

Bor toksisitesinin moleküler mekanizmalarının araştırılması

Program Kodu: 1001

Proje No: 110T917

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Ahmet KOÇ

Araştırmacı(lar):Doç. Dr. Çağlar Karakaya

Danışman(lar):

Bursiyer(ler):İrem Uluişik, Ayşe Banu Demir

MAYIS 2014
İZMİR

ÖNSÖZ

Bor toksisitesinin moleküler mekanizmalarının araştırılması projesi İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü tarafından yürütülen bir 1001 projesidir. Proje, TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubu tarafından desteklenmiş ve Prof. Dr. Ahmet Koç yürütücülüğünde tamamlanmıştır.

Proje kapsamında; bor fazlalığında ortaya çıkan toksisitenin sebepleri, hücrelerin bu toksisiteye verdikleri cevaplar ve eksikliğinde bor dirençliliği sağlayan ya da bor duyarlılığına neden olan genlerin etki mekanizmaları araştırılmıştır. *Saccharomyces cerevisiae* model organizması kullanılarak klonlama, beta-galaktozidaz denemeleri, real time PCR, western ve northern blot, kütle spektrometresi analizleri sonucu bor toksisitesinde aktive olarak yol oynayabilecek yollara işaret edilmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	2
ÖZET	7
ABSTRACT	8
1.GİRİŞ	9
2.LİTERATÜR ÖZETİ	9
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1. Kullanılan maya suşları ve besiyerleri	13
3.2. Genlerin klonlanması	13
3.3. Li-Ac metoduyla maya transformasyonu	15
3.4. Maya hücrelerinin bor toleranslarının belirlenmesi	15
3.5. Hücre içi bor konsantrasyonlarının belirlenmesi	15
3.6. RNA izolasyonu ve Real-Time PCR analizleri	15
3.7. RNA izolasyonu ve Northern Blot analizleri	16
3.8. Western blot analizleri.....	17
3.9. β -galaktozidaz aktivite denemeleri	17
3.10. Kütle spektrometresi analizleri	18
3.11. Konfokal mikroskop görüntülemesi.....	19
3.12. Hayat süresi analizleri	19
4. BULGULAR.....	21
4.1. Bor dirençli mutantlarda Gcn4-LacZ aktivitesinin tespiti	21
4.3. Yokluğunda bor duyarlılığına sebep olan genlerin klonlanması, komplementasyonu ve yabani tip hücrelerde ifadenmeleri.....	24
4.4. Borik asite karşı duyarlılık gösteren mutantlarda hücre içi bor miktarlarının belirlenmesi	27
4.5. Gcn4 transkripsiyon faktörünün regülasyonundan sorumlu transkripsiyon faktörlerinin bor dirençliliklerinin belirlenmesi	30
4.6. Gcn4'ün regülasyonundan sorumlu transkripsiyon faktör mutantlarında Gcn4-lacZ ifadenmesi	31
4.7. Gcn4'ün regülasyonundan sorumlu transkripsiyon faktör mutantlarında ATR1 mRNA ifadenmesi	32
4.8. TOR kinaz yolağının bor stresi ile ilişkisinin araştırılması	33
4.9. SNF1 yolağının bor stresi ile ilişkisinin araştırılması	37
4.10. PKA yolağının bor stresi ile ilişkisinin araştırılması	41
4.11. Borun hücrelerde yüksüz (amino asitsiz) tRNA sinyali oluşturma mekanizmasının kütle spektrometresi ile araştırılması	43
4.12. Borun hücrelerde yüksüz (amino asitsiz) tRNA sinyali oluşturma mekanizmasının northern blot yöntemi ile araştırılması	51
4.13. Gcn1/Gcn20 kompleksinin bor stresindeki rolünün araştırılması	52
4.14. Bor stresi ve otofaji arasındaki ilişkiler.....	53
4.15. Borun etki mekanizmasının maya hücrelerine özel olup olmadığının araştırılması ...	57
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	59
6. REFERANSLAR	62
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU	69

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Klonlama denemelerinde kullanılan Gateway sistemine ait vektörler. A) pDONR221 donör vektör haritası B) pAG426GPD hedef vektör haritası.....	14
Şekil 2. GCN4-lacZ plazmidi.....	18
Şekil 3. Yabani tip ve bor dirençliliği gösteren mutant maya hücrelerindeki Gcn4-lacZ aktivitesi.	22
Şekil 4. Yabani tip ve bor dirençliliği gösteren maya mutantlarında <i>ATR1</i> mRNA ifadenme seviyeleri. <i>ACT1</i> ve <i>ATR1</i> mRNA'larına ait Ct değerleri esas alınarak normalizasyon yapılmıştır.....	24
Şekil 5. Yokluğunda bor duyarlılığına sebep olan genlerin yabani tip hücrelerde aşırı ifadenmesinin bor toleransına etkisi.....	26
Şekil 6. Yokluğunda maya hücrelerinin bora karşı aşırı duyarlı olmasına neden olan genlerin ilgili maya mutantlarında komplementasyonunun bor toleransına etkisi.....	27
Şekil 7. Borik asit ile muamele edilen yabani tip ve bor-duyarlı mutantlardaki hücre-içi bor miktarları	28
Şekil 8. Yokluğunda bor duyarlılığına sebep olan genlerin yabani tip hücrelerde aşırı ifadenmesinin hücre-içi bor miktarına etkisi	29
Şekil 9. <i>GCN4</i> 'ün promotoruna bağlanan transkripsiyon faktör mutantlarının bor toleransları	31
Şekil 10. <i>GCN4</i> 'ün promotoruna bağlanan transkripsiyon faktör mutantlarında Gcn4-lacZ ifadenmeleri.....	32
Şekil 11. Yabani tip, <i>GCN4</i> -transkripsiyon faktör mutantlarında <i>ATR1</i> mRNA ifadenme seviyeleri. <i>ACT1</i> ve <i>ATR1</i> mRNA'larına ait Ct değerleri esas alınarak normalizasyon yapılmıştır.....	33
Şekil 12. p180 plazmiti taşıyan ve farklı konsantrasyonlarda borik asit ile muamele edilmiş yabani tip, <i>gln3Δ</i> ve <i>tor1Δ</i> mutantlarındaki Gcn4-lacZ değişimleri. Deneme en az üç kez tekrarlanmış ve her bir denemede mutant ve yabani tip maya hücrelerinden en az üç replika kullanılmıştır. Normalizasyon, borik asit muamelesi görmemiş yabani tip maya hücrelerine göre yapılmıştır.....	35
Şekil 13. Borik asit ile muamele edilen ve edilmeyen yabani tip, <i>TOR1</i> ve <i>GLN3</i> mutantlarında <i>ATR1</i> mRNA ifadenme seviyeleri. <i>ACT1</i> ve <i>ATR1</i> mRNA'larına ait Ct değerleri esas alınarak normalizasyon yapılmıştır.	36
Şekil 14. <i>snf1Δ</i> mutantının borik asit toleransı	37
Şekil 15. <i>SNF1</i> geninin aşırı ifadenmesi ve komplementasyonunun borik asit toleransına etkisi.....	38
Şekil 16. p180 plazmiti taşıyan yabani tip ve <i>Δsnf1</i> mutantındaki Gcn4-lacZ değişimleri.....	39
Şekil 17. <i>SNF1</i> geninin aşırı ifadelendiği yabani tip ve <i>snf1Δ</i> mutant hücrelerindeki Gcn4-lacZ ifadenme seviyeleri. Kontrol grubu olarak boş plazmit taşıyan yabani tip ve <i>snf1Δ</i> mutantı kullanılmıştır.	39
Şekil 18. Yabani tip ve <i>snf1Δ</i> hücrelerinde <i>ATR1</i> mRNA'sının real time PCR analizleri. Hücreler 50mM borik asit ile bir saat muamele edilmiştir, kontrol grubu hücrelerine borik asit uygulanmamıştır. Maya aktin geni deneysel kontrol olarak kullanılmıştır. <i>ACT1</i> ve <i>ATR1</i> mRNA'larına ait Ct değerleri esas alınarak normalizasyon yapılmıştır.	40
Şekil 19. <i>SNF1</i> geninin aşırı ifadelendiği yabani tip ve <i>snf1Δ</i> mutantındaki <i>ATR1</i> mRNA'sının real time PCR analizleri. Maya aktin geni deneysel kontrol olarak kullanılmıştır. <i>ACT1</i> ve <i>ATR1</i> mRNA'larına ait Ct değerleri esas alınarak normalizasyon yapılmıştır.	41
Şekil 20. p180 plazmiti taşıyan ve farklı konsantrasyonlarda borik asit ile muamele edilmiş yabani tip, <i>Δpka1</i> ve <i>Δpka2</i> mutantlarındaki Gcn4-lacZ değişimleri.....	42
Şekil 21. Yabani tip, <i>pka1Δ</i> , <i>pka2Δ</i> mutantlarında <i>ATR1</i> mRNA ifadenme seviyeleri. <i>ACT1</i> ve <i>ATR1</i> mRNA'larına ait Ct değerleri esas alınarak normalizasyon yapılmıştır.	43
Şekil 22. A) NADH'in negatif iyon ESI kütle spektrumu. B) NADH+Borik asit karışımının negatif iyon ESI kütle spektrumu.	45
Şekil 23. A) ATP'nin negatif iyon ESI kütle spektrumu. B) ATP+Borik asit karışımının negatif iyon ESI kütle spektrumu.....	46

Şekil 24. A) Solvente ait elektrosprey kütle spektrumu. B) tRNA karışımına ait elektrosprey kütle spektrumu.....	47
Şekil 25. Üçüncü amonyum asetat çöktürmesi sonucu elde edilen tRNA karışımı ve borik asit kompleksinin ESI kütle spektrumu.....	48
Şekil 26. Oligomere ait HPLC kromatogramı.....	49
Şekil 27. RNA primerine ait saflaştırılan fraksiyonun ion-trap kütle spektrometrisinde analizi. A) HPLC ile toplanan 13 numaralı fraksiyona ait kütle spektrumu. B) Aynı fraksiyon, toplandıktan sonra borik asit ile muamele edilmiş daha sonra kütle spektrumu elde edilmiştir.	50
Şekil 28. Yabani tip ve rny1Δ mutant hücreleri 1 saat 50mM borik asit ile muamele edilmiş ya da borik asit muamelesi görmeden total RNA izole edilmiştir. Elde edilen RNA'lar northern blot denemelerinde kullanılmıştır. A) tRNA-Metiyonin (CAT) probu B) tRNA-Histidin (GTC) probu.....	52
Şekil 29. Yabani tip, <i>gcn1Δ</i> ve <i>gcn20Δ</i> hücreleri büyütülüp, üçe ayrılmıştır. Bir gruba borik asit muamelesi yapılmazken, bir grup 25mM, diğer bir grup da 50mM borik asit ile muamele edilmiştir. eIF2α fosfatlanması, eIF2α üzerindeki fosfo-Ser51'e karşı bir antikor kullanılarak western blot analizleriyle belirlenmiştir. Membran daha sonra üzerindeki antikorlardan arındırılarak deneysel kontrol olarak yeniden maya Pgc1 antikoruna muamele edilmiştir. ...	53
Şekil 30. GFP-Atg8 proteinin bor muamelesinden otofagozomlarda (oklar ile belirtilmiştir) birikmesinin konfokal flöresan mikroskop ile görüntülenmesi.....	54
Şekil 31. Borun replikatif yaşlanmaya olan etkisi.....	55
Şekil 32. Bor muamelesinin kronolojik yaşlanmaya olan etkisi	56
Şekil 33. Düşük konsantrasyonlardaki borun replikatif yaşlanmaya olan etkisi.....	56
Şekil 34. HeLa hücreleri belirtilen konsantrasyonlardaki borik asite 5 gün boyunca maruz bırakılmışlardır. Daha sonra protein izolasyonu yapılan hücrelerdeki protein miktarları Bradford analizi ile normalize edilip eşitlenmiş ve western blotlama deneylerinde kullanılmıştır. eIF2α fosfatlanması, eIF2α üzerindeki fosfo-Ser51'e karşı antikor kullanılarak belirlenmiştir. Membran daha sonra üzerindeki antikorlardan arındırılarak deneysel kontrol olarak yeniden γ-tubulin antikoruna muamele edilmiştir. Şekil 35'deki western blot denemesi sonucundaki bant yoğunluklarından elde edilen sütun grafikte görüldüğü gibi 1000µM borik asit muamelesiyle eIF2α'daki fosfatlama oldukça artmıştır.	58
Şekil 35. HeLa hücreleri kullanılarak eIF2α-P ve insan γ-tubulin'e karşı kullanılan antikorlar ile elde edilen protein ekspresyonunu ifade eden bant yoğunluklarının kendi içerisinde normalizasyonu.	58

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Klonlama denemelerinde kullanılan pirimerlerin listesi.	13
Tablo 2. Bor dirençliliği gösteren mutantlar (Kaynak: Maya Genom Veritabanı- Yeast Genome Database).	21
Tablo 3. Yokluğunda aşırı bor hassasiyetine sebep olan genlerin listesi (Kaynak: Maya Genom Veritabanı- SGD ve Uluişik vd., 2011a' dan uyarlanmıştır).	24
Tablo 4. Borun replikatif yaşlanmaya olan etkisi.....	55
Tablo 5. Bor muamelesinin kronolojik yaşlanmaya olan etkisi	56
Tablo 6. Düşük konsantrasyonlardaki borun replikatif yaşlanmaya olan etkisi.....	56

ÖZET

Bor doğada çoğunlukla borik asit formunda bulunmakta olup esansiyel bir bitki besinidir. Sadece bitkiler değil pek çok organizma metabolik faaliyetleri için bora ihtiyaç duymaktadır. Bor, az miktarlarda gerekli iken fazlalığı toksisite oluşturmaktadır ve bu toksisitenin mekanizması bilinmemektedir. Bor toksisitesinin moleküler mekanizmalarının araştırılması kapsamında kullanılan model sistem, bir maya olan *Saccharomyces cerevisiae*'dir. Maya tek hücreli ökaryotik bir canlıdır. Aynı zamanda pek çok hücreli sistem, maya ve diğer ökaryotlar arasında evlasyonel olarak belirgin bir şekilde korunmuştur. Dolayısıyla toksisite ve tolerans mekanizmalarının maya model organizması kullanılarak açığa çıkartılması, benzer mekanizmaların insanlarda ve bitkilerde tanımlanmasına da yol gösterici olması bakımından öneme sahiptir. Bor dirençliliği ve bor duyarlılığı sağladığı tespit edilen genlerle yapılan çalışmalar ile dirençlilik ve duyarlılık mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmıştır. Borun Gcn4 transkripsiyon faktörünü nasıl aktif hale getirdiğini anlamak için *GCN4* promotor bölgesine bağlanabilen transkripsiyon faktör mutantları Gcn4 ve *ATR1* ifadelenmeleri yönünden incelenmiştir ve sonuçlar hücre içi birtakım yollara işaret etmektedir. Hücre içi sinyal yollarından incelenen TOR, PKA ve SNF1 yollarının bor stresine yanıt mekanizmasında rol oynamaları muhtemeldir. Mevcut veriler ile borun yüksüz tRNA sinyali oluşturma mekanizması henüz anlaşılammıştır. Ancak yüksüz tRNA'ların taşınımında rol oynayan *GCN1* geninin, Gcn2 kinaz aktivitesi için gerekli olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda bor toksisitesinin memeli hücrelerinde de maya hücrelerindeki benzer bir tepki yarattığı eIF2 α fosfatlanması ile gösterilmiştir. Replikatif ve kronolojik yaşlanma deneylerine göre bor 1mM dan yüksek konsantrasyonlarda yaşam süresini kısaltmakla birlikte mikromolar seviyede yaşam süresini uzatma yönünde etkileri bulunmuştur. Bor stresinde hücrede otofajinin indüklendiği de Atg8-GFP füzyon proteininin konfokal mikroskopta takip edilmesiyle ortaya çıkarılmıştır.

Anahtar Kelimeler

Borik asit, bor toksisitesi, *ATR1*, *Saccharomyces cerevisiae*, *GCN4*, translasyonel regülasyon, transkripsiyonel regülasyon

ABSTRACT

Boron is found mostly as boric acid in nature. It is an essential micronutrient for plants. Not only plants but also many organisms need boron for their metabolism. The excess boron causes toxicity to these organisms, however the mechanisms of this toxicity is not known. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been used as a model system in investigating the molecular mechanisms of boron toxicity. Yeast is a single-celled eukaryotic organism. Many cellular systems are evolutionary conserved between yeast and other eukaryotes. Thus unveiling toxicity and tolerance mechanisms by using yeast as a model is important, since these mechanisms might lead to identify similar mechanisms in humans and plants. It has been aimed to understand the mechanisms of resistance and sensitivity provided by the genes. To reveal how boron activates Gcn4 transcription factor, the mutants of transcription factors which can bind to the promoter region of *GCN4* were investigated in terms of Gcn4 and *ATR1* expressions. The results indicated certain intracellular pathways. TOR, PKA, and SNF1 pathways were found to be likely to play roles in boron stress response mechanism. With the available data the induction of uncharged tRNA signalling by boron has not been understood yet. However it was revealed that *GCN1* which play a role in transferring uncharged tRNAs is necessary for the kinase activity of Gcn2. Additionally, boron toxicity creates a response which was shown by the phosphorylation of eIF2 α in mammalian cells similar to that of yeast cells. According to the replicative and chronological lifespan analyses, boron decreased the lifespan in cells treated with 1 mM boric acid or above concentrations, but it increased the life span in very low concentrations . By following Atg8-GFP fusion protein under the confocal microscope, it is also revealed that boron induces autophagy in cells.

Key Words

Boric acid, boron toxicity, *ATR1*, *Saccharomyces cerevisiae*, *GCN4*, translational regulation, transcriptional regulation

1. GİRİŞ

Bor metalloid grubu bir elementtir. Doğada tek başına elementel formda bulunmamaktadır, bunun yerine sodyum ve oksijen ile kompleksler oluşturarak organobor bileşiklerini ortaya çıkarmaktadır. Borik asit ve borun sodyum tuzları (boraks, disodyum tetraborat) birçok endüstriyel amaçla kullanım alanı bulmuştur. Bunlar; cam imali, fiberglas izolasyonu, porselen emaylanması, seramik sırlama, metal alaşımları, gübreleme, çamaşır, ilaç ve kozmetik endüstrilerini içermektedir (Environmental Protection Agency, 2004). Bu bileşikler aynı zamanda geç alev alıcı malzeme olarak, herbisit, insektisit, katalist olarak kullanılmaktadır (Woods, 1994).

Bor canlı sistemlerde ise borik asit olarak bulunmaktadır ve bu sistemlerde pek çok olayda rol oynayabileceği hatta bitkiler için esansiyel olduğu bilinmektedir (Tanaka ve Fujiwara, 2008). Aynı zamanda günlük yaşamda insanların tükettiği bir mikromineral olarak dikkat çekmektedir.

Metalloidlerin hücre içerisinde farklı mekanizmaları etkileyerek toksisiteye sebep oldukları bilinmektedir. Bu toksisite; oksidatif stresin artması, DNA hasarlarının ortaya çıkması, DNA hasar tamir mekanizmalarının ve membran fonksiyonlarının bozulması, protein katlanması, protein fonksiyon ve aktivitelerinin engellenmesi sonucu ortaya çıkabilmektedir. Metalloidlerin yarattığı bu toksisiteden kurtulmak için hücreler bir takım mekanizmalar oluşturmuşlardır. Bunların arasında ilgili metalloidin hücre dışına atılması, hücre içi organellerde depo edilmesi, metalloid bağlayan proteinler ve peptidler tarafından şelatlama ve metalloidin hücre içine alınımının azaltılması yer almaktadır (Verbruggen vd., 2009; Lemire vd., 2013; Tamas vd., 2014).

Projenin ana konusu bor toksisitesi ve tolerans mekanizmalarının anlaşılması üzerine çalışmalar yapmaktır. Bu çalışmalardan elde edilecek verilerle bu konuda sahip olunan bilgilerin üstüne yenilerinin eklenerek geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Bor, periyodik tabloda B sembolü ile gösterilen ve metal ile ametal arası özelliklere sahip olan bir elementtir. Bor doğal olarak oluşmakta ve çevrede pek çok ortamda bulunmaktadır. Hayvanlarda, bitkilerde ve insanlarda en yaygın olarak bulunan formu borik asittir (H_3BO_3), az bir miktarda ise borat anyonu ($B(OH)_4^-$) şeklinde bulunmaktadır (Devirian ve Volpe, 2003; Hunt, 2003).

In vivo ve in vitro sistemlerde, borik asit cis-hidroksil gruplarına karşı afinite göstermektedir. Cis-hidroksil grubu içeren biyomoleküllere örnek olarak riboflavin, adenzin-5-fosfat, piridoksin, pirimidin nukleotitleri ve riboz gibi şeker molekülleri verilebilir (Hunt, 2007). Borik asitin sahip olduğu böyle bir afinite, borik asit tarafından oluşturulan bazı biyolojik etkilerin mekanizmalarından sorumlu olabilir (Bolanos vd., 2004).

Bor içerdiği bulunan ilk doğal bileşik; gram pozitif bakterilere etki eden bir antibiyotik olan boromisindir (Hütter vd., 1967). Bunun yanı sıra tartrolon, borofisin, aplazmommisin gibi bakteriyel antibiyotiklerde (Rezanka ve Sigler, 2008); bakteriyel quorum sensing molekülü autoinducer AI-2'de (Chen, 2002); bir denizel bakteri tarafından üretilen ve bor içeren siderofor vibrioferrinde (Amin vd., 2007), Jurassic dönemi kırmızı alglerinden *Solenopora jurassica*'daki ayırt edici pembe renkten sorumlu olan borolitokromlarda (Wolkenstein vd., 2010) bulunmaktadır.

Bu doğal bileşiklerin dışında, borun hayvanlarda ve mikrobiyal sistemlerde birçok fizyolojik ve metabolik işlemlerde yer aldığı gösterilmiştir (Tanaka ve Fujiwara, 2008). Örneğin *Azotobacter*'de bakteriyel azot fiksasyonu için gereklidir (Anderson ve Jordan, 1961). *Bacillus boroniphilus* olarak bilinen bir başka bakteri türünün büyümesi için ise yüksek miktarda bora ihtiyacı vardır (Ahmed vd., 2007). Heterosistöz cyanobakteriler ve aktinomisetlerden *Frankia* cinsi, büyümeleri ve azot fiksasyonu için bora ihtiyaç duymaktadır. Cyanobakteriler ilkel çağlardaki baskın organizmalardır. Dolayısıyla bu organizmalardaki bor gereksinimi, borun, evrimsel süreçte esansiyel bir element olması fikri açısından önem arz etmektedir (Bolanos vd., 2004).

