.T. ve R.C. JOHNSON. 1995. DNA looping by *Saccharomyces cerevisiae* high mobility group proteins NHP6A/B. *J. Biol. Chem.*, 270: 8744-8754.

ROSE, M.D., F. WINSTON ve P. HIETER. 1990. Methods in Yeast Genetics. A laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Lab. Press. New York. USA. p. 119-195.

ROTH, J. F. 2000. The yeast Ty virus-like particles. *Yeast*, 16: 785-795.

SAROKIN, L. ve M. CARLSON. 1985. Upstream region of SUC2 gene confers regulated expression to a heterologous gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 5: 2521-2526.

SAWADOGO, M. ve A. SENTENAC. 1990. RNA polymerase B (II) and general transcription factors. *Annu. Rev. Biochem.*, 59: 711-754.

SHERWOOD, P.W. ve M.A. OSLEY. 1991. Histone regulatory (hir) mutations suppress delta insertion alleles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 128: 729-738.

SHIDLOVSKII, Y.V. ve E.N. NABIROCHKINA. 2005. The effect of chromatin remodeling and modification on RNA-polymerase-mediated transcription initiation. *Russ. J. Genet.*, 41: 720-727.

STERNER, D.E. ve S.L. BERGER. 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64:435-459.

STRUHL, K. 1987. Promoters, ActivatorProteins, and the Mechanism of Transcriptional Initiation in Yeast. *Cell*, 49: 295-297

SUDARSANAM, P. ve F. WINSTON. 2000. The SWI/SNF family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet.*, 26: 345-351.

SWANSON, M. S. ve F. WINSTON. 1992. *SPT4*, *SPT5* and *SPT6* interactions: Effects on transcription and viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 132: 325-336.

TÜRKEK, S. ve P.J. FARABAUGH. 1993. Interspersion of an unusual GCN4 activation site with a complex transcriptional repression site in Ty2 elements of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 13: 2091-2103.

TÜRKEK, S., X.B. LIAO ve P.J. FARABAUGH. 1997. GCR1-dependent transcriptional activation of yeast retrotransposon Ty2-917. *Yeast*, 13: 917-930.

TÜRKEK, S. 2002. The GCR2 gene is required for the transcriptional activation of retrotransposon Ty2-917 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Pharm. Bull.*, 25: 1212-1213.

VERDIN, E., F. DEQUIET ve H. G. KASLER. 2003. Class-II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet.*, 19: 286-293.

VIGNALI, M., A.H. HASSAN, K.E. NEELY ve J.L. WORKMAN. 2000. ATP-Dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol. Cell. Biol.*, 20:1899-1910.

VOYTAS, D.F. ve J. D. BOEKE. 1993. Yeast retrotransposons and tRNA. *Trends Genet.*, 9: 421-427.

WICKNER, R.B. 1989. Yeast virology. *FASEB J.*, 3: 2257-2265.

WOYCHIK, N. A. ve R. A. YOUNG 1990. RNA polymerase II: subunit structure and function. *Trends Biochem Sci.* 15: 347-351

WU, L. ve F. WINSTON 1997: Evidence that Snf-Swi controls chromatin structure over both the TATA and UAS regions of the *SUC2* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 25, 4230-4234

WU, J. ve M. GRUNSTEIN. 2000. 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem Sci.* 25, 619-623

YAMAGUCHI, Y., T. NARITA., N. INUKAI, T. WADA. ve H. HANDA. 2001. Spt genes: Key players in the regulation of transcription, chromatin structure and other cellular processes. *J. Biochem.* 129: 185-191.

YOUNG, R.A. 1991. RNA polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 689-715.

YU, Y., P. ERIKSSON, ve D. STILLMAN. 2000. Architectural transcription factors and the SAGA complex function in parallel pathways to activate transcription. *Mol. Cell. Biol.* 20: 2350-2357.

EKLER

Ek 1: Araştırmada Kullanılan Besi Yerleri ve Çözeltilerin Hazırlanması

1: LB (Luria-Bertani Broth)

10 gram bacto tripton, 5 gram yeast extract, 10 gram NaCl toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü. 121 C’de 25 dakika otoklavda steril edildi.

LB-Ampisilin üreme ortamı için filtrede sterilize edilmiş ampisilin 100 mg/litre olacak şekilde bakteri transformantlarını ekim yapmadan önce taze olarak üreme ortamına eklendi.

LB petripleri hazırlamak için LB sıvı besiyerine sterilizasyondan önce 15 gram/litre agar agar eklendi ve daha sonra 121 C’de 25 dakika otoklavda steril edildi. LB-Ampisilin petripleri için de sterilizasyondan sonra besiyeri sıcaklığı 45-50 C’ye düştükten sonra filtrede sterilize edilmiş Ampisilin 100 mg/litre olacak şekilde üreme ortamına eklendi.

2: YP (Yeast Extract, Peptone)

10 gram yeast ekstrakt, 20 gram bacto pepton toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü. 121 C’de 25 dakika otoklavda steril edildi.