Borun esansiyel bir bitki besini olduğu 1923 yılından beri bilinmektedir (Warington, 1923). Borun mikrobiyolojik sistemlerde, bitkilerde ve hayvanlarda pek çok fizyolojik ve metabolik olayda rol oynadığı düşünülmektedir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu, tüm bu organizmalara toksik etki göstermektedir (Nielsen, 1997).

Bitkilerdeki fonksiyonel rolleri ile ilgili yapılan çalışmalar, borun bitkilerde şeker transportuna, hücre duvarı sentezi ve yapısına, karbonhidrat, RNA, indol asetik asit ve fenol metabolizmalarına, membran transportuna katıldığını ortaya çıkarmıştır (Blevins ve Lukaszewski, 1994; Camacho-Cristobal vd. 2008). Ancak borun bu süreçlerdeki etki mekanizması hala bilinmemektedir. Borun fonksiyonlarından bugüne kadar açıkça tanımlanmış bir tanesi bitki çalışmalarından gelmiştir (Nielsen, 1996; O'Neill vd., 2004). Bitkilerde, hücre duvarının stabilitesi RG-II (ramnogalakturonan II) kompleksinin oluşumuna bağlıdır. RG-II ise apiyozil yapıların borat esterlerine cis-diol bağları ile kovalent olarak bağlı

bir pektik polisakarittir. Bu pektik sistemdeki borat çapraz bağlarının hücre duvarını fiziksel olarak güçlendirdiği ve hücre adezyonunda payı olduğu düşünülmektedir (York vd., 1985; Ishii ve Matsunaga, 1996; Scorei, 2012).

Bor insan ve hayvanların günlük beslenmesinde gerekli bir bileşendir. Sebze, meyve, kuru meyve gibi yiyeceklerde bolca bulunmaktadır ve günlük 3-7 mg bor günlük besin düzenimizde tüketilmektedir (Baker vd., 2011). İnsanlar yiyeceklerin yanı sıra, içme sularından ve tükettikleri bazı ürünlerden (kozmetik, deterjan, sabun vs) bora maruz kalmaktadırlar. Bor insanlarda hücre membranlarını etkilemekte, steroid hormon metabolizmasında rol oynamakta ve sağlıklı kemik gelişimi için gerekmektedir. Ayrıca yapılan klinik deneylerle, besinler ile bor alındığı zaman erkeklerde prostat kanserine yakalanma olasılığının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Cui vd., 2004). Ancak yapılan bu çalışmalarda borun sözü edilen fonksiyonlarının ayrıntıları bilinmemektedir. Bu anlamda ilgili moleküler mekanizmaların ortaya çıkarılması ve anlaşılması gerekmektedir. Hayvanlarda ise embriyolojik gelişme esnasında borun gerekli olduğu ilk olarak zebra balığı (*Danio rerio*) ve alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) embriyolarında gözlemlenmiştir (Rowe vd., 1998, Rowe, 1999). Aynı zamanda diatomlar cyanobakteriler, deniz algleri ve kurbağalar (*Xenopus laevis*) için de esansiyeldir. Bor hayvanlarda da çeşitli mekanizmaları etkilemektedir. Bunlar arasında; karbonhidrat metabolizması, mineral metabolizması, çeşitli enzimlerin aktivitelerinin düzenlenmesi, embriyonik gelişme sayılabilir. Ancak borun hayvanlardaki fonksiyonunun moleküler mekanizmaları henüz anlaşılammıştır (Tanaka ve Fujiwara, 2008). Bor bitkiler ve hayvanlar için önemli bir besindir. Bu canlıların büyümesi ve gelişmesi için gerekli olduğu halde, yüksek konsantrasyonlarda bulunması da toksik etki yaratmaktadır. Bor yetersizliği de fazlalığı da organizmalar için olumsuz sonuçlar doğurabilmektedir (Juan vd., 2008; Yazbeck vd., 2005). Dolayısıyla hücre içerisine alınan ve dışına atılan bor miktarının kontrol mekanizmaları tarafından düzenlenmesi gerekmektedir. Bu bağlamda borun taşınımını sağlayan transporter genlerin gerektiği zamanda ve yerde ifadelenmeleri önem kazanmaktadır.

Borun bitkiler için zorunlu bir besin olması, topraktan direkt olarak borik asite maruz kalmaları nedeniyle ve etkilerinin birincil derecede görüldüğü organizmalar olmaları sebebiyle bor ile ilgili çoğu çalışmada model organizma olarak bitkiler kullanılmıştır. Bor transportu ve toleransı ile alakalı pek çok bitki geni bulunmuştur. Yapılan çalışmalarla borun membran transportuyla ilgili üç mekanizma ortaya çıkarılmıştır. Bunlar; pasif difüzyon (Hu ve Brown, 1997), borik asit kanalı işlevi gören NIP proteinleri (nodulin-26-benzeri intrinsik proteinler) (Takano vd., 2006), *BOR1* geni tarafından kodlanan ve borun aktif taşınımıyla hücre dışına atılmasını sağlayan proteinlerdir (Takano, 2002). Yapılan daha ileri çalışmalarla *BOR1*

homolog ve paralogları pek çok organizmada karakterize edilmiştir (Miwa vd., 2007; Nagakawa vd., 2007; Takano, 2002; Park vd., 2004). Ancak bor transporterların nasıl çalıştığı, bor transport mekanizmaları ve bu mekanizmaların nasıl kontrol edildiği yeterince açık değildir.

Tek hücreli bir ökaryotik canlı olan mayanın (*Saccharomyces cerevisiae*) büyümesi için bora ihtiyaç duyduğu ancak çevredeki bor miktarı arttığında ise büyüyemedikleri daha önceden gösterilmiştir (Bennett vd., 1999). Daha sonra yapılan çalışmalarla mayanın bora toleranslı bir organizma olduğu ve 80 mM borik asit varlığında yaşabildiği gösterilmiştir (Kaya vd., 2009). Maya aynı zamanda bakır, demir, çinko gibi çeşitli metallerin taşınımı ve hücrelerin bu metal streslerine yanıtlarının araştırılması için kullanılmış bir organizmadır. Aynı zamanda bitki bor tolerans genlerinin karakterizasyonunda da yine maya model organizma olarak kullanılmıştır. Bunlara ek olarak genetik manipülasyonların kolaylıkla uygulanabilmesi, maya için uygun olabilecek genomik metotların bulunması, deneysel yaklaşımlar için önemli olabilecek hızlı jenerasyon süresine sahip olması bakımından avantajlı bir organizmadır. Aynı zamanda pek çok hücresel sistem, maya ve diğer ökaryotlar arasında evlusionel olarak belirgin bir şekilde korunmuştur.

Maya model organizması kullanılarak bor biyolojisi ile ilgili son yıllarda ortaya konmuş çalışmalar incelenecek olursa; maya genomik DNA kütüphanesi taramaları ile *ATR1* geni bir bor tolerans geni olarak bulunmuştur. *Atr1*, borun dışarı atılmasında ana rolü üstlenmekte ve bu şekilde hücrelerde, elemente karşı güçlü bir dirençlilik sağlamaktadır. Aynı zamanda *ATR1* ifadenmesinin de bor muamelesiyle kontrol edildiği ortaya çıkarılmıştır (Kaya vd., 2009). Yapılan biyoinformatik analizler ile *YMR279c* ve *YOR378w*, *ATR1* geninin iki paraloğu olarak bulunmuş ve içlerinden özellikle *YMR279c*'nin ifadenmesi hücre içi bor seviyelerini azaltarak dikkate değer bir bor dirençliliği sağlamıştır (Bozdağ vd., 2011). Bor metabolizmasında rol oynayabilecek diğer genleri bulmak için haploid maya delesyon setinin tüm mutantları bor dirençliliği sağlayan ve bor duyarlılığına sebep olan genler bakımından taranmıştır. Borun toksik seviyelerine direnç sağlayan 6 mutant, hassasiyet gösteren ise 21 mutant bulunmuştur. Aynı zamanda bor muamelesi ile önemli derecede artan başka proteinleri ortaya çıkarmak amacıyla proteomik yöntemlere başvurulmuştur. Bulunan genler ve proteinler bor stresine yanıtta yer alabilecek çeşitli yollara dikkat çekmektedir (Ulusik vd., 2011a). Yapılan daha ileri çalışmalarla, bor stresinde *ATR1* geninin ifadenmesinin aminoasit biyosentez genlerinin ifadenmeleriyle ilişkili olduğu ve bu mekanizmanın da *Gcn4* transkripsiyon faktörü tarafından sıkı bir şekilde kontrol edildiği gösterilmiştir. Borun aynı zamanda *Gcn2* protein kinazı bağımlı *eIF2 α* 'nın fosfatlanmasına sebep olarak protein sentezini baskıladığı da elde edilen veriler arasındadır (Ulusik vd., 2011b).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan maya suşları ve besiyerleri

Bu çalışmada haploid yabancı tip (wild type) *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (MATa *his3 leu2, met15 ura3*), homozigot diploid yabancı tip BY4743 (MATa/α *his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0 /leu2Δ0 lys2Δ0/LYS2 MET15/met15Δ0 ura3Δ0 /ura3Δ0*) ve maya delesyon setinden temin edilen izogenik delesyon mutantları kullanılmıştır (Invitrogen). Hücre büyümeleri için zengin bir besiyeri olan YPD (%2 glukoz, %2 pepton, %1 maya ekstraktı ve katı besiyeri için %2 agar) ve seçici bir besiyeri olan gerekli aminoasit ve bazların ilave edildiği YNB (yeast nitrogen base) medyaları kullanılmıştır.

3.2. Genlerin klonlanması

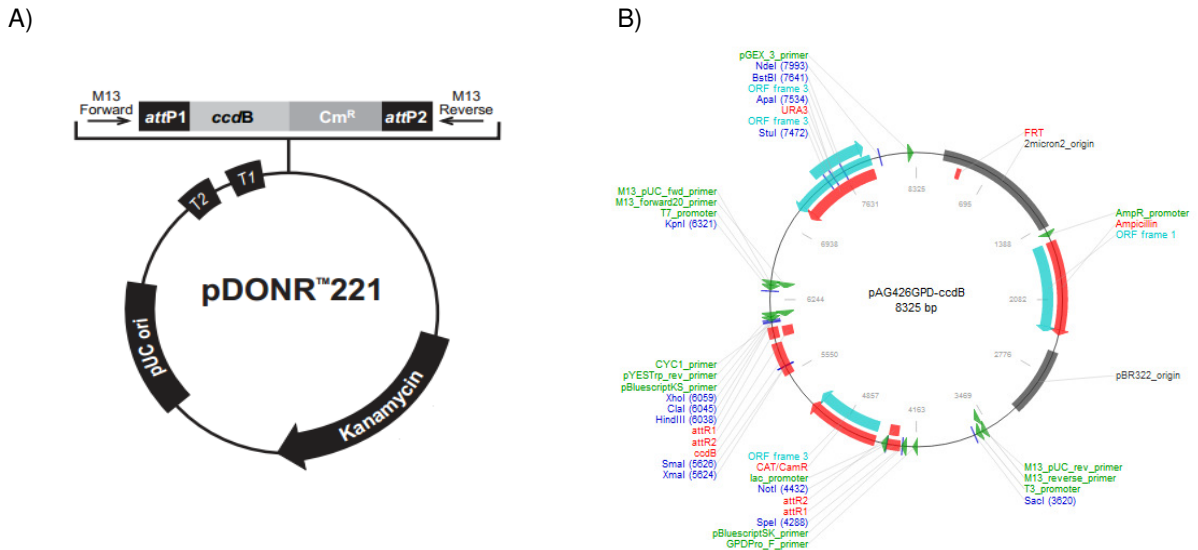
Klonlamalar için Gateway klonlama sistemi kullanılmıştır. Bu sistem, lambda bakteriyofajının bölge-spesifik rekombinasyon özelliğine dayanmaktadır ve diğer klonlama yöntemlerine göre ilgili DNA bölgelerinin daha kısa sürede ve daha etkin klonlanması sağlanmaktadır. Yabancı tip hücrelerin genomik DNA'ları kullanılarak ilgili genlere ait bölgeler High Fidelity enzim karışımı (Fermentas) ile çoğaltılmıştır. Bu işlem için kullanılan primerler Tablo 1'de görülmektedir.

Tablo 1. Klonlama denemelerinde kullanılan primerlerin listesi.

Gen Bölgeleri	Primer Sekansları	Çoğaltılan Bölgenin Uzunluğu (baz çifti-base pair)
HOM6	Forward: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCGTAGATAGTATCATCAATCGAAT-3' Reverse: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTCTGTTTACTGATCTA-3'	1071 bp
THR1	Forward: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTAGATATACGGACTACAGAAAATGG-3' Reverse: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATTTTCATTGCTGTTTCGACGCTAG-3'	1074 bp
ERG4	Forward: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCGTAGTGTACATAGATTAGCATCGC-3' Reverse: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACATAAGGAATAAAGACGTAAGGGC-3'	1422 bp
RPE1	Forward: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTAAGAGCGAGGTAACACACAAGAAA-3' Reverse: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCCGCATATGTACAACCTAATC-3'	717 bp
OCH1	Forward: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGAAAGCAAGTAAAAGAAAGAAGAG-3' Reverse: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGCCTCGTTATTTATGACCTGC-3'	1443 bp
UBP3	Forward: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTACCGCTTTCCTTCCATCATCA-3'	2739 bp

	Reverse: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCACCCCCCGTCTTAATTTCTCTT-3'	5'-	
SLA1	Forward: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTATGACTGTGTTTCTGGGCA-3' Reverse: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATCTAGAATCCAAACGGATTGGA-3'	5'-	3735 bp
YGR283C	Forward: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTGTAGCATAATAGGGGAAGA-3' Reverse: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTTATTTCAACTTGCCCAACGCTG-3'	5'-	1026 bp
CCS1	Forward: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCACAAAAATGACCACGAACGATAC-3' Reverse: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGATGTTCTATTTGATGTTGTTGGC-3'	5'-	750 bp
YMR310C	Forward: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCACTTAGTTTGTATGAGCAGCAGC-3' Reverse: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCGTACTTATCCATTGCATGAAGG-3'	5'-	954 bp
SNF1	Forward: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCACTCCCTTAATAAAGTCAACATGAG-3' Reverse: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCTTTTACGTTCCACCATCAA-3'	5'-	1900 bp

Çoğaltılan fragmanlar BP klonaz enzimi (Invitrogen) ile, öncelikle, pDONR vektörüne (Invitrogen) ve daha sonra da, LR klonaz enzimi (Invitrogen) ile hedef vektörlere (Addgene) aktarılmıştır. Bu çalışmada; pDONR221 (Şekil 1A) donör vektör olarak, pAG426GPD (Şekil 1B) ise hedef vektör olarak kullanılmıştır. Daha sonra izole edilen vektörlerin ilgili genleri içerip içermedikleri, Bsp14071 (BsrGI- Fermentas) restiriksiyon enzim kesimleri ve enstitümüz bünyesinde bulunan Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Uygulama ve Araştırma Merkezi'ndeki (BİYOMER) ABI 3130XL DNA sekans cihazı kullanılarak doğrulanmıştır.



Şekil 1. Klonlama denemelerinde kullanılan Gateway sistemine ait vektörler. A) pDONR221 donör vektör haritası B) pAG426GPD hedef vektör haritası.

3.3. Li-Ac metoduyla maya transformasyonu

Maya transformasyonları için hızlı ve yüksek transformasyon verimi sağlayan standart lityum asetat metodu kullanılmıştır (Gietz ve Schiestl, 1995). Maya hücreleri logaritmik faza ulaşana kadar YPD ya da YNB besiyerlerinde büyütülmüş ve ardından distile su ile yıkandı. Hücre pelleti 0,1 M Li-Ac ile süspansiyon haline getirildi. Ardından santrifügasyon ile yeniden pellet haline getirilen hücrelere 240 µl PEG (50 % w/v), 36 µl (1 M) LiAc, 5 µl ssDNA (2 mg/ml), 10 µl DTT (0,3 mM), 20 µl plazmit DNA (0,1-10 µg), 10 µl dH₂O eklenir ve 1 dakika vortekslenir. 30°C çalkalamalı inkübatörde 30 dakika inkübe edildi. Arkasından 20–25 dakika 42°C sıcak su banyosunda ısı şokuna uğratıldı. Böylelikle transforme edilmiş hücreler ilgili seçici besiyerlerine ekilerek 30°C'de inkübe edildiler ve 3-4 gün sonrasında büyümeleri gözlemlendiler.

3.4. Maya hücrelerinin bor toleranslarının belirlenmesi

Denemelerde bor kaynağı olarak borik asit kullanılmıştır. Katı besiyeri ortamında yabancı tip ve seçilen maya mutantları bor toleransı göstermeleri bakımından analiz edilmişlerdir. Bir gece boyunca büyümüş hücreler optik yoğunlukları (OD₆₀₀) 0,2 olacak şekilde seyreltilmiştir. Ardından 2.10⁻¹, 2.10⁻², 2.10⁻³ ve 2.10⁻⁴ seri dilüsyonları yapılmıştır. Her dilüsyondan 5µl alınarak farklı konsantrasyonlarda borik asit içeren YPD ya da YNB besiyerlerine damlatılmıştır. 30°C'de en az 3 gün inkübe edildikten sonra hücrelerin koloni oluşturup oluşturmadığı gözlenmiş ve petriyer fotoğraflanmıştır. Böylelikle yabancı tip hücre ile mutantlar arasındaki bor sensitivite farkları gözlenebilmiştir.

3.5. Hücre içi bor konsantrasyonlarının belirlenmesi

Logaritmik fazdaki maya mutantları bir saat 50mM borik asit ile muamele edilmiştir. Borik asit muamelesi görmeyen hücreler ise kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Santrifügasyon ile toplanan hücreler distile su ile yıkanarak ortamdaki borun uzaklaştırılması sağlanmıştır. Toplanan hücreler; lizis tamponu (%2 Triton X-100, %1 SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-Cl, 1mM EDTA) ve cam boncuk kullanılarak vorteks yardımıyla parçalanmış ve ortaya çıkan süpernatantlar deneme için kullanılmıştır. Hücre-içi bor miktarları Boron Cell Test Kit (Merck) ile belirlenmiştir. Kit; renk değişimine dayalı bir metot kullanarak ortamdaki bor miktarını yüksek hassasiyetle ölçülebilmektedir. Denemeler üç kez tekrarlanmış ve her denemede her hücre tipi için üç replika kullanılmıştır. Farklı denemeler kendi aralarında ve yabancı tip hücrelere göre normalize edilmiştir.

3.6. RNA izolasyonu ve Real-Time PCR analizleri

Zengin bir besiyeri olan YPD (%2 glikoz, %2 maya eksresi, %1 pepton) ortamında büyütülen; bor muamelesi gören ve görmeyen maya hücreleri logaritmik büyüme evrelerindeyken toplanmış ve santrifüj ile çöktürülerek hücre pelletleri elde edilmiştir. Daha sonra bu hücre pelletleri steril distile su ile yıkanmış ve besiyerinin hücrelerden tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. RNA izolasyon kiti (Invitrogen) kullanılarak ilgili hücrelere ait toplam RNA'lar elde edilmiştir. Elde edilen bu RNA'lardaki genomik DNA kontaminasyonunu engellemek için DNaz enzimi ile muamele edilmiştir. Ardından Real Time PCR analizlerinde kullanılmak üzere cDNA sentez kiti (Fermentas) yardımıyla komplementer DNA'lar elde edilmiştir. Kantitatif ifadenme seviyelerini belirlemek için sybr green boyası içeren Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Fermentas) ile *ATR1* genine ait 186 baz çiftlik bir bölge ve kontrol olarak 103 baz çiftlik maya aktin geni (*ACT1*) çoğaltılmıştır. Çoğaltılan bölgeler için kullanılan pirimerler: *ATR1* için; *ATR1F* (5'-ACGCGTATAGCATAGCCGCTTTCA-3') ve *ATR1B* (5'-TGTAAGCCTGGTTCCAACCCGATA-3') ile *ACT1* için; *ACT1F* (5'-ACGTTCCAGCCTTCTACGTTTCCA-3') ve *ACT1B* (5'-ACGTGAGTAACACCATCACCGGAA-3'). Denemelerde IQ5 Real-Time PCR System (Bio-Rad) kullanılmıştır. PCR koşulları ise 94°C'de 30 saniye, 58°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye ve 40 döngüden oluşmaktadır.

3.7. RNA izolasyonu ve Northern Blot analizleri

Northern blot analizlerinde kullanılmak üzere mayadan sıcak fenol yöntemi ile total RNA elde edilmiştir. Yaklaşık olarak 10µg total RNA %12,5'lik, 8M üre içeren poliakrilamid jelle yüklenmiş ve yürütülmüştür. Pozitif yüklü naylon membrana (Amersham); Thermo Pierce G2 Fast Blotter sistemi ile transfer (25V, 0,5A, 25dk) yapıldıktan sonra, RNA'lar, UV crosslinker (UVP HL-2000 Hybrilinker) kullanılarak (40.000 µjoule/cm²) membrana tutturulmuştur. Ardından biyotin ile işaretlenmiş RNA problemlerini içeren hibridizasyon tamponu ile 37°C'deki hibridizasyon fırınında (UVP HL-2000 Hybrilinker) bir gece inkübe edilmiştir. Membran; yıkama ve bloklama işlemlerinin ardından (membran bloklama işlemi %2 BSA ile yapılmıştır), 1µl HRP bağlı Streptavidin (0,5 µg/ml) (Pierce) ile inkübe edilmiştir. RNA problemlerine ait sinyaller, SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate solüsyonları (Pierce) kullanılarak VersaDoc Imaging System (Bio-Rad) ile görüntülenmiştir. Denemelerde kullanılmak üzere ticari olarak sentezlettirilen ve satın alınan biyotin işaretli metiyonin, histidin, treyonin tRNA prob sekansları aşağıda gösterildiği gibidir.

5'-CTCCTAGAATCGAACCAGGG-3' (3'-tRNA^{His}_{GTC}) –tRNA/Histidin

5'- GCGCCGCTCGGTTTCGATCC-3' (3'-tRNA^{Met}_{CAT}) –tRNA/Metiyonin

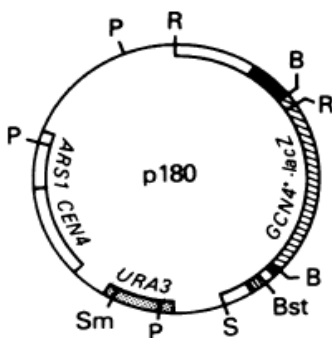
5'-CCTGTCAGAAATGAACTAAC-3' (3'-tRNA^{Thr}_{UGU}) –tRNA/Treyonin

3.8. Western blot analizleri

Yabani tip ve izogenik *gcn1Δ* ve *gcn20Δ* maya mutantları logaritmik faza ulaşıncaya kadar bor içeren ve içermeyen YPD besiyerlerinde büyütülmüşlerdir. Her bir suş için santrifügasyon ile eşit sayıda hücre toplanmıştır. Elde edilen hücre ekstraktları örnek hazırlama tamponunda çözüldükten sonra 95°C'de 5dk kaynatılmıştır. Örnekler %5-15 SDS-PAGE'de yürütüldükten sonra PVDF membrana (Sigma) transfer edilmiştir. Memeli hücre kültürü deneyleri için HeLa hücreleri kullanılmıştır. Denemeye 5000 hücre ile 6 kuyulu petrielerde başlanmıştır. Hücreler 0, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µM borik asit içeren DMEM medyada 5 gün büyütüldükten sonra lizis tamponu kullanılarak (10mM Tris pH:7,5, 1mM EDTA, %0,1 Triton X-100, 1X proteaz inhibitör, 1mM DTT, 1mM Na₃VO₄, 50mM NaF) parçalanmıştır. Elde edilen süpernatantlar ile Bradford denemesi yapılarak protein miktarları tayin edilmiş ve her bir örnekten 26 µg örnek kullanılarak Western blot analizlerine devam edilmiştir. eIF2α'ya spesifik fosfoerin 51 antikoru (US Biological) primer antikor olarak kullanılmıştır. HRP bağlı sekonder antikorlar ile muameleden sonra SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate solüsyonları (Pierce) kullanılarak görüntülenen membranlar daha sonra bu bağlı antikorlardan ayrılarak, maya örnekleri için kontrol olarak maya fosfogliserat kinazına (Invitrogen) spesifik antikorlar ile; HeLa örnekleri için ise γ-tubulin (Sigma) ile yeniden işaretlenmiştir. Kullanılan sekonder antikorlar HRP bağlı anti-rabbit IgG (Sigma) ve HRP bağlı goat anti-mouse IgG'dir (Sigma). Membranlar, gelişmiş kimyasal lüminesans sistemi (Pierce) ile muamele edilmiş ve VersaDoc görüntüleme sistemi (Bio-Rad) kullanılarak görüntülenmiştir.

3.9. β-galaktosidaz aktivite denemeleri

Yabani tip ile maya mutant hücreleri YPD zengin besiyeri içerisinde büyütülmüş ve logaritmik faza ulaşmış hücrelere standart lityum asetat yöntemi kullanılarak p180 plazmidleri transforme edilmiştir. p180 plazmidini GCN4-lacZ gen füzyonundan oluşmaktadır. Plazmid aynı zamanda *GCN4'*ün regülasyonundan sorumlu olan genin yukarı kısmındaki dört küçük düzenleyici sekansı ve seçiciliği sağlayacak *URA3* markerını içermektedir (Şekil 2) (Hinnebusch, 1985).



Şekil 2. GCN4-lacZ plazmidi

Seçici bir besiyeri olan ve urasil amino asiti içermeyen YNB-URA'da büyüeyebilen transformantlar seçilmiş ve daha yüksek miktarlarda büyütülerek beta galaktosidaz analizleri yapılmıştır. Bazı denemeler için, hücreler, farklı konsantrasyonlarda borik asit içeren seçici besiyerlerinde üç saat büyütüldükten sonra toplanmış ve analizler yapılmıştır. Bu deneme için 600 nm'deki optik yoğunlukları (OD) 0.2-0.6 olan hücreler alınmış ve 400 µl Z tamponu (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM β-merkaptotanol ve %0.2 N-lauryl sarcosine) ile homojenize edilmiştir. 30°C'de 30 dakika inkübasyondan sonra bu solüsyona 4 mg/ml ONPG (o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) (Sigma) içeren Z tamponu eklenmiş ve 30°C'de 30dk inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyon 400 µl 1.5M Na₂CO₃ eklenmesiyle ortamın pH'sı değiştirilmek suretiyle durdurulmuştur. Örnekler daha sonra santrifüjlenmiş ve süpernatantlar alınarak 420 nm'deki absorbanları ölçülmüştür. Elde edilen absorban değerleri örneklerin OD değerleri ile normalize edilmiştir.

3.10. Kütle spektrometresi analizleri

Denemelerde ilk olarak ticari olarak satın alınan NADH (Sigma) saf suda çözülerek 200 µM stok solusyon hazırlanmıştır. Su-asetonitril-trietilamin (WAT) karışımı denemede solvent olarak kullanılmıştır. NADH, 1 ml WAT ile karıştırılarak hemen analize alınmıştır. Bunun yanı sıra NADH ve borik asit WAT içerisinde karıştırılarak hemen ya da bir saat inkübasyon sonrası analiz edilmiştir. Borik asit ve NADH için solventteki final konsantrasyonları sırasıyla 500 µM ve 100 µM'dir. Analizler, Applied Biosystems/MDS SCIEX – 4000 QTRAP LC-MS/MS kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda ticari olarak satın alınan ATP (Sigma) saf suda çözülerek 200 µM stok solusyon hazırlanmıştır. Su-asetonitril-trietilamin (WAT) karışımı denemede solvent olarak kullanılmıştır. ATP, 1 ml WAT ile karıştırılarak hemen analize alınmıştır. Bunun yanı sıra ATP ve borik asit WAT içerisinde karıştırılarak hemen ya da bir saat inkübasyon sonrası analiz edilmiştir. Borik asit ve ATP'nin solventteki final konsantrasyonları sırasıyla 500 µM ve 100 µM'dir. Analizler, Applied Biosystems/MDS SCIEX – 4000 Q-TRAP LC-MS/MS kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunlara ek olarak ticari olarak satın alınan maya tRNA'larının karışımını içeren örnek ESI kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. Analizler için kullanılan solvent, izopropanol ve depc ile muamele edilmiş suyun 1:1 oranında karıştırılmasıyla elde edilmiştir. tRNA karışımı depc muamelesi görmüş saf su ile 300 µM konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanmıştır. Analizde kullanılan tRNA karışımının son konsantrasyonu solvent içerisinde 15 pmol/µl olacak şekilde ayarlandıktan sonra negatif iyon ESI kütle spektrumunda incelenmiştir. tRNA karışımına ait kütle spektrumu elde etmek için amonyum asetat ile çöktürme metodu da kullanılmıştır. Bu metoda göre 40-70 µl stok RNA solusyonu 1/3 hacimde steril 10 M amonyum asetat ile karıştırılmıştır.

RNA'ları çöktürmek için 2,5 hacim soğuk saf etanol eklenmiştir. Bu solusyon -20°C'de 3 saat inkübe edilmiş ve daha sonra 15 dakika 12,500 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatantlar uzaklaştırıldıktan sonra amonyum asetat içeriğini azaltmak için pellet yeniden 400 µl %70'lik soğuk etanol ile yıkanmıştır. Bu solusyon da -20°C'de 2 saat inkübe edildikten sonra 12,500 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet 20 dakika vakumlu santrifüj kullanılarak kurutulmuştur. Pellet daha sonra depc ile muamele edilmiş steril saf suyun içerisinde çözülmüş ve analiz için kullanılmıştır. Çöktürmelerden sonraki RNA solüsyonlarının suyun içerisindeki final konsantrasyonları 300 pmol/µl'dir. Aynı yöntem tekrarlanarak ikinci ve üçüncü çöktürmeler de yapılabilmektedir (Limbach vd., 1994). 10-mer'lik tRNA oligomerinin kütle spektrometrisi analizleri için; stok oligomer çözeltisi, izopropanol-DEPC'li su (1:1) ile konsantrasyonu 10pmol/ul olacak şekilde ile seyreltilmiş ve Applied Biosystems 4000 Q-trap kütle spektrometresi ile negatif modda analiz edilmiştir. 10-mer tRNA oligomerinin LC-MS analizleri için, Dionex Ultimate 3000 HPLC sistemi ve Thermo LTQ XL ion trap kütle spektrometresi kullanılmıştır. Oligomeri safsızlıklardan arındırmak için Kromasil C₁₈ kolonu (2,1x10 mm) kullanılmıştır. Kolona yüklenen 1,5 µg örneğin, 200 µl/min akış hızında, A kanalındaki (8 mM amonyum asetat çözeltisi-suda) ve B kanalındaki (8 mM amonyum asetat çözeltisi-metanolda) solventlerin gradienti ile elüsyonu gerçekleştirilmiştir. Absorbans ölçümü dedektör yardımı ile 260nm'de yapılmıştır. Kolon çıkışındaki akış, kütle spektrometresine gönderilerek, örneğe ait kromatogram ve kütle spektrumlarının eş zamanlı olarak kaydedilmesi sağlanmıştır. Analiz sonucunda oligomere ait olduğu belirlenen fraksiyon toplanıp, bu fraksiyona borik asit eklenerek ion trap kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. Ek olarak, kolona yüklenmeden önce stok oligomer çözeltisine borik asit eklenerek LC-MS analizi de gerçekleştirilmiştir.

3.11. Konfokal mikroskop görüntülemesi

Atg8 proteininin lokasyonunu belirlemek amacıyla öncelikle yabancı tip maya hücreleri pRS316 GFP-ATG8 plazmidi ile standart LiAc metodu kullanılarak transforme edilmişlerdir. Plazmidi taşıyan transformant hücreler YNB-URA seçici besiyerlerinde optik yoğunlukları yaklaşık 0,4 olana kadar büyütülmüş ve farklı borik asit konsantrasyonlarıyla bir saat 30°C'de muamele edilmişlerdir. Santrifügasyon ile toplanan hücreler ile lam-lamel arası preparat hazırlanıp Andor Revolution Spin-Disc konfokal mikroskopunda FITC filtresi kullanılarak görüntülenmiştir.

3.12. Hayat süresi analizleri

Maya hücreleri, hayat süresi analizlerinden iki gün önce YPD besiyerlerinde büyütülmüştür. Replikatif hayat süresi her bir anne hücrenin oluşturduğu toplam yavru hücreler olarak

belirlenmiştir. Her bir maya hücresi için bireysel yavru hücreler toplanmış ve başlangıç anne hücresi olarak seçilmiştir. Bu anne hücrelerden yeni oluşan yavru hücreler ayrılmıştır. Petriler periyodik olarak kontrol edilmiş ve hücreler bölünmeyi durdurana kadar yeni oluşan hücreler sayılmış ve ayrılmıştır. Her bir borik asit konsantrasyonu için 20 hücre analiz edilmiştir ve deneyler en az iki tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Maya hücrelerinin kronolojik yaşlanma modeli, koloni oluşturma birimi (cfu) analizi kullanılarak tanımlanabilir (Parrella ve Longo, 2008). Maya hücreleri 30°C'de bir gece 5 ml YPD besiyerinde büyütüldükten sonra santrifügasyon ile toplanmış ve distile su ile yıkanmıştır. Ardından hücreler daha büyük hacimde YPD besiyerlerine ekilerek 30°C'de 180 rpm'de 18 gün inkübe edilmiştir. İlk gün, sıfırinci gün olarak kabul edilmiştir ve sıfırinci günden başlayarak 10 µl hücre örneği alınıp Thoma lamında sayılmıştır. Thoma lamı sayımlarına göre yaklaşık olarak 500 hücre farklı konsantrasyonlarda borik asit içeren YPD petrilere ekilmiş ve 30°C'de 2 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası büyüyen koloniler sayılmış ve hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri $\%CFU = (100 \times \text{sayılan koloni sayısı}) / (\text{ekilen hücre sayısı})$ formülüne göre hesaplanmıştır. Bu işlem, başlangıç kültürü 18. gününe gelene kadar her 72 saatte bir tekrarlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Bor dirençli mutantlarda Gcn4-LacZ aktivitesinin tespiti

Daha önce yapılan haploid maya delesyon seti taramaları ile, yokluğunda, mutantları bora karşı dirençli hale getiren altı tane gen tespit edilmiştir. *ncs2Δ*, *ncs6Δ*, *kti12Δ*, *elp1Δ*, *elp3Δ*, *elp6Δ* mutantları, yabani tip maya hücrelerinin büyüemediği 80 mM borik asit'in yaklaşık olarak iki katı daha yüksek bir konsantrasyon olan 150 mM borik asit varlığında büyüebilmişlerdir. Bu mutantların bor dirençlilikleri homozigot diploid mutant hücreler kullanılarak da doğrulanmıştır (Ulusik vd., 2011a). *ATR1* ise hücre içerisindeki borik asiti dışarı atmak suretiyle maya hücrelerine borik asit varlığında aşırı direnç kazandıran ve mayadaki bor transportundan sorumlu önemli bir gen olarak bulunmuştur (Kaya vd., 2009). Aynı zamanda Gcn4'ün bor varlığında *ATR1*'in regülasyonundan sorumlu transkripsiyon faktörlerinden biri olduğu ortaya çıkarılmıştır.

İlgili mutantlarda eksik olan genler, translasyon esnasında tRNA'ların wobble baz modifikasyonlarında rol oynayan genlerdir (Tablo 2). Bu genlerin yokluğunda tRNA baz modifikasyonu ile ilgili aksaklıklar ortaya çıkacak ve bu da translasyonu etkileyecektir. Translasyonun etkilenmesi sonucu ise pek çok stres ve amino asit biyosentez genleri aktive olacaktır. Bunun yanı sıra bu genlerin aktivasyonunun kontrolünden sorumlu olan transkripsiyon faktörleri de aktif hale gelecektir. Dolayısıyla yüksek konsantrasyonlardaki boru tolere edebilen altı mutanttaki Gcn4 seviyelerinin yabani tip maya hücrelerine göre daha fazla olabileceği, bunun *ATR1* ifadelenmesini arttırabileceğini ve böylelikle de bor dirençliliğini sağlayabileceği düşünülmüştür.

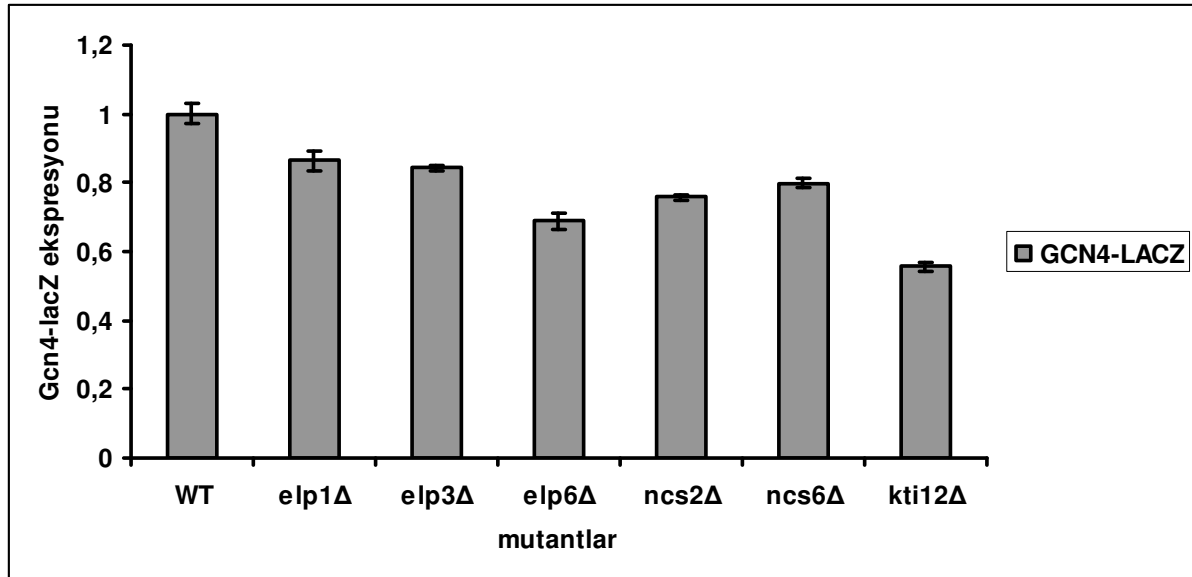
Tablo 2. Bor dirençliliği gösteren mutantlar (Kaynak: Maya Genom Veritabanı- Yeast Genome Database).

Ortak isim	Sistemik isim	Fonksiyon
ELP1	YLR384C	tRNA'daki wobble nükleozidlerin modifikasyonu için gerekli olan Elongatör kompleksinin alt birimi. Elongatörün yapısal bütünlüğünü korur.
ELP3	YPL086C	tRNA'daki wobble nükleozidlerin modifikasyonu için gerekli olan Elongatör kompleksinin alt birimi. Histon asetiltransferaz aktivitesi göstermektedir.
ELP6	YMR312W	tRNA'daki wobble nükleozidlerin modifikasyonu için gerekli olan Elongatör kompleksinin alt birimi. Elongatörün yapısal bütünlüğünü için gereklidir.
NCS2	YNL119W	Lys(UUU) ve Glu(UUC) tRNA'larının wobble pozisyonundaki üridin tiyolasyonu için gereken bir protein. Urmilasyonda, invazif ve psödohifsel büyümede rol alır.

NCS6	YGL211W	Gln, Lys ve Glu tRNA'larının wobble pozisyonundaki üridin tiyolasyonu için gereken bir protein. Urmilasyonda, invazif ve psödohifsel büyümede rol alır.
KTI12	YKL110C	Elongatör kompleks ile birlikte tRNA'daki wobble nükleozidlerin modifikasyonunda rol alan protein. Genom boyunca kromatin ile ve Cdc19p ile etkileşir.

Bora karşı dirençlilik gösteren mutantların dirençlilik mekanizmasının aydınlatılması kapsamında öncelikle bu mutantlardaki Gcn4 protein seviyeleri incelenmiştir. Bunun için *ncs2Δ*, *ncs6Δ*, *kti12Δ*, *elp1Δ*, *elp3Δ*, *elp6Δ* mutant hücreleri ile yabani tip hücrelere p180 plazmidleri transforme edilmiştir. Elde edilen transformantlar ile beta galaktosidaz analizleri yapılmıştır.

Çoklu tekrarlardan oluşan beta-galaktozidaz denemeleri sonucunda mutantlardaki Gcn4-lacZ seviyeleri beklenilenin aksine yabani tip hücrelere (WT) kıyasla ya benzer ya da daha az bulunmuştur. Yalnızca *ncs6Δ* mutantında bir miktar artış gözlemlenmiştir (Şekil 3). Bu durumda bor dirençli maya mutantlarının çoğunda Gcn4 transkripsiyon faktörünün dirençlilik mekanizması ile alakasının olmadığı düşünülebilir. Bor dirençliliğinin sağlanmasında *ATR1*'in aktivasyonunu sağlayan başka faktörler de rol oynuyor olabilir.



Şekil 3. Yabani tip ve bor dirençliliği gösteren mutant maya hücrelerindeki Gcn4-lacZ aktivitesi.

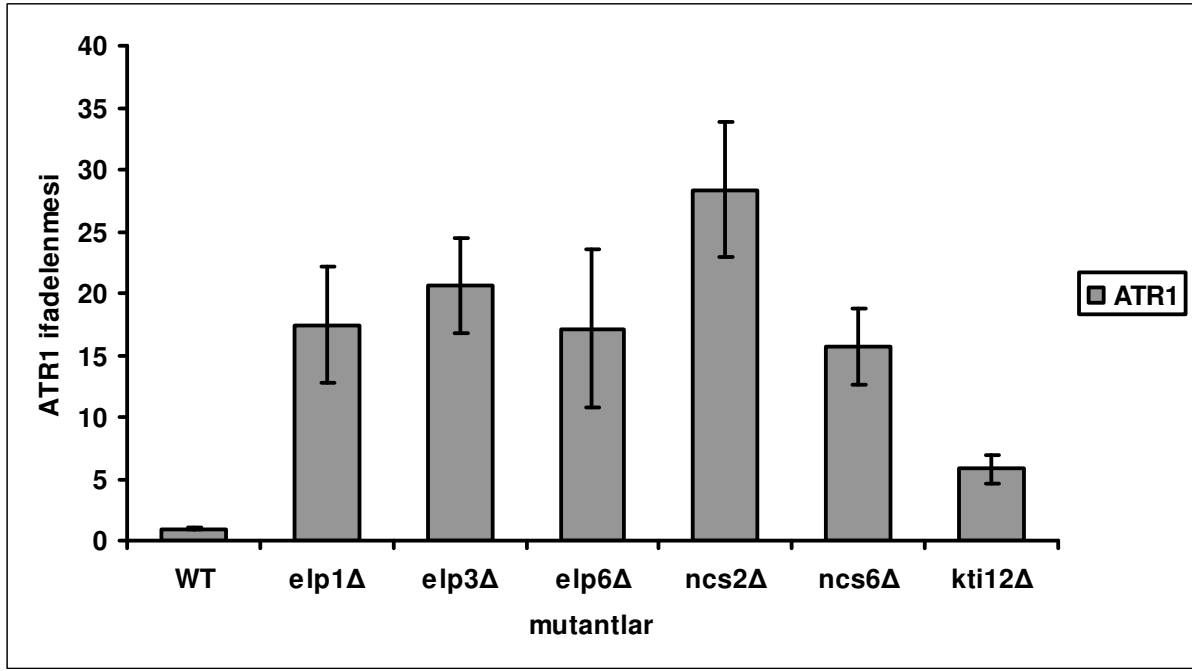
4.2. Bor dirençli mutantlarda ATR1 ifadenme profillerinin belirlenmesi

Bora karşı dirençlilik gösterdiği bulunan *ncs2Δ*, *ncs6Δ*, *kti12Δ*, *elp1Δ*, *elp3Δ*, *elp6Δ* mutantlarında Gcn4 aktivitesinin fazla olabileceği, bu aktivite sonucunda *ATR1* geninin de ifadenmesi sağlanarak bora karşı bir direnç geliştirilebileceği düşünülmüştür. *ATR1* geni,

mayada bor dirençliliğinin sağlanmasında önemli katkıları olan bir bor pompasını kodlamaktadır. Dolayısıyla *ncs2Δ*, *ncs6Δ*, *kti12Δ*, *elp1Δ*, *elp3Δ*, *elp6Δ* mutantlarında *ATR1*'in aktif olması beklenilmektedir. Bor stresinde *ATR1* ifadelenmesinin düzenlenmesinden sorumlu ana transkripsiyon faktörü olarak *GCN4* gösterilmiştir (Uluişik vd., 2011b). Ancak sözü edilen mutantlarda *Gcn4* ifadelenme seviyelerinin yabancı tip hücrelere göre düşük çıkmıştır.