YP petripleri için YP sıvı besiyerine 20 gram/litre olacak şekilde agar agar eklendi ve 121 C’de 25 dakika otoklavda steril edildi.

Üreme ortamına karbon kaynağı olarak ilave edilen glukoz, %20’lik stok çözelti olarak hazırlanıp 121 C’de 25 dakika otoklavda steril edildi. Kullanımdan hemen önce üreme ortamına son konsantrasyonları %2 olacak şekilde ilave edildi.

3: Sentetik tam –Ura üreme ortamı (-Ura, SC)

6.7 gram YNB toplam 1 litre distile suda çözüldü, 121 C’de 25 dakika otoklavda steril edildi. YNB katı besiyerini hazırlamak için 20 gram/litre olacak şekilde ve sterilizasyondan önce agar agar ilave edildi. Amino asit kaynağı olarak urasil içermeyen amino asit karışımı (Sigma Y-1501) 1.92 gram litre olacak şekilde hazırlanıp filtre ile steril edilip YNB ortamına eklendi.

Karbon kaynağı olarak steril glukoz, üreme ortamına son konsantrasyonu %2 olacak şekilde ilave edildi.

4- β -galaktozidaz ölçüm tamponu (Z-Buffer)

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

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

10 mM KCl

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

50 mM β -Merkepto etanol.

Z- buffer yukarıda verilen iyon konsantrasyonlarını sağlayacak şekilde stok ilgili kimyasallar kullanılarak 1 litre olarak hazırlandı. Deneyle süresince +4 C de saklandı.

5- ONPG (O-Nitro phenyl β -D- Galactoside)

Toplam konsantrasyonu 4 mg/ml olacak şekilde taze olarak Z-buffer içinde hazırlandı.

6- β -Galaktozidaz breaking buffer (Hücre Süspansiyon Çözeltisi)

100 mM Tris. HCl, pH: 8

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

%20 Gliserol

4 mM PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride)

Hücre Süspansiyon Çözeltisi yukarıda verilen kimyasalların stok çözeltileri kullanılarak verilen konsantrasyonları oluşturacak şekilde hazırlandı. Deneyle süresince +4 C de saklandı.

7- 1M Sodyum karbonat

106 gram Na_2CO_3 toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü. Deneyle süresince oda sıcaklığında saklandı.

8- 0.1 M Lityum asetat

Lityum asetat 0.2 M stok olarak hazırlandı. 121 C'de 25 dakika otoklavda steril edildi. Kullanımdan önce 1xTE ile son konsantrasyon 0.1 M olacak şekilde seyreltildi.

9- %50 Polietilen Glikol (PEG-4000).

50 gram Polietilen glikol (4000) toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile suda eritildi. 121 C'de 25 dakika otoklavda steril edildi.

10- 1x TE, pH:7.4

10 mM Tris.HCl, pH: 7.6

1 mM EDTA, pH: 8.0.

Tris.HCl ve EDTA stok çözeltilerden seyreltilip otoklavda steril edildi.

EK 2: β -Galaktozidaz Aktivitesinin Hesaplanması

S. cerevisiae transformantlarındaki lacZ gen füzyonlarından yapılan β -galaktozidaz enzim aktiviteleri aşağıdaki eşitliğe göre hesap edildi.

Aktivite: $(OD_{420} \times 1000) / (t \times V \times OD_{600})$

Bu eşitlikte;

Aktivite: Miller Ünitesi, MÜ.

OD_{420} : β -galaktozidaz reaksiyonunda oluşan sarı rengin 420 nm'deki absorbansı

t: β -galaktozidaz reaksiyon süresi (Dakika cinsinden verilmelidir)

V: $v_h \times$ Konsantrasyon faktörü

v_h : β -galaktozidaz reaksiyonunda kullanılan hücre süspansiyonu hacmi (genellikle 0.02 ml)

Konsantrasyon faktörü: 5 ml hücre çöktürülüp 0.2 ml break bufferda çözüldüğünden konsantrasyon faktörü 25 olacaktır. Deneylerde kullanılan hücre hacmine göre değişebilir.

OD_{600} : β -galaktozidaz ölçümünde kullanılan 1 ml *S. cerevisiae* hücrelerinin 600 nm'deki ölçüm değeri.

TEŞEKKÜR

Öncelikle çalıőmalarım boyunca ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, her konuda gösterdiği anlayıő ile tezimin hazırlanmasını sağlayan değerli danıőmanım Prof. Dr. Sezai TÜRKELE'e, maddi ve manevi desteklerinden dolayı sevgili aileme çok teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

01.09.1980'de Bursa ilinde doğdu. İlkokulu Emek İlköğretim okulunda, orta okulu Akıncıtürk İhsan Dikmen İlköğretim okulunda ve liseyi de Çelebi Mehmet Lisesinde Bursa'da tamamladı. 1998 yılında Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazanarak lisans eğitimine başladı. 2002 yılında U. Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2002 güz yarısında Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.