Real-time PCR denemeleri farklı zamanlarda, farklı cDNA'lar kullanılarak ve her denemede en az üç tekrarlı olmak üzere gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak; *ncs2Δ*, *ncs6Δ*, *kti12Δ*, *elp1Δ*, *elp3Δ*, *elp6Δ* mutantlarındaki *ATR1* mRNA ifadelenme seviyelerinin yabancı tip (WT) hücrelere göre oldukça arttığı görülmüştür (Şekil 4). Bu da ilgili mutantlardaki bor dirençliliğinin kaynağı olabilir.

Yokluğunda hücreleri bora karşı dirençli hale getiren bu genlerden *ELP1*, *ELP3* ve *ELP6* mayadaki altı tane alt üniteye sahip elongatör kompleksinin üyeleridir. Elongatör kompleksinin yüksek yapılı organizmalarda korunmuş olduğu düşünülmektedir. Ökaryotik hücrelerin sitoplazmalarında belirli tRNA'ların wobble pozisyonundaki üridine, metoksikarbonilmetil (mcm) ve karbomoyilmetil (ncm) grupları eklenmektedir. Bu tRNA'lar ise adenin ve guanin ile biten kodonların kodlamasını doğru bir şekilde gerçekleştirebilmektedir. tRNA'lardaki bu modifikasyonlarla gen ifadelenmelerinin translasyonel düzeyde kontrolü sağlanmaktadır (Johansson vd., 2008). ELP kompleksindeki genler tRNA'lardaki bu modifikasyonların oluşmasında rol oynamaktadır (Huang vd., 2005). Aynı zamanda ELP kompleksinin, ekzositoz ve tubulin asetilasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Rahl vd., 2005; Creppe vd., 2009). *Kti12*, elongatör kompleks ile etkileşime girerek wobble bazlarının modifikasyonunda rol oynamaktadır (Huang vd., 2005). *Ncs2* ve *Ncs6* ise yine tRNA'larda 5-metoksikarbonilmetil-2-tiyüridin (mcm^5s^2) ve 2-tiyüridin (s^2) modifikasyonlarını oluşturmaktadır (Huang vd., 2008). Görüldüğü gibi bu genlerin yokluğunda tRNA'larda meydana gelen modifikasyonlar gerçekleşemeyecektir ve ilginç bir şekilde ilgili modifikasyonların gerçekleşmemesi hücre içerisinde bir takım sinyal yollarını aktive etmekte, *Atr1* fonksiyonel hale gelmekte ve hücrelerin bor stresine dayanmalarını sağlamaktadır.



Şekil 4. Yabani tip ve bor dirençliliği gösteren maya mutantlarında *ATR1* mRNA ifadelenme seviyeleri. *ACT1* ve *ATR1* mRNA'larına ait Ct değerleri esas alınarak normalizasyon yapılmıştır.

4.3. Yokluğunda bor duyarlılığına sebep olan genlerin klonlanması, komplementasyonu ve yabani tip hücrelerde ifadelenmeleri

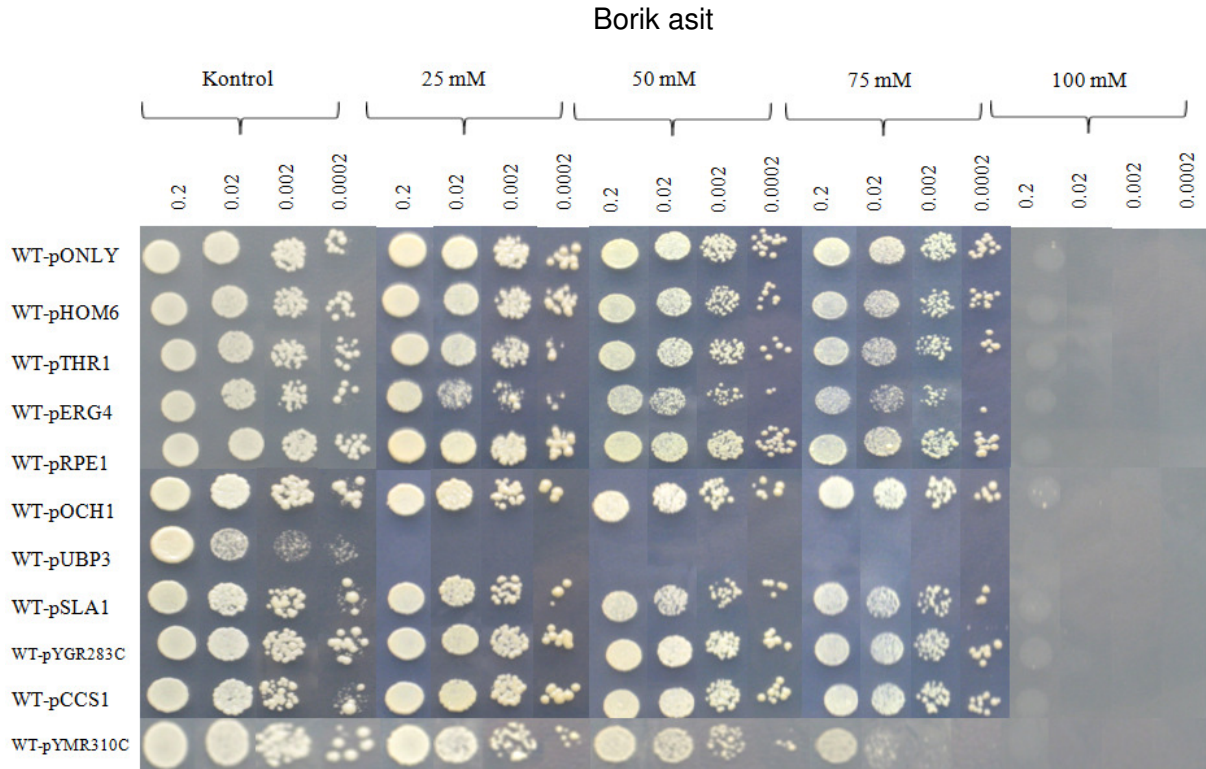
Daha önce tamamlanan Tübitak projemiz kapsamında bor metabolizmasındaki genlerin bulunması amacıyla yapılan maya delesyon seti taramaları sonucunda, yokluğunda hücreleri bora karşı aşırı duyarlı hale getiren 21 tane gen tespit edilmişti (Uluişik vd., 2011a). Bu genler literatürde ayrıntılı olarak incelendiğinde hücre içerisinde farklı metabolizmalara katıldıkları (amino asit metabolizması, veziküler transport, hücre döngüsü, karbonhidrat metabolizması gibi) ve farklı görevler üstlendikleri görülmüştür. Bor duyarlılık mekanizmalarının aydınlatılması için bu genlerin arasından bora aşırı duyarlı olan on tanesi seçilmiştir (*ymr310cΔ*, *sla1Δ*, *erg4Δ*, *ygr283cΔ*, *rpe1Δ*, *thr1Δ*, *hom6Δ*, *ubp3Δ*, *ccs1Δ* ve *och1Δ*). Tablo 3'de seçilen genlerin olası fonksiyonları görülmektedir. Bu mutasyonların karakterizasyonu, mekanizmanın anlaşılmasına katkıda bulunacaktır.

Tablo 3. Yokluğunda aşırı bor hassasiyetine sebep olan genlerin listesi (Kaynak: Maya Genom Veritabanı- SGD ve Uluişik vd., 2011a' dan uyarlanmıştır).

Ortak isim	Sistemik isim	Fonksiyon
SLA1	YBL007C	Aktin sitoskeletonunun kurulması için gereken sitoskeleton proteini

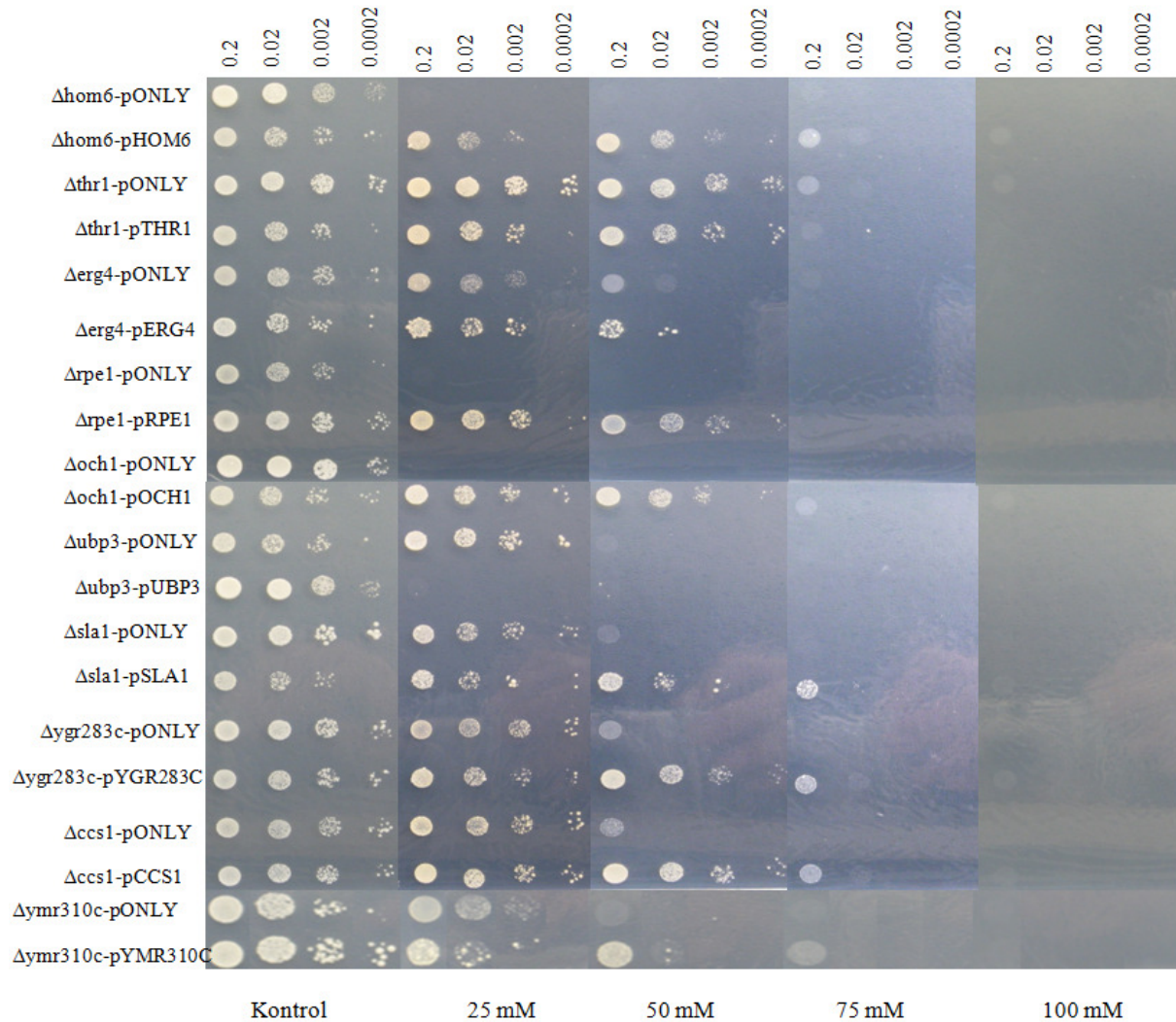
YMR310C	-	Ribozom biyogenezinde rol aldığı ve S-adenozilmetiyonin-bağımlı bir metiltransferaz olduğu düşünülmektedir
ERG4	YGL012W	Ergosterol biyosentezinin son adımını katalizleyen C-24(28) sterol redüktaz
YGR283C	-	S-adenozilmetiyonin-bağımlı bir metiltransferaz olduğu düşünülmektedir
RPE1	YJL121C	D-ribuloz-5-fosfat 3-epimeraz
THR1	YHR025W	Treyonin biyosentezi için gerekli olan korunmuş bir homoserin kinaz
HOM6	YJR139C	Homoserin dihidrogenaz
UBP3	YER151C	Übikutin-spesifik proteaz
CCS1	YMR038C	Süperoksit dismutazın bakır şaperonu
OCH1	YGL038C	Cis-Golgi için mannoziltransferaz

İlgili mutantların bor duyarlılık mekanizmalarını anlamak ve söz konusu mutasyonların karakterizasyonu için ilk etapta bu mutantlarda eksik olan genler Gateway klonlama sistemi ile klonlanmıştır. Destinasyon vektörü olarak pAG426GPD plazmitinde bulunan genlerin yabancı tip maya hücrelerine transformasyonu yapılarak, ilgili genlerin aşırı ifadenmeleri sağlanmıştır. Aynı zamanda sözü edilen gen mutantlarına, ilgili genler plazmit içerisinde geri kazandırılmıştır. Bu genleri aşırı ifade eden yabancı tip hücrelerin ve komplementasyonu gerçekleştirilen mutant hücrelerin bor dirençlilikleri spotlama deneyleriyle gösterilmiştir (Şekil 5 ve Şekil 6).



Şekil 5. Yokluğunda bor duyarlılığına sebep olan genlerin yabancı tip hücrelerde aşırı ifadenemesinin bor toleransına etkisi.

Yabancı tip maya hücrelerinin 75 mM borik asiti tolere edebildikleri daha önceden gösterilmiştir (Kaya vd., 2010). Şekil 5'de görüldüğü gibi, boş plazmit içeren yabancı tip maya hücreleri de bu sonucu doğrular niteliktedir ve denememizde kontrol olarak kullanılmıştır. Yokluğu aşırı bor hassasiyetine sebep olan genlerin yabancı tip maya hücrelerinde ifadenmeleri ise bu hücrelere ek bir dirençlilik ya da duyarlılık sağlamamıştır. Yalnızca *UBP3* geninin aşırı ifadelenildiği yabancı tip maya hücreleri 25 mM borik asit varlığında dahi büyümemiştir. Ubp3, bir ubikütün proteazdır ve Bre5 ile birlikte çalışıp COPII alt ünitesinin deubikütinlenmesini sağlayarak endoplazmik retikulum ve golgi cisimciği arasındaki trafiğin düzenlenmesine yardımcı olmaktadır (Cohen vd., 2003). *bre5Δ* mutanı da daha önce yapılan maya delesyon seti taramalarında bora hassasiyet gösteren bir mutant olarak bulunmuştur (Uluişik vd., 2011a). Dolayısıyla *BRE1* ve *UBP3* genleri ya da bu genlerin etkilediği diğer genler ve bor stresi arasında bir ilişki olabilir. Bu, ilginç bir sonuçtur ve daha ayrıntılı incelenmesi gerekmektedir.



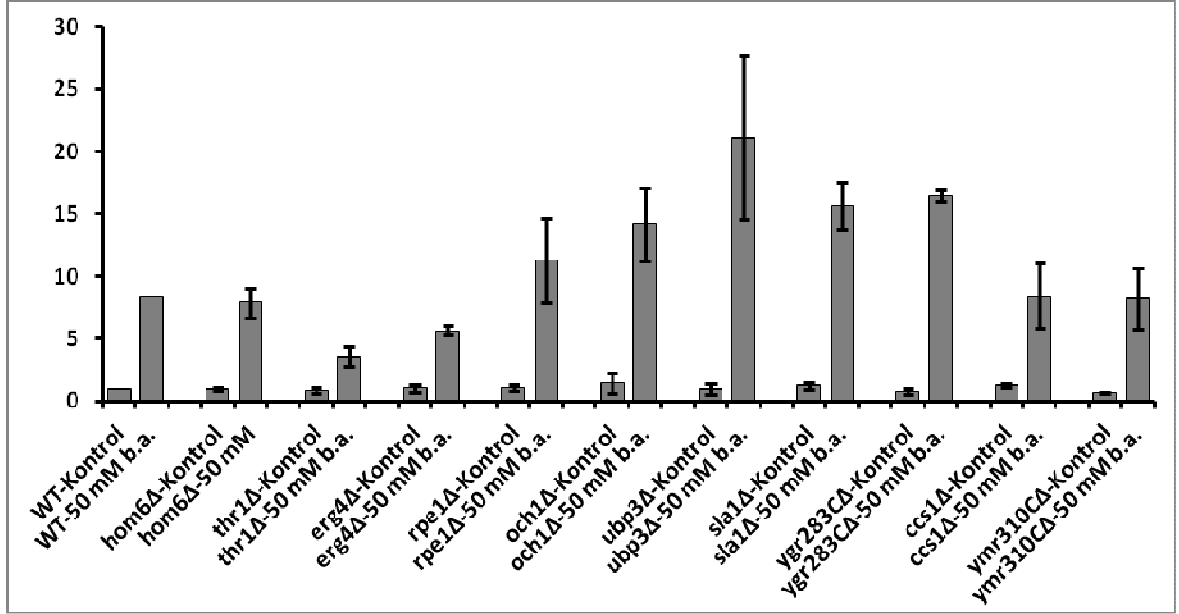
Şekil 6. Yokluğunda maya hücrelerinin bora karşı aşırı duyarlı olmasına neden olan genlerin ilgili maya mutantlarında komplementasyonunun bor toleransına etkisi.

Bora duyarlılık gösteren maya hücrelerine, ilgili genler plazmit ile yeniden kazandırıldığında, bazı mutant hücrelerin bor toleranslarının değiştiği görülmüştür (Şekil 6). Buna göre; hom6 Δ -pHOM6, sla1 Δ -pSLA1, ygr283c Δ -pYGR283C, ccs1 Δ -pCCS1, och1 Δ -pOCH1, ymr310c Δ -pYMR310C transformantları yabancı tip maya hücrelerinin gösterdiği toleransa benzer bir tolerans ile 75mM borik asit varlığında büyüyebilmişlerdir. Dolayısı ile bu mutantlarda komplementasyon testleri başarılı olmuştur. Bunun yanı sıra; erg4 Δ -pERG4, rpe1 Δ -pRPE1, thr1 Δ -pTHR1 transformantları ise 50 mM borik asiti tolere edebilmişlerdir ve transformasyon sonucu ilave dirençlilik kazanmamışlardır. ubp3 Δ -pUBP3 transformantı ise 25 mM borik asite hala hassastır. İlgili genlerin mutantlara geri verilmesi sonucu bor tolerans seviyesin yabancı tip seviyesine çıkması bor dirençliliğinin/duyarlılığının test edilen genler ile alakalı olduğunu göstermektedir. Komplementasyon sağlanamayan durumlarda ise hücrelerin genetik altyapısı ile ilgili bazı farklılıkların/mutasyonların varlığı olasıdır.

4.4. Borik asite karşı duyarlılık gösteren mutantlarda hücre içi bor miktarlarının belirlenmesi

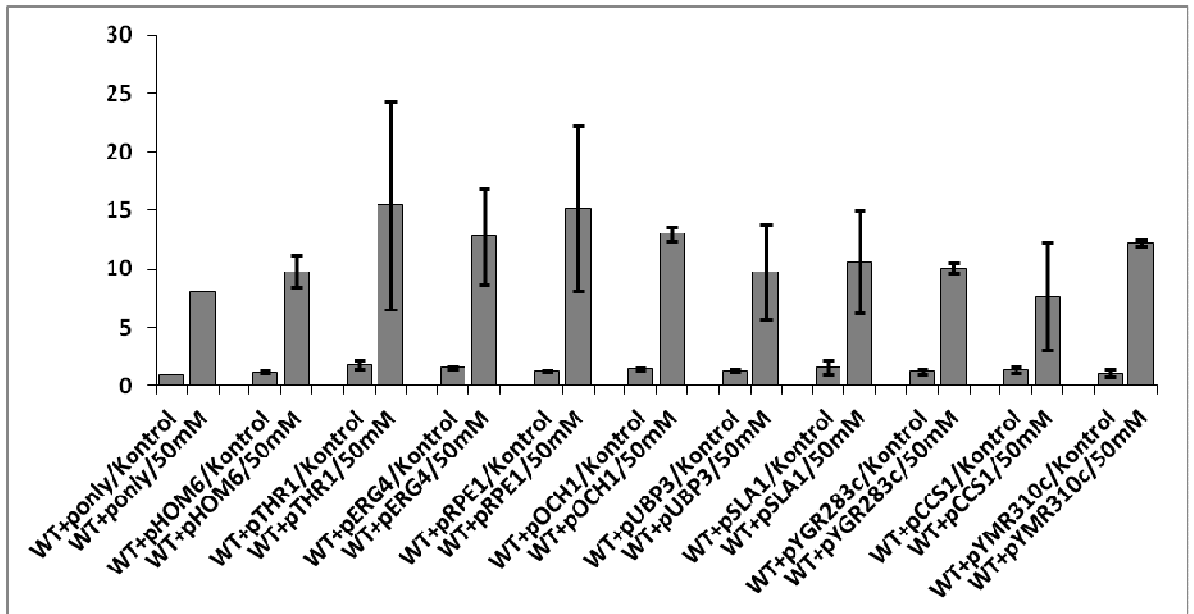
Duyarlı mutantlardaki hücre-içi bor miktarları ölçülmüştür. Aynı zamanda; yokluğunda hücrelerin bora aşırı duyarlı olmasına sebep olan genlerin, yabancı tip hücrelerde ekstradan ifadenmesinin hücre-içi bor miktar değişimi üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Bu deneme için öncelikle logaritmik fazdaki bor-duyarlı mutantlar bir saat 50mM borik asit ile muamele edilmiştir. Borik asit muamelesi görmeyen hücreler ise kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Hücre-içi bor miktarları Boron Cell Test Kit (Merck) ile belirlenmiştir. Kit; renk değişimine dayalı bir metot kullanarak ortamdaki bor miktarını yüksek hassasiyetle ölçebilmektedir. Denemeler üç kez tekrarlanmış ve her denemede her hücre tipi için üç replika kullanılmıştır. Farklı denemeler kendi aralarında ve yabancı tip hücrelere göre normalize edilmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. Borik asit ile muamele edilen yabani tip ve bor-duyarlı mutantlardaki hücre-içi bor miktarları

Daha sonra yokluğunda hücreleri borik asite karşı duyarlı hale getiren genlerin yüksek kopya sayılı bir plazmit ile yabani tip hücrelerde ekstradan ifadelenmeleri sağlanmıştır. Kontrol olarak ise yabani tip hücreler boş pAG426GPD plazmiti ile transforme edilmişlerdir. Transformasyonlar için standart LiAc metodu kullanılmıştır (Gietz ve Schiestl, 1995). İlgili transformantlar urasil aminoasiti içermeyen besiyerlerinde seçildikten sonra deneme için kullanılmak üzere borlu ve borsuz ortamlarda büyütülmüştür. Hücre-içi bor ölçüm sonuçları Şekil 8’de görüldüğü gibidir.



Şekil 8. Yokluğunda bor duyarlılığına sebep olan genlerin yabancı tip hücrelerde aşırı ifadenmesinin hücre-içi bor miktarına etkisi

Şekil 7'de görüldüğü gibi kontrol grubu hücrelerdeki hücre-içi bor miktarları birbirine oldukça yakinken; borik asit muamelesiyle bazı mutantlar yabancı tipe göre hücre içerisinde fazlaca bor biriktirmiştir. Bu mutantlar *rpe1Δ*, *och1Δ*, *ubp3Δ*, *sla1Δ*, *ygr283cΔ* olarak sıralanabilir. Rpe1, pentoz fosfat yolağında rol oynamaktadır ve genin delesyonunun oksidatif stres duyarlılığı yarattığı bilinmektedir (Juhnke vd., 1996). Och1, golgi cisimciğinde bulunmaktadır ve proteinlere mannoz gruplarının eklenmesinden sorumlu bir mannoziltransferazdır (Nakayama vd., 1992). Ubp3, endoplazmik retikulum ve golgi arasındaki trafiğin düzenlenmesinde rol alan bir übikülin proteazıdır. Aynı zamanda ozmotik strese yanıtta rol oynadığı da bilinmektedir (Baker vd., 1992; Sole vd., 2011). Sla1, nükleus ve hücre korteksinde bulunmaktadır. Aktin sitoskeletonunun ve endositozun düzenlenmesinde rol alan proteinlerle etkileşmektedir (Warren vd., 2002). Ygr283c'nin ise görevi tam olarak bilinmemese de bir metiltransferaz olarak varsayılmaktadır (Wlodarski vd., 2011). Görüldüğü gibi bu genler hücredeki önemli biyokimyasal olaylar ve hücre trafikte rol almaktadırlar. Borik asitin yüksek miktarlarda bulunmasının hücreye toksik etkileri olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla bu mutantların borik asite karşı aşırı duyarlı olmaları hücre içerisinde biriken yüksek miktardaki bordan kaynaklanabilir. Bu beklenen bir sonuçtur. Özellikle borik asit ile muamele edilmiş *ubp3Δ* mutantındaki hücre içi bor miktarının yine borik asit ile muamele edilmiş yabancı tip hücrelere göre neredeyse iki katı fazla olması ilginçtir. Geçtiğimiz yıl yayınlanan bir makalede, Ubp3 aktivitesinin mayadaki Ras/cAMP-bağımlı protein kinaz (PKA) yolağının düzenlenmesi için gerekli olduğu bulunmuştur ve Ubp3, Ras/PKA sinyal yolağının yeni bir regülatörü olarak nitelenmiştir (Li ve Wang, 2013). Dolayısıyla Ras/PKA yolağının bor stres yanıt mekanizmasında rolü olabilir.

Borik asit muamelesiyle hücre-içi bor miktarları yabancı tip hücrelere göre daha az bulunan mutantlar ise *thr1Δ*, *erg4Δ* şeklinde sıralanabilir. *hom6Δ*, *ccs1Δ* ve *ygr310cΔ* mutantları ise borik asit muamelesinden sonra yabancı tip hücrelere benzer bir sonuç vermişlerdir. Aslında bu sonuç ilginçtir. Çünkü borik asit uygulamasından sonra ilgili mutantlardaki hücre-içi bor miktarları, borik asit ile muamele edilmiş yabancı tip hücrelerdeki hücre-içi bor miktarına benzer ya da daha az bulunmasına rağmen bu mutantlar borik asite karşı oldukça duyarlıdır. Halbuki yabancı tip maya hücreleri 75mM borik asit varlığında büyüyebilmektedir. Thr1; treyonin, serin, metiyonin gibi amino asitlerin sentezinden sorumludur ve ekspresyonu Gcn4 tarafından kontrol edilmektedir. Bor stresinde Gcn4'ün aktifleştiği ve amino asit biyosentez genlerinin ekspresyonunda artış olduğu gözlenmiştir (Uluişik vd., 2011b). Dolayısıyla

thr1Δ mutantının hücre içi bor seviyeleri düşük olsa dahi amino asit metabolizmasındaki bir bozukluktan ötürü mutantın bora aşırı hassas hale gelmesi muhtemeldir. Erg4 ise maya ve fungus hücre membranlarında bulunan ergosterol biyosentezinden sorumludur. Ergosterolün görevlerinden bir tanesi de membran bütünlüğünün korunmasıdır. Dolayısıyla bu genden yoksun bir mutantta hücre membran bütünlüğünün bozulabileceği böylelikle borik asit gibi moleküllerin hücre içine ve dışına taşınımının kolaylaşabileceği varsayılabilir ve ilgili mutanttaki düşük hücre-içi bor seviyeleri bu durumla ilişkilendirilebilir.

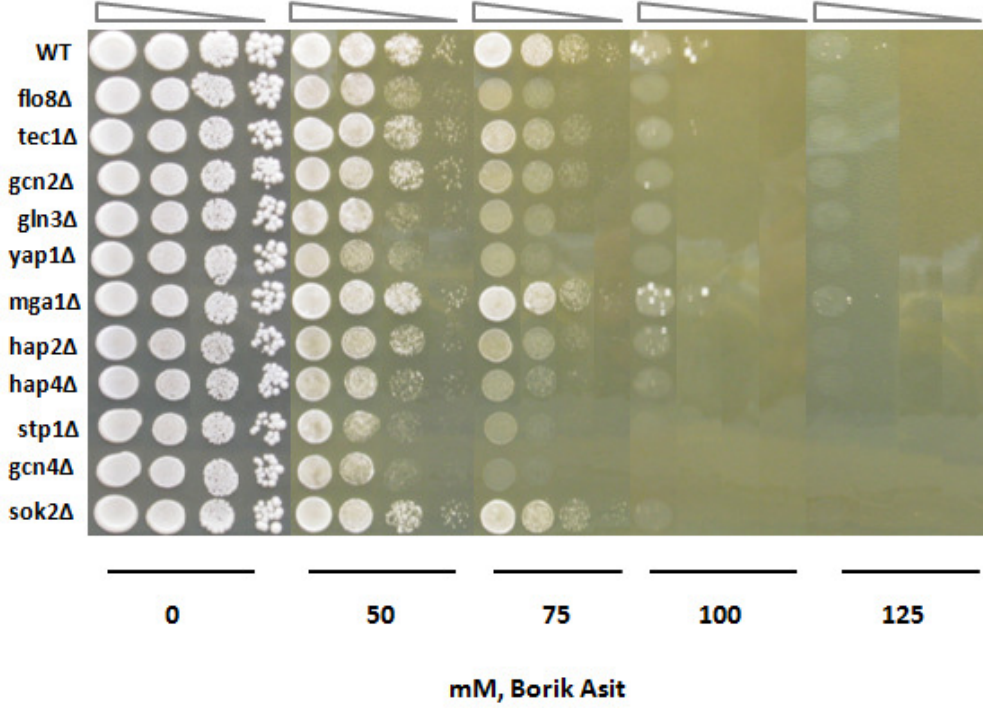
Eksikliğinde hücreleri bora karşı duyarlı hale getiren genlerin aşırı ifadelenmelerinin bu duyarlılığı ortadan kaldıracabileceği düşünülmüştür. Fakat borik asit muamelesinin ardından Şekil 8'de de görüldüğü gibi, bu genleri ifade eden plazmitleri içeren yabancı tip hücrelerdeki hücre-içi bor miktarları, boş plazmit içeren yabancı tip hücrelerdeki bor miktarlarından fazladır. Ancak Şekil 5'de spot denemeleriyle gösterildiği gibi ilgili genlerin aşırı ifadelendiği yabancı tip hücreler 75mM borik asiti tolere edebilmişlerdir. Dolayısıyla genlerin yokluğunda hücreler bora karşı aşırı hassas hale gelirken, bu genlerin aşırı ifadelenmesi borik asit hassasiyetini ortadan kaldırmakta ancak hücre-içi bor seviyelerinde belirgin bir azalmaya sebep olmamaktadır. Bu durumda devreye farklı sinyal yollarının girdiği düşünülebilir.

4.5. Gcn4 transkripsiyon faktörünün regülasyonundan sorumlu transkripsiyon faktörlerinin bor dirençliliklerinin belirlenmesi

Gcn4'ün bor ile ilişkili ana transkripsiyonel regülatörlerden biri olduğu daha önceki çalışmalarımızla gösterilmiştir (Ulusik vd., 2011b). Ancak bor stresinin *GCN4*'ün transkripsiyonunu nasıl indüklediği tam olarak bilinmemektedir. Aynı zamanda farklı stres koşulları karşısında aktifleşen çeşitli sinyal yolları Gcn4 transkripsiyon faktörüne yönelmektedir. Dolayısıyla *GCN4*'ün promotor bölgesine bağlanabilen ve *GCN4*'ü aktive etmek ya da inhibe etmek şeklinde görev yapan pek çok transkripsiyon faktörü vardır. Bor stresine yanıtta bu transkripsiyon faktörlerinden hangisinin ya da hangilerinin rol oynadığını bulmak amacıyla YEASTRACT veri tabanından *GCN4*'ün promotor bölgesine bağlanabilen 12 tane transkripsiyon faktörü belirlenmiştir. Yeastract veritabanı, deneysel verilerden yola çıkarak *Saccharomyces cerevisiae*'deki transkripsiyon faktörleri ve onların hedef genleri arasındaki düzenleyici ilişkileri kapsayan bir kaynaktır (Teixeira vd., 2006). Bor stresinde Gcn4 transkripsiyon faktörünü aktive eden transkripsiyon faktörünü bulmak için öncelikle belirlenen *fh1Δ*, *flo8Δ*, *gln3Δ*, *hap2Δ*, *hap4Δ*, *mga1Δ*, *rap1Δ*, *sok2Δ*, *ste12Δ*, *stp1Δ*, *tec1Δ*, *yap1Δ* mutantları farklı konsantrasyonlarda borik asit içeren besiyerlerinde büyütülmüş ve bor toleransları ölçülmüştür. Şekil 9'da görüldüğü gibi; *tec1Δ*, *mga1Δ* ve *sok2Δ* mutantları borik

asit varlığında yabani tip maya hücreleri ile benzer büyüme gösterirken diğer mutantlar borik asit muamelesine karşı hassastır.

(NOT. Yeastract veritabanından *GCN4* promotoruna bağlandığı bulunan *FHL1* ve *RAP1* gen mutantları laboratuvarımızda bulunan maya delesyon seti içerisinde mevcut değildir. Bu yüzden denemelerden çıkarılmıştır.)



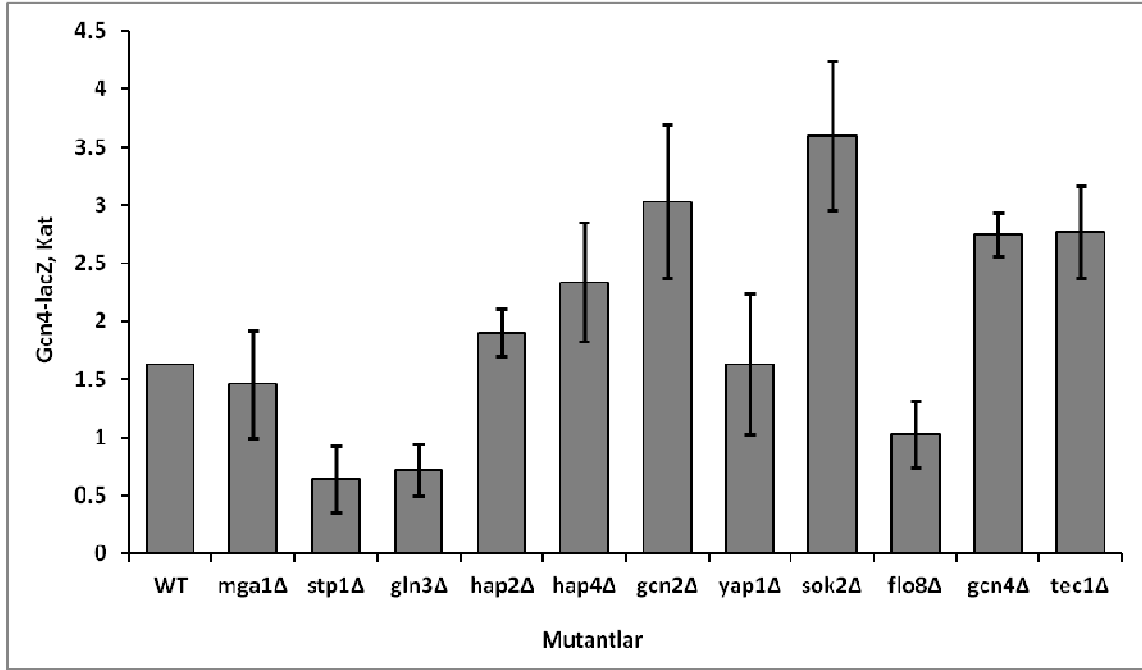
Şekil 9. *GCN4*'ün promotoruna bağlanan transkripsiyon faktör mutantlarının bor toleransları

4.6. *Gcn4*'ün regülasyonundan sorumlu transkripsiyon faktör mutantlarında *Gcn4-lacZ* ifadeleneşmesi

mga1Δ, *stp1Δ*, *gln3Δ*, *hap2Δ*, *hap4Δ*, *gcn2Δ*, *yap1Δ*, *sok2Δ*, *flo8Δ*, *gcn4Δ*, *tec1Δ* mutantlarına standart LiAc yöntemi kullanılarak *GCN4-lacZ* (p180) plazmit transformasyonu yapılmıştır. Transformantlarla yapılan β -galatozidaz denemesi en az dört kez tekrarlanmıştır ve her denemede en az üç replikalı örnekler ile çalışılmıştır.

Şekil 10'da görüldüğü gibi *mga1Δ*, *stp1Δ*, *gln3Δ*, *yap1Δ* ve *flo8Δ* mutantlarındaki *Gcn4-lacZ* seviyeleri düşüktür. İlgili genlerin yokluğunda *Gcn4-lacZ* seviyelerindeki düşüş, bu genlerin *GCN4*'ü aktifleştirmek suretiyle fonksiyon gösterdiği anlamına gelebilir. *hap4Δ*, *gcn2Δ*, *sok2Δ*, *gcn4Δ* ve *tec1Δ* mutantlarında ise *Gcn4-lacZ* ifadeleneşmesi yabani tip hücrelere göre daha fazladır. Bu durumda ilgili genlerin de *GCN4*'ün ifadeleneşmesinde inhibitör rol oynayabilecekleri söylenebilir. Özellikle *GCN2* geninin amino asit kıtlığı gibi pek çok stres

koşullarında aktive olarak genel translasyon mekanizmasını yavaşlattığı ve *GCN4*'ün ifadenmesini arttırdığı bilinmektedir. Ancak stres koşulları ortadan kalktığında *GCN4*'ün ifadenmesi de yine *GCN2* aktivitesine bağlı olarak azalmaktadır (Ljungdahl ve Daignan-Fornier, 2012). Bunun yanı sıra *Gcn4* aynı zamanda kendi ifadenmesini düzenleyebilmektedir. *GCN4*'ün aşırı ifadenmesinin hücre büyümesine olumsuz etkileri de bilinmektedir. *gcn4Δ* mutantında *GCN4* geninin sadece plazmit üzerinden ifade edilmesi, aşırı ifadenme profilini ortadan kaldırarak *Gcn4*'ün kendi üzerindeki inhibisyonunu engellemiş olabilir. Bu yüzden de daha yüksek *Gcn4-lacZ* ifadenmesi gözlenmiş olabilir.

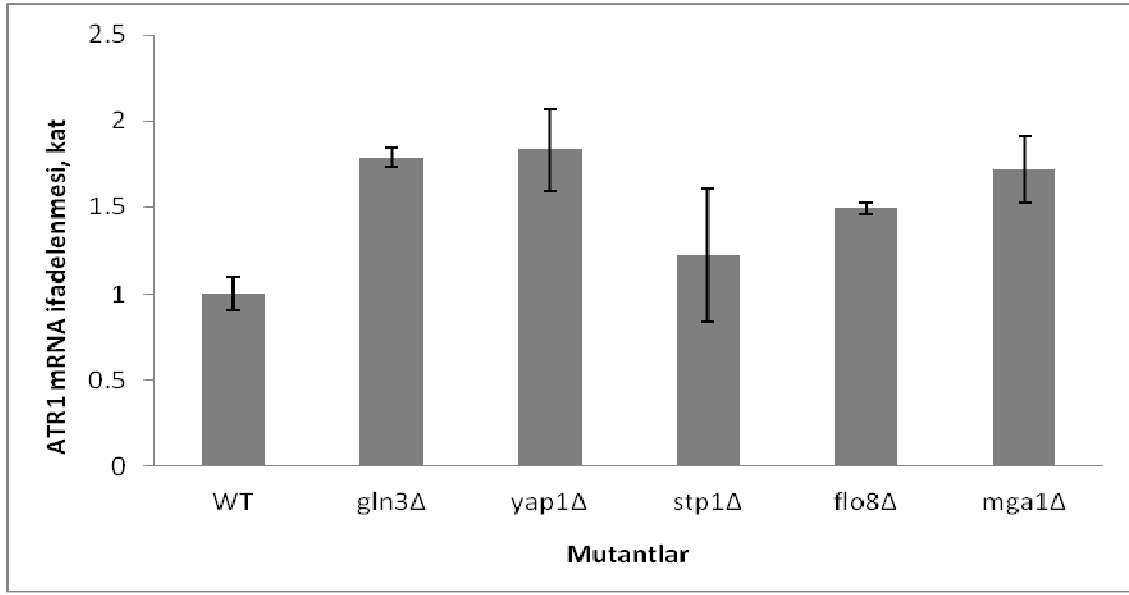


Şekil 10. *GCN4*'ün promotoruna bağlanan transkripsiyon faktör mutantlarında *Gcn4-lacZ* ifadenmeleri

4.7. *Gcn4*'ün regülasyonundan sorumlu transkripsiyon faktör mutantlarında *ATR1* mRNA ifadenmesi

B-galaktozidaz denemeleri ile elde edilen sonuçlara göre transkripsiyon faktör mutantlarından *mga1Δ*, *stp1Δ*, *gln3Δ*, *yap1Δ* ve *flo8Δ*'de *Gcn4-lacZ* seviyeleri düşüktür. Söz konusu mutantlardaki eksik transkripsiyon faktörleri *GCN4*'ün ve dolaylı olarak da *ATR1*'in aktivasyonunda rol oynuyor olabileceği düşüncesinden yola çıkarak ilgili transkripsiyon faktör mutantlarında *ATR1* mRNA seviyeleri real time PCR denemeleri ile tespit edilmiştir. Real-time PCR denemeleri farklı zamanlarda, farklı cDNA'lar kullanılarak ve her denemede en az üç replikalı olmak üzere tekrarlanmıştır. Sonuç olarak, Şekil 11'de görüldüğü gibi ilgili genlerin eksikliğinde *ATR1* ifadenmelerinde beklenildiği gibi bir azalış gözlenmemiştir. Söz konusu transkripsiyon faktörleri *GCN4*'ün promotor bölgesine bağlanarak transkripsiyonunu

aktifleştirmek ya da baskılamak suretiyle işlev göstermektedir. *MGA1*, *STP1*, *GLN3*, *YAP1*, *FLO8* genlerinin delesyon mutantlarında Gcn4 seviyelerinin azalması, bu transkripsiyon faktörlerinin Gcn4'ü aktive edebileceklerini düşündürmektedir. Ancak bu genler Gcn4'ün regülasyonunda rol almanın yanı sıra hücre içerisinde farklı yollarda da rol almaktadırlar. Örneğin *STP1* geninin delesyonunda meydana gelen amino asit alınımadaki azalış *GCN4*'den bağımsız olarak gerçekleşmektedir (Jorgensen vd., 1997). Dolayısıyla ilgili genlerin delesyonu hücre içerisindeki farklı mekanizmaları da etkileyebileceğinden *ATR1* ifadenin seviyelerinde beklenildiği gibi doğrudan ve *GCN4* bağımlı bir azalış görülmemiş olabilir.



Şekil 11. Yabani tip, *GCN4*-transkripsiyon faktör mutantlarında *ATR1* mRNA ifadenin seviyeleri. *ACT1* ve *ATR1* mRNA'larına ait Ct değerleri esas alınarak normalizasyon yapılmıştır.

4.8. TOR kinaz yolağının bor stresi ile ilişkisinin araştırılması

Bor stresinin hücre içi sinyal iletimi üzerindeki etkilerini açığa çıkarmak için muhtemel sinyal yollarından öncelikle Tor1 kinaz yolağına yoğunlaşmıştır. TOR'un; rapamisin adlı ilacın etkilediği bir hedef molekül olduğu bilinmektedir. Rapamisin ise organ transplantasyonu ve bazı kanser türlerinde kullanılan immünosupresif bir ilaçtır. TOR, esansiyel bir serin/treyonin kinazdır. Yapısı ve fonksiyonu ökaryotlar arasında korunmuştur, Tor1 ve Tor2 olmak üzere iki kompleksten meydana gelmektedir. Tor1 rapamisin tarafından inhibe olmaktadır ve hücre büyümesi ve metabolizması için önemli düzenleyici rolleri vardır. Tor2 ise rapamisin tarafından inhibe olmamaktadır ve hücre polaritesinin regülasyonundan sorumludur (Virgilio

ve Loewith, 2006; Loewith ve Hall, 2011). TOR sinyal yolağının özellikle besin kıtlığı ve çevresel stres koşullarında gen ifadenmelerinin düzenlenmesinden sorumlu olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda, mRNA'nın 40S ribozomal alt birimine bağlanmasını indükleyen faktörlerden biri olan eIF4F miktarını arttırarak translasyonun başlamasına yardımcı olmaktadır. Ek olarak, translasyonun başlangıç aşamasında eIF4F faktörünün oluşması için gerekli olan eIF4E faktörüne bağlı halde bulunan 4E-BP proteinlerinin fosfatlanmasını sağlayarak eIF4E'nin serbest kalmasını sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarla, TOR yolağının, translasyonun başlangıç aşamasında eIF2 α 'nın GCN2 tarafından fosfatlanmasını azaltarak da etkilediği bulunmuştur (Cherkasova, 2003).

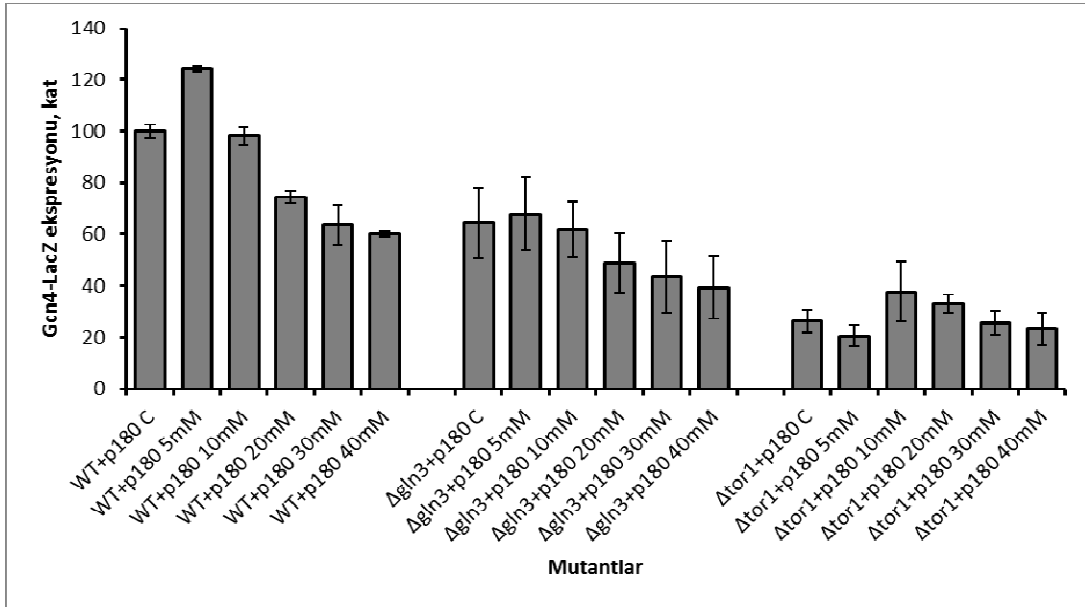
GCN2 protein kinazı amino asit kıtlığında eIF2 α 'yı fosfatlayarak GCN4'ün translasyonunu sağlamaktadır. GCN2'nin kinaz olarak aktivasyonu yüksüz tRNA'ların, GCN2'deki histidil tRNA sentetaz bölgesine bağlanmasını gerektirmektedir. Aynı zamanda GCN2'deki Ser577'nin fosfatlanması tRNA'ların bağlanma afinitesini düşürerek GCN2 fonksiyonunu inhibe etmektedir. Rapamisin'in Tor yolağını baskılayarak, Ser577'nin fosfatlanmasını azaltarak Gcn2 aktivasyonunu ve dolaylı olarak da Gcn4 aktivasyonunu sağladığı daha önceden gösterilmiştir (Cherkasova ve Hinnebusch, 2003). Görüldüğü gibi Tor yolağıyla ilgili mekanizmalar translasyon başlangıcına işaret etmektedir ve bor toksisitesinde de Gcn2'nin bor ile aktive olduğu Gcn4'ü aktive ettiği ve protein sentezinin inhibe olduğu bilinmektedir (Uluişik vd., 2011b). Dolayısıyla Tor yolağı ve bor stresi arasında biri ilişki olabilir.

Eğer maya hücreleri sınırlı azot kaynağına sahip olursa, bu bileşiklerin katabolizmasından sorumlu enzimleri kodlayan genler yüksek oranlarda ifadenmektedir. Bu olayın regülasyonundan ise Gln3 ve Gat1 adı verilen transkripsiyon faktörleri sorumludur. Mayadaki Tor yolağı aynı zamanda sınırlı azot kaynaklarının katabolizmasında rol alan genlerin regülasyonunda da rol oynamaktadır. Gln3'ün, sitoplazmik bir protein olan Ure2 ile etkileşerek nükleus dışına çıkmasına neden olmakta ve böylelikle transkripsiyonel aktivasyonu engellemektedir (Valenzuela vd., 2001). Bunun yanı sıra Tor proteinleri, yine Tor yolağında bulunan bir protein fosfatazı olan *SIT4*'ün, *TAP42* ile etkileşime girmesini sağlayarak inaktive etmektedir. Bu olay *GLN3*'ün inaktivasyonuna sebep olmakta ve azot katabolizması genlerinin ifadenmeleri baskılanmaktadır. Rapamisin ise bu etkiyi tersine çevirmekte ve TOR'u baskılayarak *TAP42/SIT4* kompleksinin ayrılmasına sebep olmakta ve *GLN3* aktivasyonunu sağlamaktadır (Cherkasova ve Hinnebusch, 2003).

Gcn4'ün hedef genlerinden bazılarının hem *GCN4* hem de *GLN3*'ün yer aldığı ikili bir regülasyona tabi olduğu göz önünde bulundurulacak olursa; başlangıç aşaması için Tor yolağında ana rolleri olan *tor1 Δ* ve *gln3 Δ* mutantları ile çalışılmak istenmiştir. Bu amaçla

öncelikle ilgili mutantlara pGCN4-lacZ plazmit transformasyonu yapılmış; bor varlığında ve yokluğunda Gcn4-lacZ değişimi β -galaktozidaz denemesi ile gösterilmiştir (Şekil 12).

Elde edilen sonuçlara göre kontrol grubundaki hücrelerde (borik asit muamelesi görmeyen) ifade edilen Gcn4-lacZ miktarları yabani tip hücrelere göre daha düşüktür. İlgili genlerin, GAAC yolağının üzerinde etkileri olduğu bilindiğinden, bu genlerin delesyonunun Gcn4-lacZ ifadenmesini azaltması beklenen bir sonuçtur. 5 mM ve 10 mM borik asit dışında uygulanan konsantrasyonlarda Gcn4-lacZ ifadenmesinde genel olarak bir düşüş gözlenmektedir. Her iki gen de hücre metabolizması için önemli regülatör görevler üstlenmiştir. Dolayısıyla bu genlerin delesyonu, hücrede farklı moleküllerin etkileşime girmesine ve farklı yolların aktifleşmesine sebep olabilir.

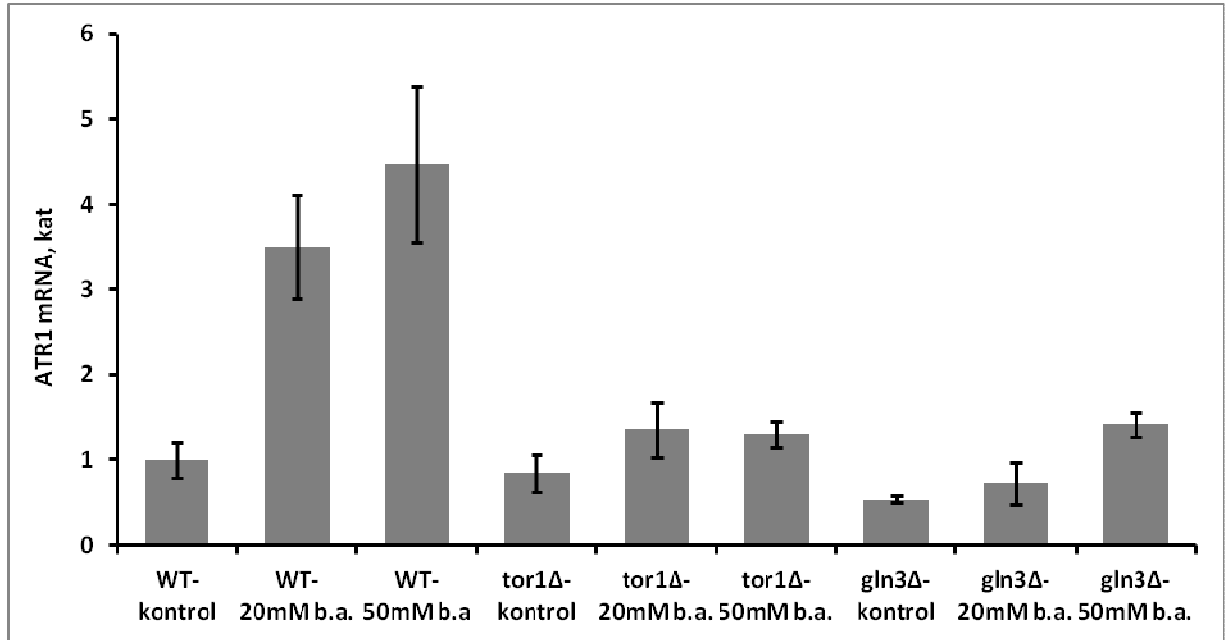


Şekil 12. p180 plazmiti taşıyan ve farklı konsantrasyonlarda borik asit ile muamele edilmiş yabani tip, *gln3* Δ ve *tor1* Δ mutantlarındaki Gcn4-lacZ değişimleri. Deneme en az üç kez tekrarlanmış ve her bir denemede mutant ve yabani tip maya hücrelerinden en az üç replika kullanılmıştır. Normalizasyon, borik asit muamelesi görmemiş yabani tip maya hücrelerine göre yapılmıştır. Denemede kullanılan borik asit konsantrasyonları 5mM, 10mM, 20mM, 30mM ve 40mM'dir. C, borik asit muamelesi görmemiş kontrol grubu anlamına gelmektedir.

TOR yolağı ile alakalı olan Gln3 azot katabolit represyon (NCR) metabolizmasında rol alan genleri kontrol eden bir transkripsiyonel aktivatördür. Eğer ortamda azot kısıtlaması mevcutsa Gln3 nükleusa gitmekte ve NCR genlerinin aktivasyonunu sağlamaktadır. Eğer ortamda herhangi bir azot kısıtlaması yoksa Gln3 fosfatlanarak sitoplazmada lokalize olmaktadır ve NCR genlerinin ifadenmeleri minimum seviyelere düşmektedir. Gln3 farklı kinazlar tarafından fosfatlanabilmektedir. Bu kinazlar arasında Tor kinazları ilk sırayı

almaktadır (Beck ve Hall, 1999). Snf1'in da Gln3 regülasyonunda rol aldığı bilinmektedir (Bertram vd., 2002). *TOR2* geni esansiyel olduğu için, bizim çalışmamızda *tor1Δ* mutanları üzerinde durulmuştur. Aynı zamanda Gln3'ün de Gcn4 regülasyonunda rolleri olduğu bilinmektedir. Eğer bu genler bor stresinde, Gcn4 regülasyonu ya da Gcn4 üzerinden *Atr1* regülasyonunda rol oynuyorlarsa, ilgili genlere ait mutant hücrelerde *ATR1* mRNA transkript seviyelerinin düşük olması beklenmektedir. Şekil 13'de görüldüğü gibi *tor1Δ* ve *gln3Δ* mutantlarında *ATR1* ifadenmesi düşüktür. Bir saatlik 20mM ve 50mM borik asit uygulamasından sonra ise *ATR1* ifadenmesi bor uygulanmamış kontrol gruplarına göre artsa da yabancı tip hücrelere göre oldukça azdır. Bu da, hücre metabolizmasında önemli roller üstlenen bu iki genin bor stresinde de aktif roller aldığını göstermektedir.

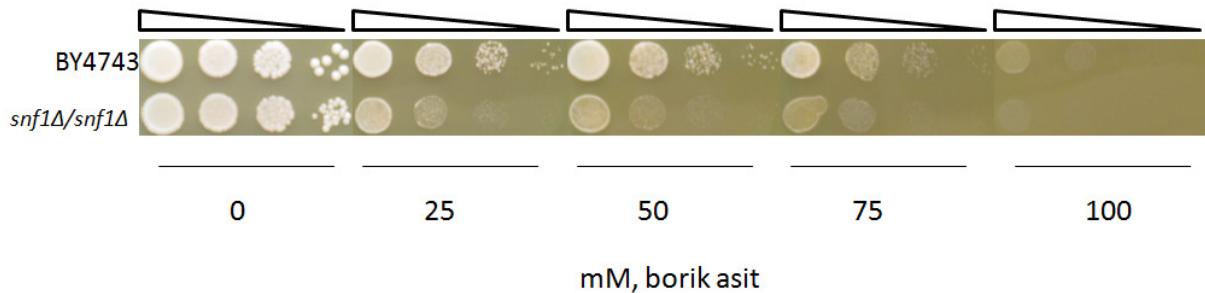
ATR1 mRNA ekspresyon seviyeleri real time PCR metodu kullanılarak incelenmiştir. Denemenin detayları gereç ve yöntem kısmında anlatıldığı gibidir. Zenginleştirici besiyerlerinde büyütülen yabancı tip, *tor1Δ* ve *gln3Δ* mutant hücreleri logaritmik büyüme fazındayken üçe ayrılmış, bir grup bor ile muamele edilmemiş ve kontrol grubu olarak kullanılmış, bir grup bir saat 20mM borik asit ile muamele edilmiş ve diğer grup da bir saat 50 mM borik asit ile muamele edilmiştir. Bu hücrelerden elde edilen toplam RNA'lar kullanılarak real time PCR denemeleri gerçekleştirilmiştir. Denemeler farklı zamanlarda, farklı cDNA'lar kullanılarak ve her denemede en az 3 replikalı olmak üzere tekrarlanmıştır.



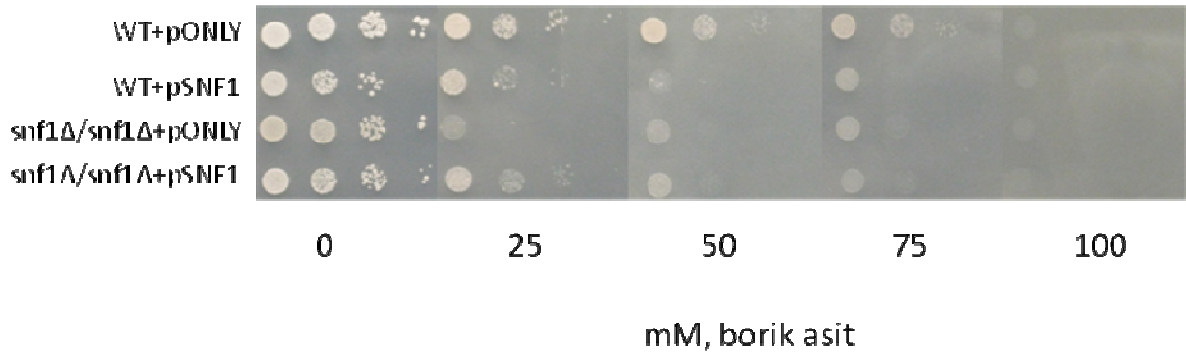
Şekil 13. Borik asit ile muamele edilen ve edilmeyen yabancı tip, *TOR1* ve *GLN3* mutantlarında *ATR1* mRNA ifadenme seviyeleri. *ACT1* ve *ATR1* mRNA'larına ait Ct değerleri esas alınarak normalizasyon yapılmıştır. (b.a. = borik asit)

4.9. SNF1 yolağının bor stresi ile ilişkisinin araştırılması

Snf1, bir protein kinazdır ve sitoplazmik glukoz sensörü olarak adlandırılmaktadır. Ortamdaki fazla glukoz varlığında; diğer karbon kaynaklarının taşınmasında ya da kullanılmasında rol alan genlerin ifadelenmeleri baskılanmaktadır. Buna glukoz represyonu adı verilmektedir (Carlson, 1999). Snf1, glukoz seviyeleri düşük olduğunda aktive olmaktadır ve glukoneogenezi indükleyerek alternatif karbon kaynaklarının kullanılmasını sağlamaktadır. Ortamdaki glukoz seviyelerinin, Snf1'in eşlik ettiği bir yolak ile Gln3 transkripsiyon faktörünün aktivitesini etkilediği gösterilmiştir (Bertram vd., 2002). Gcn4 transkripsiyon faktörünün de Gln3 tarafından aktive edilebildiği bilinmektedir (Lee vd., 2002; Harbison vd., 2004). Gcn4'ün indirekt olarak aktivasyonundan sorumlu potansiyel mekanizmalardan biri Gln3'ün glukoz kıtlığı koşullarında Snf1 kinaz tarafından aktifleştirilmesidir. Yapılan bir başka çalışmayla ise Snf1 delesyonunun Gcn4 protein seviyelerini arttırdığı, bunun da *GCN4* translasyonunun regülatörlerinden Gcn2 ve Gcn20 aktivitesini gerektirdiği gösterilmiştir. Snf1'in *S.cerevisiae*'de *GCN4* translasyonunun kontrolünü Gcn20 den daha önce fonksiyon göstererek gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Shirra vd., 2008). Snf1 kinazının bor stres yanıt yolağında rol alıp almadığını anlamak için *SNF1* geninin delesyonunun ve aşırı ifadelenmesinin hücrelerde Gcn4-lacZ ve *ATR1* mRNA seviyeleri üzerine yaptığı etkiler araştırılmak istenmiştir. Bu amaçla öncelikle *SNF1* geni Gateway klonlama sistemi kullanılarak klonlanmıştır. Klonlamadan sonra *SNF1* genini içeren plazmitler yabani tip maya hücrelerine ve *snf1Δ* mutantına transforme edilmiştir. Bu şekilde *SNF1* geninin aşırı ifadelendiği yabani tip mayanın ve komplemente edildiği *snf1Δ* mutantının bor dirençlilikleri farklı konsantrasyonlarda borik asit içeren seçici besiyerlerinde spotlama deneyleriyle gösterilmiştir. Aynı zamanda *snf1Δ* mutantının borik asit toleransı da farklı konsantrasyonda borik asit içeren zenginleştirici YPD besiyerlerinde ekimler yapılarak belirlenmiştir (Şekil 14). *snf1Δ* mutantı borik asite karşı hassasiyet göstermektedir. Şekil 3'de görüldüğü gibi yabani tip maya hücreleri 75 mM borik asit varlığında büyüyebilirken *snf1Δ* mutantının büyümesi önemli ölçüde zayıflamıştır. Şekil 15'de görüldüğü gibi *SNF1* geninin aşırı ifadelenmesi ve *snf1Δ* mutantında komplemente edilmesi bir fark ortaya koymamıştır.

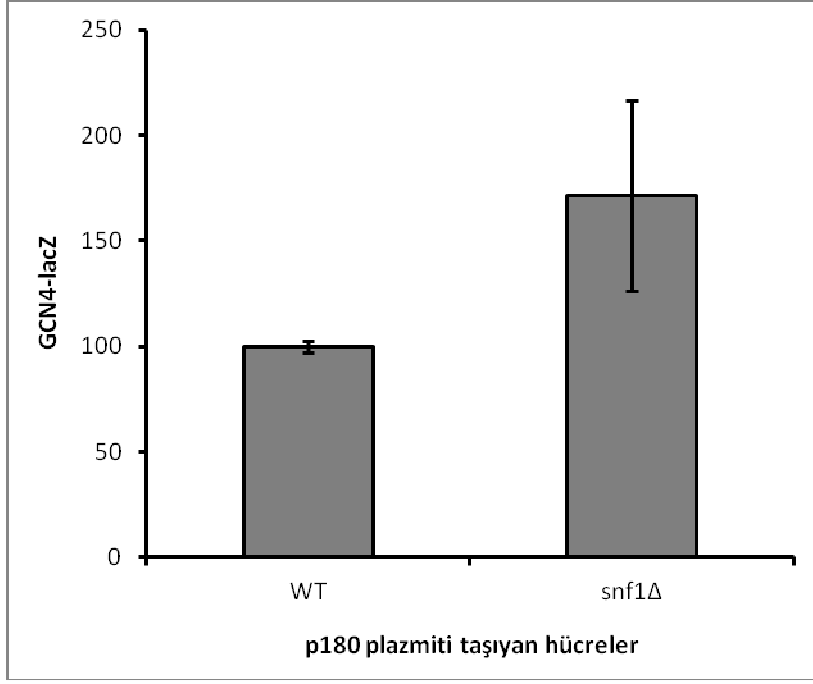


Şekil 14. *snf1Δ* mutantının borik asit toleransı

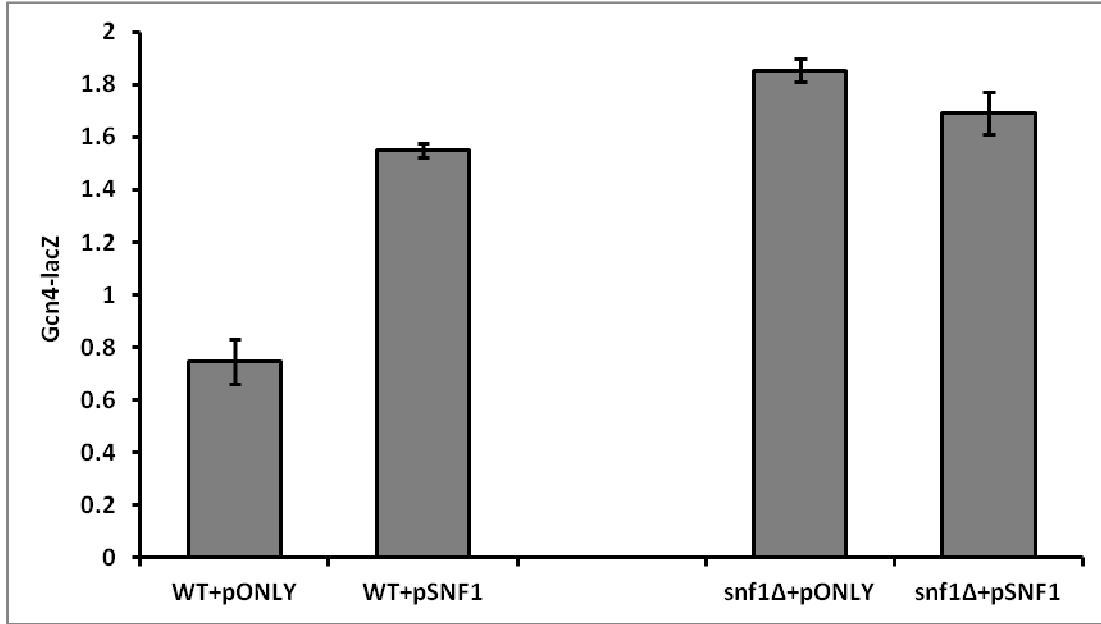


Şekil 15. *SNF1* geninin aşırı ifadelmesi ve komplementasyonunun borik asit toleransına etkisi

SNF1 ile ilgili mevcut veriler değerlendirildiğinde bu genin bor stres yolağında rol alması muhtemeldir. *SNF1* geninin delesyonunun ve aşırı ifade edilmesinin hücrelerde Gcn4-lacZ aktivitesine etkileri β -galaktozidaz denemeleri ile belirlenmiştir (Şekil 16 ve Şekil 17). *SNF1* genini yabancı tip hücrelerde ve *snf1Δ* mutantında aşırı ifade etmek ve Gcn4 ekspresyon seviyelerini incelemek için ilgili hücreler öncelikle boş plazmit ile ya da *SNF1* genini taşıyan plazmitler ile transforme edilmiş, elde edilen transformantlar büyütülerek ardından GCN4-lacZ plazmiti ile yeniden transforme edilmiştir. Taşıdıkları plazmidlerin içeriğine göre hem urasil hem de histidin amino asiti içermeyen besiyerlerinde seçilen transformantar ile β -galaktozidaz denemeleri gerçekleştirilmiştir. Görüldüğü gibi *SNF1* geninin eksikliğinde Gcn4'ün ifadelmesi yabancı tiptekine göre artmaktadır. Genin yabancı tip hücrelerde ve *snf1Δ* mutantında aşırı ifadelmesi de Gcn4 seviyelerini arttırmıştır (Şekil 17). Buna dayanarak *SNF1*'in Gcn4 ifadelmesinin düzenlenmesinde rol aldığı düşünülebilir.



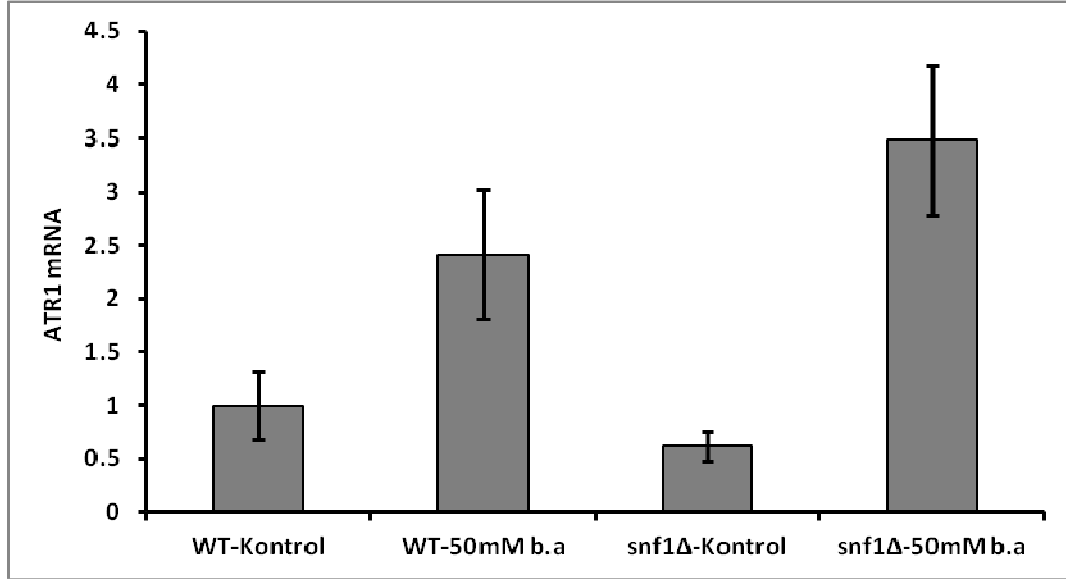
Şekil 16. p180 plazmiti taşıyan yabani tip ve $\Delta snf1$ mutantındaki Gcn4-lacZ değişimleri



Şekil 17. *SNF1* geninin aşırı ifadelendiği yabani tip ve *snf1Δ* mutant hücrelerindeki Gcn4-lacZ ifadenme seviyeleri. Kontrol grubu olarak boş plazmit taşıyan yabani tip ve *snf1Δ* mutantı kullanılmıştır.

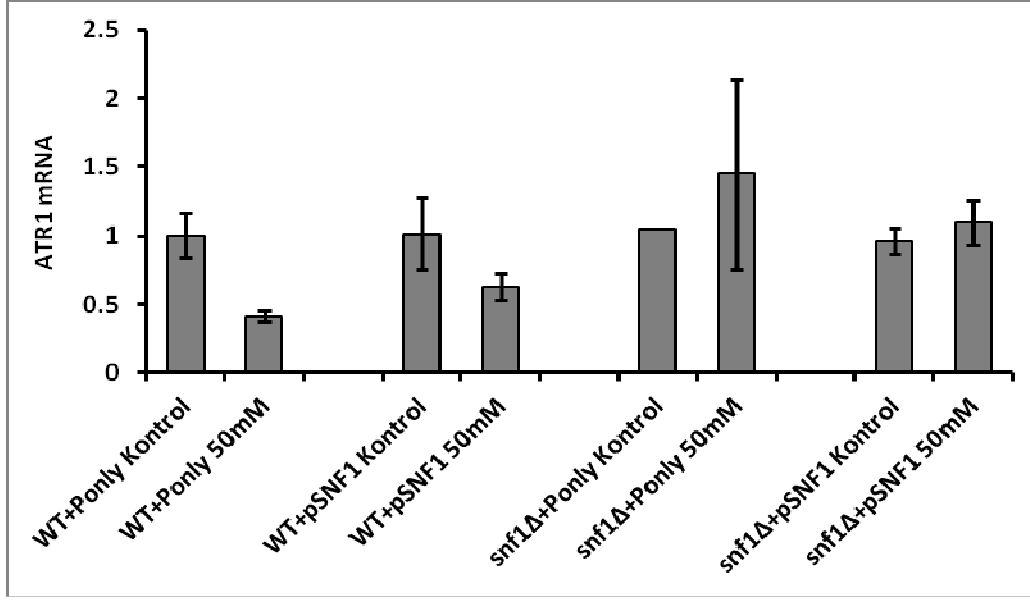
Aynı zamanda, *SNF1* geninin aşırı ifade edildiği yabani tip hücreler ve komplementasyon yapılan *snf1Δ* hücreleri kullanılarak bor varlığında ve yokluğunda *ATR1* ifadenme seviyeleri real time PCR denemeleri ile belirlenmiştir. Şekil 18'de görüldüğü gibi *snf1Δ* mutantında

ATR1 ifadenmesi yabani tip hücelere göre düşük iken bor muamelesiyle genin ifadenmesi kontrole oranla yaklaşık beş kat artmıştır.



Şekil 18. Yabani tip ve *snf1Δ* hücelerinde *ATR1* mRNA'sının real time PCR analizleri. Hüceler 50mM borik asit ile bir saat muamele edilmiştir, kontrol grubu hücelerine borik asit uygulanmamıştır. Maya aktin geni deneysel kontrol olarak kullanılmıştır. *ACT1* ve *ATR1* mRNA'larına ait Ct değerleri esas alınarak normalizasyon yapılmıştır.

SNF1 geni klonlanarak yabani tip ve *snf1Δ* mutantlarında ektradan ifadenmesi sağlanmıştır. Elde edilen transformantlar ile gerçekleştirilen ve *ATR1* ifadenme seviyelerinin incelendiği real time PCR denemelerine göre *SNF1* geninin aşırı ifadenmesinin yabani tip ve *snf1Δ* hücelerindeki *ATR1* mRNA ekspresyonunu önemli ölçüde etkilemediği gözlenmiştir (Şekil 19).

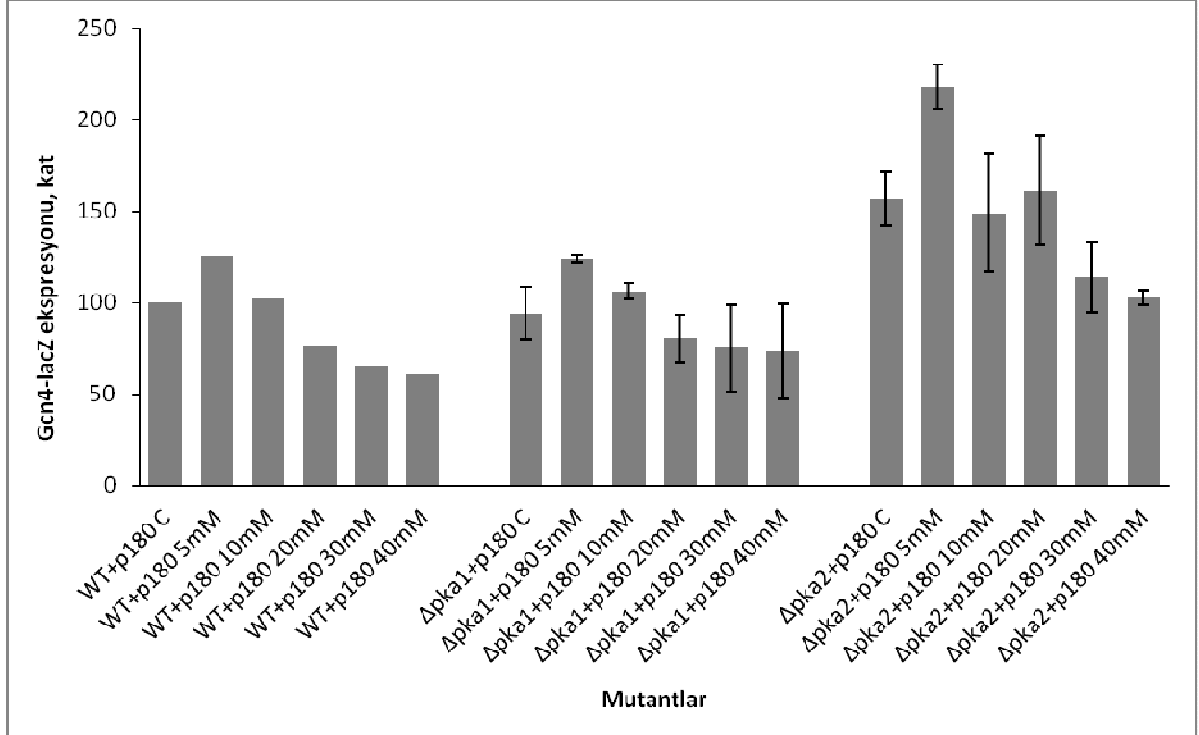


Şekil 19. *SNF1* geninin aşırı ifadelendiği yabani tip ve *snf1Δ* mutantındaki *ATR1* mRNA'sının real time PCR analizleri. Maya aktin geni deneysel kontrol olarak kullanılmıştır. *ACT1* ve *ATR1* mRNA'larına ait Ct değerleri esas alınarak normalizasyon yapılmıştır.

4.10. PKA yolağının bor stresi ile ilişkisinin araştırılması

S.cerevisiae'de cAMP/PKA yolağı glikoz sinyal yolağında rol alır ve strese dayanıklılık, glikoliz glikoneogenez gibi olayların düzenlenmesinden sorumludur. *PKA* normalde hücrede, iki tane düzenleyici iki tane de katalitik alt birimlere sahip olan inaktif bir tetramer olarak bulunmaktadır. Glikoz seviyeleri gibi hücre dışından gelen sinyaller ile adenilil siklaz aktive edilir, cAMP seviyeleri artar ve cAMP'nin *PKA*'nın düzenleyici alt birimlerine bağlanmasıyla konformasyonel bir değişiklik meydana gelmekte ve *PKA*'nın katalitik alt birimleri aktif hale dönüşmektedir (Zurita-Martinez ve Cardinas, 2005). Pka1 ve Pka2, *PKA* yolağında cAMP bağımlı protein kinaz katalitik alt birimleridir. Mayada UV stresinin *PKA* sinyali üzerinden Gcn4'ün transkripsiyon ve translasyonunu indüklediği ve Gcn4 hedef genlerinin aktivasyonunu sağladığı gösterilmiştir. *GCN4* translasyonundaki artışın, daha önce bilinen ve Gcn2 protein kinazını içeren yoldan bağımsız olarak gerçekleştiği öne sürülmüştür. Aynı zamanda bu mekanizmanın DNA hasar mekanizmasından farklı olarak işlediği belirtilmiştir (Engelberg vd., 1994). Bu yolağın bor varlığında Gcn4'ü aktive etmesi ihtimalini incelemek için bor muamelesine maruz bırakılmış *pka1Δ* ve *pka2Δ* mutantlarında Gcn4-lacZ aktivite değişimleri β-galaktozidaz denemeleri ile gösterilmiştir. *pka1Δ* ve *pka2Δ* mutantlarına pGCN4-lacZ (p180) plazmiti transforme edilmiştir. YNB-Ura seçici besiyerlerinde büyüeyebilen transformantlar seçilip β-galaktozidaz denemelerinde kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak da aynı şekilde bor muamelesi görmüş yabani tip maya hücreleri kullanılmıştır. Denemeler an az

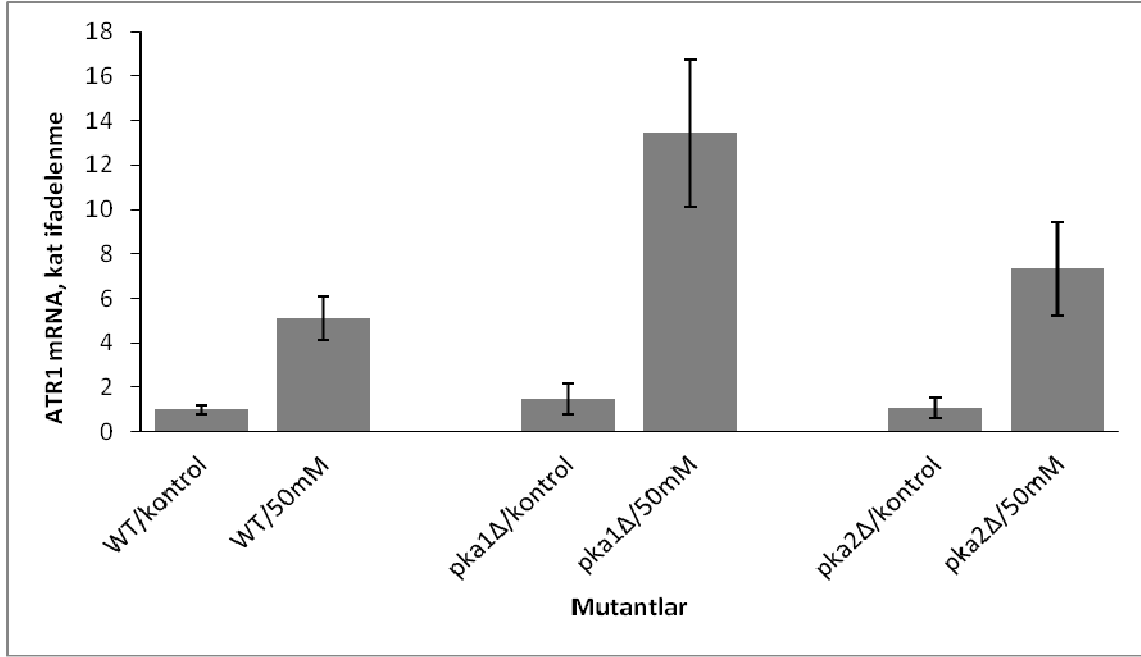
üç kez tekrarlanmıştır ve her denemede transformantlardan en az üç replika kullanılmıştır. Normalizasyon, borik asit muamelesi görmemiş yabancı tip maya hücrelerine göre yapılmıştır.



Şekil 20. p180 plazmiti taşıyan ve farklı konsantrasyonlarda borik asit ile muamele edilmiş yabancı tip, $\Delta pka1$ ve $\Delta pka2$ mutantlarındaki Gcn4-lacZ değişimleri. Denemede kullanılan borik asit konsantrasyonları 5mM, 10mM, 20mM, 30mM ve 40mM'dir. C, borik asit muamelesi görmemiş kontrol grubu anlamına gelmektedir.

Şekil 20'de gösterildiği gibi borik asit muamelesi görmeyen yabancı tip, $pka1\Delta$ ve $pka2\Delta$ kontrol grubu hücreleri karşılaştırıldığında; Gcn4-lacZ ekspresyonu $pka1\Delta$ hücrelerinde değişmemiş ve $pka2\Delta$ hücrelerinde ise yaklaşık %50 oranında artış göstermiştir. Borik asit muamelesiyle değişen yabancı tip benzeri ifadenme profilleri grafikte görülmektedir. UV stresinde aktifleşen bir yolak eğer benzer bir şekilde bor stresinde de aktifleşiyorsa PKA'ların pozitif regülasyonlarının sağlanması ve Gcn4'ün ifadenmesinin indüklenmesi beklenen sonuçlar arasındadır. Yolaktaki PKA genlerinin delesyonunun ise Gcn4 ifadenmesini azaltması beklenebilir. Ancak yapılan β -galaktozidaz denemelerimize göre Gcn4 ifadenmesinde keskin bir azalma gözlenmemiştir. *ATR1*, bor stresinde aktive olan Gcn4'ün hedef genlerinden biridir. Ras/cAMP (PKA) yolağının bor stresi ve Gcn4 üzerindeki etkilerinin araştırılması kapsamında $pka1\Delta$ ve $pka2\Delta$ mutantlarında *ATR1* mRNA ifadenmeleri real time PCR analizleri ile tespit edilmiştir. Real-time PCR denemeleri farklı zamanlarda, farklı cDNA'lar kullanılarak ve her denemede en az üç tekrarlı olmak üzere yapılmıştır. Sonuç

olarak, bor muamelesi görmemiş kontrol grubu hücrelerde *ATR1* ifadenmesi yaklaşık olarak birbirinin aynıken bor muamelesi sonucunda *pka1Δ* mutantında 13 kata yakın ve *pka2Δ* mutantında 7 kata yakın bir artış görülmüştür (Şekil 21). Bu durumda maya *PKA*'lerinin bor stresinde Gcn4'e bağımlı ya da bağımsız Atr1 üzerinde düzenleyici bir rolleri olduğu düşünülebilir. Fakat mevcut veriler ışığında bu roller tahmin edilenden farklılık göstermektedir.



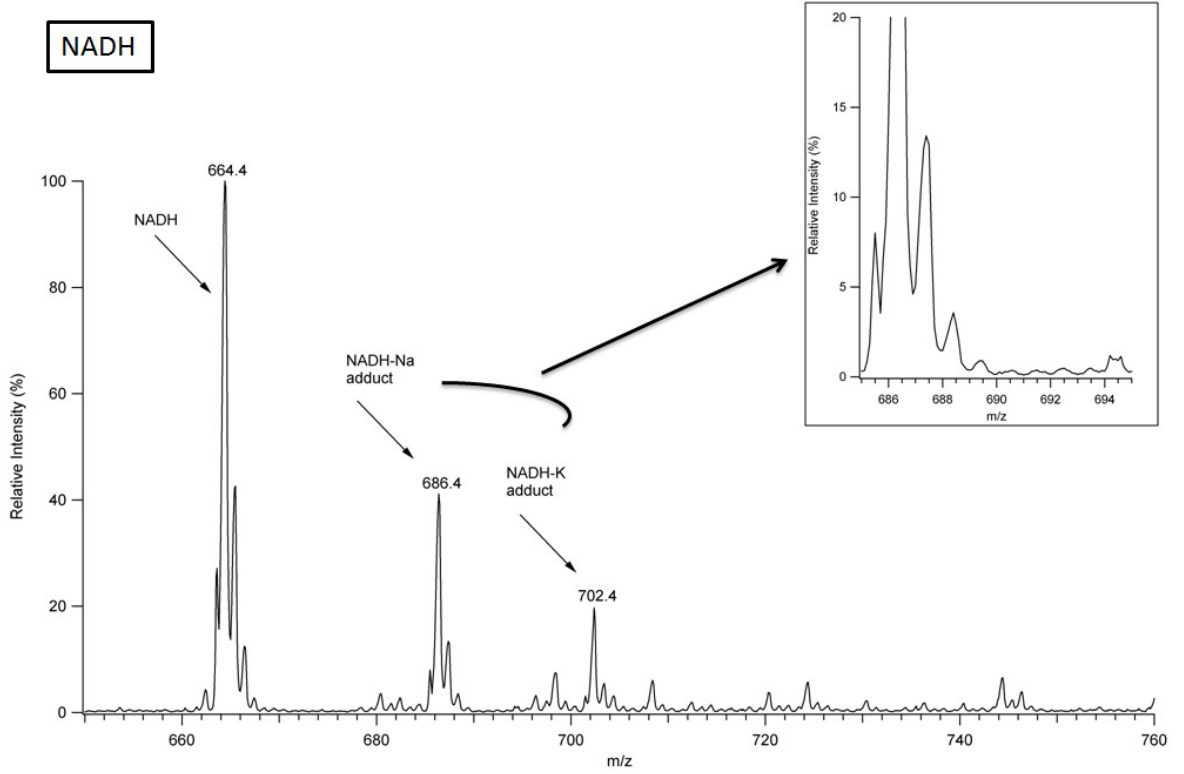
Şekil 21. Yabani tip, *pka1Δ*, *pka2Δ* mutantlarında *ATR1* mRNA ifadelenme seviyeleri. *ACT1* ve *ATR1* mRNA'larına ait Ct değerleri esas alınarak normalizasyon yapılmıştır.

4.11. Borun hücrelerde yüksüz (amino asitsiz) tRNA sinyali oluşturma mekanizmasının kütle spektrometresi ile araştırılması

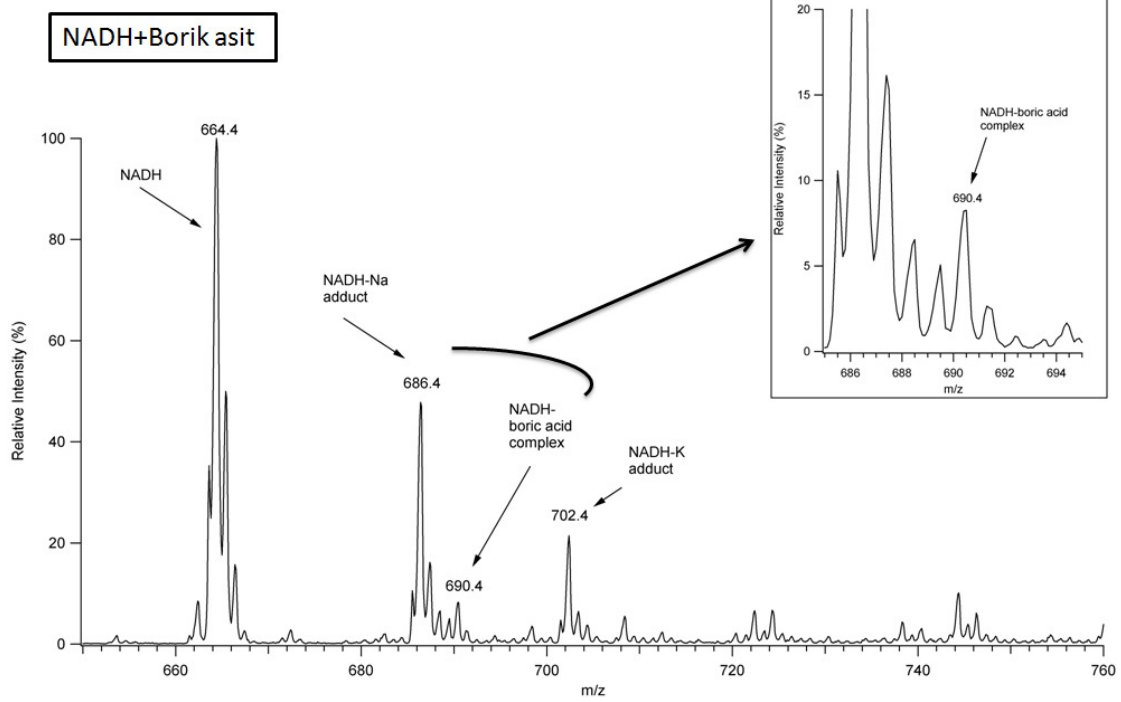
Borik asitin yüksüz tRNA sinyali oluşturarak Gcn2 kinazını aktive ettiği bilinmektedir ancak bu sinyalin nasıl oluşturulduğu bilinmemektedir (Uluisik vd., 2011b). Borun, cis-diol grubu içeren bileşiklere karşı afinitesi olduğunu ileri sürülmektedir. Nükleotitler; riboz cis-diol grubu içeren metabolik olarak önemli ve oldukça yaygın olarak bulunan moleküllerdir. Borik asitin riboz şekerine ester bağı ile bağlandığı gösterilmiştir (Reid vd., 2004). tRNA'lar üzerindeki cis-diol içeren kısım ise amino asitlerin bağlandığı akseptör uçtaki ribozun 2' ve 3' OH gruplarıdır. Borik asit, tRNA'lardaki bu gruplara bağlanarak amino asitlerin bağlanmasını engelleyebilir. Bu hipotezi test etmek için tRNA'lara borik asit bağlandığında oluşacak kütle değişiminin, kütle spektrometresi analizi ile bulunması öngörülmüştür. 2004 yılında yapılmış bir çalışma ile farklı borat-nükleotit kompleks oluşumlarının temel karakteristikleri ortaya çıkarılmıştır

(Kim vd., 2004). Bu makaledeki bilgiler göz önünde bulundurularak öncelikle bir dinükleotit olan NADH ve borik asit kompleksleri kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. Şekil 22'de NADH'e ait elektrosprey iyonizasyon (ESI) kütle spektrumları görülmektedir. NADH (Şekil 22A) ve NADH-borik asit karışımına (Şekil 22B) ait spektrumlar karşılaştırıldığında; Şekil 22A'da 664'de NADH'e ait bir sinyal, 686 ve 702'de ise sırasıyla NADH-Na ve NADH-K bileşiklerine ait sinyaller görülmektedir. Şekil 22B'de ise bu sinyallere ek olarak 690 civarında NADH-Borik asit kompleksine ait bir sinyal açıkça görülmektedir. Böylelikle *Kim et al.*'un verileri analizlerimizle doğrulanmıştır (Kim vd., 2004). Bu; aynı zamanda kullandığımız kimyasalların, yöntemin ve kütle spektrometresinin etkin bir şekilde çalışır halde olduğunu göstermesi açısından önemlidir.

A)



B)



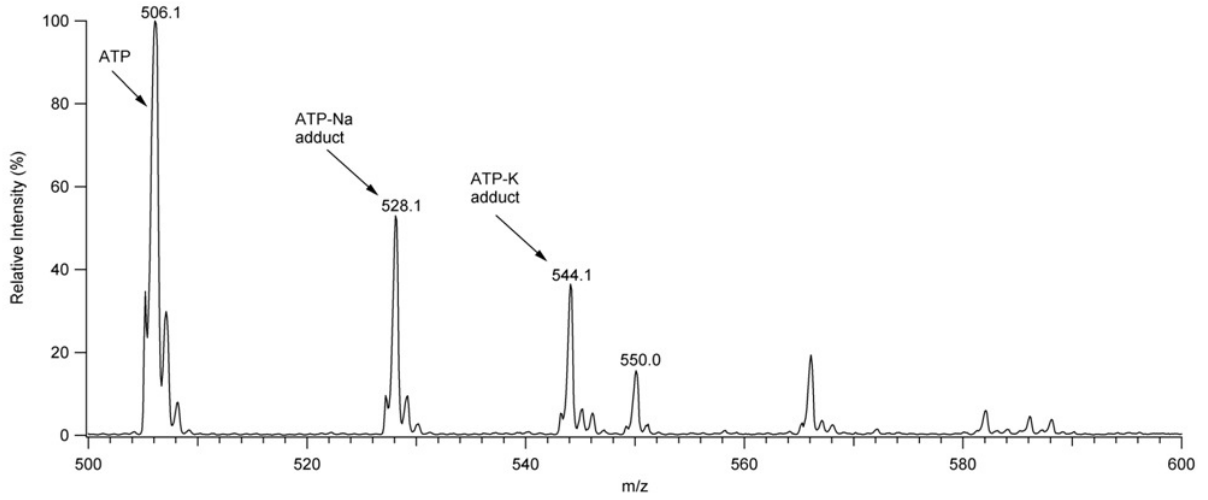
Şekil 22. A) NADH'in negatif iyon ESI kütle spektrumu. B) NADH+Borik asit karışımının negatif iyon ESI kütle spektrumu.

Borik asitin adenin nükleotitleri ile oluşturduğu kompleksin ESI kütle spektrometresi analizi için ATP ya da ATP ve borik asit karışımı kullanılmıştır. Şekil 23'deki spektrumlarda ATP, ATP-Na ve ATP-K bileşiklerine ait sinyaller rahatlıkla gözlenebilmektedir. Ancak borik asit-ATP kompleksinin yarattığı ilave bir sinyal gözlenememiştir (Şekil 23B). *Kim et al.* borik asit-AMP ve borik asit-ADP komplekslerine ait sinyalleri net olarak gözleyebilirken, borik asit-ATP kompleksine ait bir sinyal gözleyememiştir. Nükleotit üzerindeki fosfat gruplarının borik asit ve nükleotitler arasındaki kompleks oluşumunu etkilediği böylelikle doğrulanmıştır (Kim vd., 2004). Dolayısıyla sonuçlarımız söz konusu makalenin verilerini doğrular niteliktedir. Zaman faktörünün denemede etkili olup olmadığını anlamak için ATP ve borik asit karıştırılıp bir saat inkübasyona bırakılmıştır. Ancak bir saat inkübasyon sonucu alınan spektrumda da ATP-borik asit kompleksine ait bir sinyal gözlenememiştir. Bu denemelerden sonra borik asitin tRNA'lara bağlanarak bir kompleks oluşturup oluşturmadığını açığa çıkarmak için ticari olarak satın alınan maya tRNA'larının karışımını içeren örnek ESI kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. Solvent ve tRNA karışımına ait kütle spektrumu Şekil 24'de görülmektedir. Ancak Şekil 24B'de görülen spektrum oldukça karışık bir spektrumdur ve doğru kütle hesaplaması yapılmasına izin vermemektedir. Oligonükleotitler kütle spektrometresinde daha iyi gözlenebilmesine rağmen moleküldeki zincir uzunluğu ya da moleküler ağırlık arttıkça keskin sinyaller alınmakta zorlanılmaktadır. Bunun yanı sıra oligonükleotitlerin ve nükleik asitlerin kütle spektrometresinde analizleri katyon bileşikler problemi yüzünden engellenmektedir. Bu

da bu moleküllerin yapısındaki yüksek polarite gösteren fosfodiester iskeletinden kaynaklanmaktadır. Nükleik asitlere ait kaliteli bir kütle spektrumu elde etmek için bu katyon bileşiklerinin ortamdaki uzaklaştırılması gerekmektedir. Katyon bileşenlerinin eliminasyonu için değişik metotlar geliştirilmiştir. Amonyum asetat ile çöktürme metodu bunlardan bir tanesidir (Limbach vd., 1994).

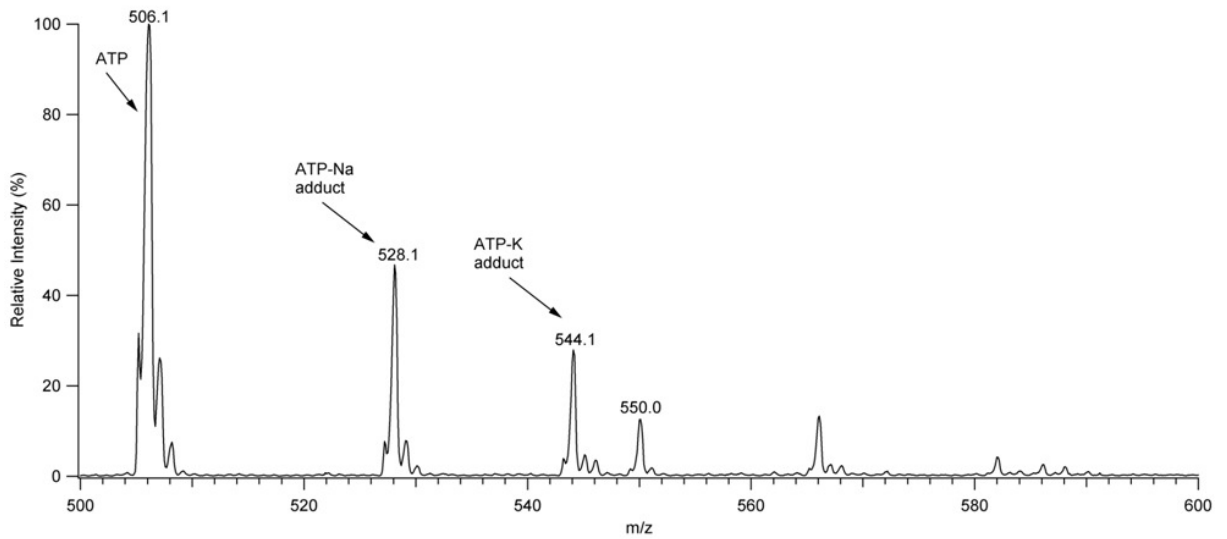
A)

ATP



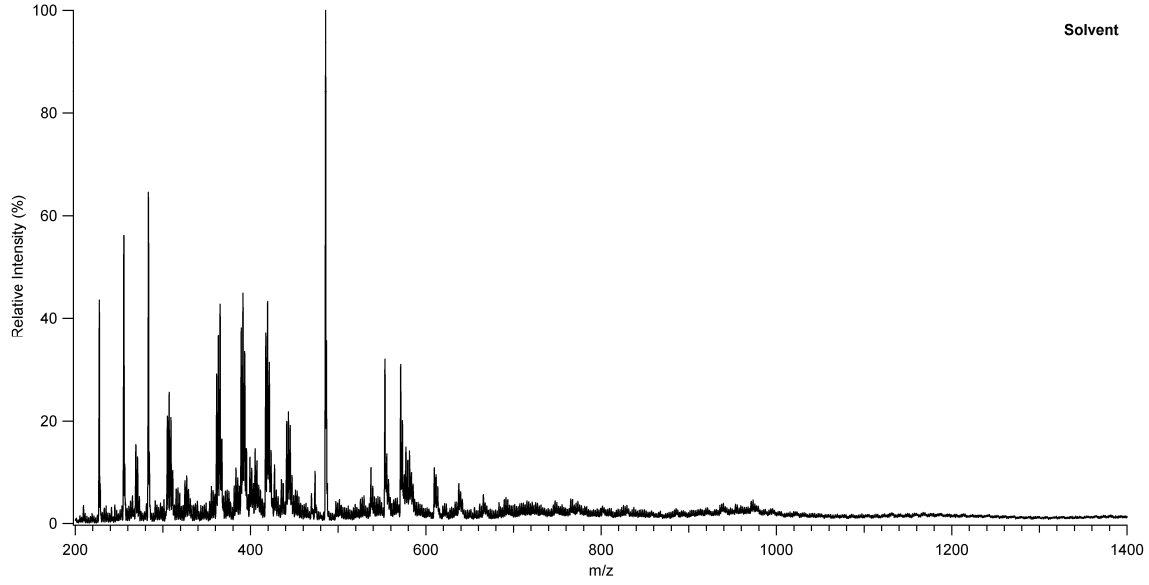
B)

ATP+Borik asit

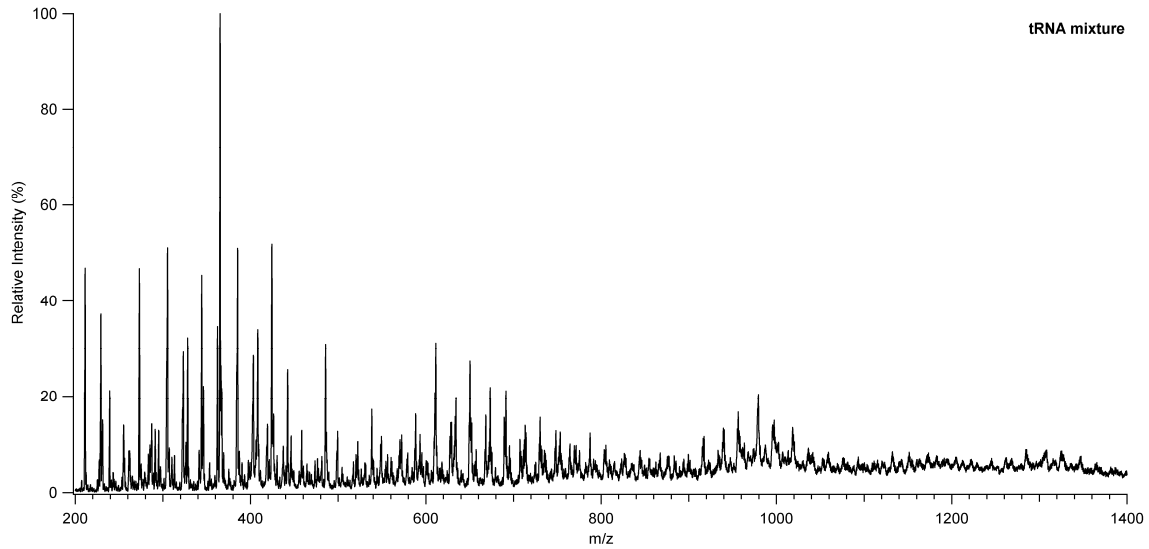


Şekil 23. A) ATP'nin negatif iyon ESI kütle spektrumu. B) ATP+Borik asit karışımının negatif iyon ESI kütle spektrumu.

A)



B)

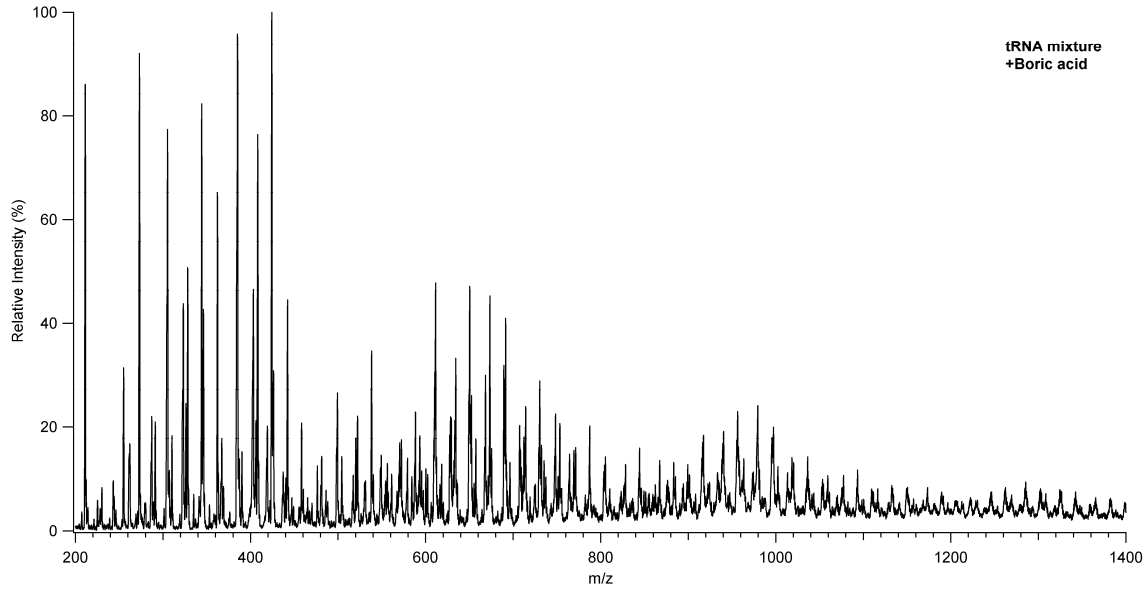


Şekil 24. A) Solvente ait elektrosprey kütle spektrumu. B) tRNA karışımına ait elektrosprey kütle spektrumu.

tRNA karışımına ait daha kaliteli bir kütle spektrumu elde etmek için amonyum asetat ile çöktürme metodu kullanılmıştır. tRNA karışımına ait amonyum asetat ile yapılan birinci, ikinci ve üçüncü çöktürmelere ait kütle spektrumları alınmıştır. Amonyum asetat çöktürmelerinden sonra spektrumlardaki sinyallerde gelişim görülmektedir ve sinyal-gürültü oranında da

azalma gözlenmiştir. Ancak elde edilen spektrumlar doğru hesaplamalar yapılabilmesi için hala elverişli görünmemektedir.

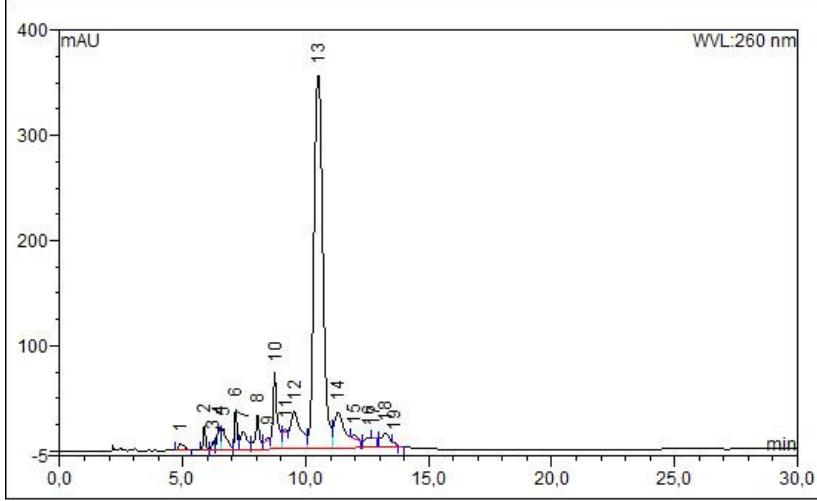
tRNA'nın amonyum asetat metodu kullanılarak yapılan üçüncü çöktürme sonrası elimizde olan örnekler 500 µM borik asit ile karıştırılıp direkt olarak analize alınmıştır. Ancak Şekil 25'de de görülebileceği gibi borik asitin bu karışımdaki herhangi bir ya da birkaç tRNA'ya bağlanarak oluşturduğu komplekse ait sinyal ayırt edilememektedir. Bunun pek çok sebebi olabilir. Öncelikle saf bir örnekle çalışılmamıştır. Örnek tRNA karışımlarından oluşmaktadır. Bu karışımda borik asit bağlanmasıyla oluşabilecek sinyal değişiklikleri rezolüsyonu daha da yüksek bir cihaz kullanılarak gözlenebilir. Karışımdan kaynaklanan iyonlar yüklerinden dolayı borik asitin bağlanmasıyla oluşacak sinyal değişimini baskılayabilir. Bu sebeplerden dolayı elde edilen spektrumları daha da iyileştirmek için borik asitin bağlanabileceği muhtemel bölgeler olan tRNA'ların 3' ucundaki CCA kuyruk sekansını da içeren, 10 nükleotit uzunluğunda tRNA primeri (RNA Primer: 5' AACCGCACCA3') dizayn edilmiştir.



Şekil 25. Üçüncü amonyum asetat çöktürmesi sonucu elde edilen tRNA karışımı ve borik asit kompleksinin ESI kütle spektrumu.

Bu primer kullanılarak yapılan analizler ile Q-trap kütle spektrometri analizi ile moleküle ait saf ve düzgün bir spektrum elde edilememiştir. Primer sentezi sırasında örnekte kalan herhangi bir safsızlık oligomerin iyonlaşmasını baskılamış ya da engellemiş olabilir. Ayrıca daha önceki denemelerimizde de karşılaştığımız nükleik asitlerdeki katyon bileşiklerindeki problemi de (sodyum girişimi gibi) moleküle ait düzgün bir spektrum alınmasını engelliyor olabilir. Bunun üzerine örneğe önce HPLC uygulanmasının; HPLC ile oligomere ait fraksiyonun toplanıp, safsızlıklardan ayırıldıktan sonra borik asit ile muamele ederek kütle

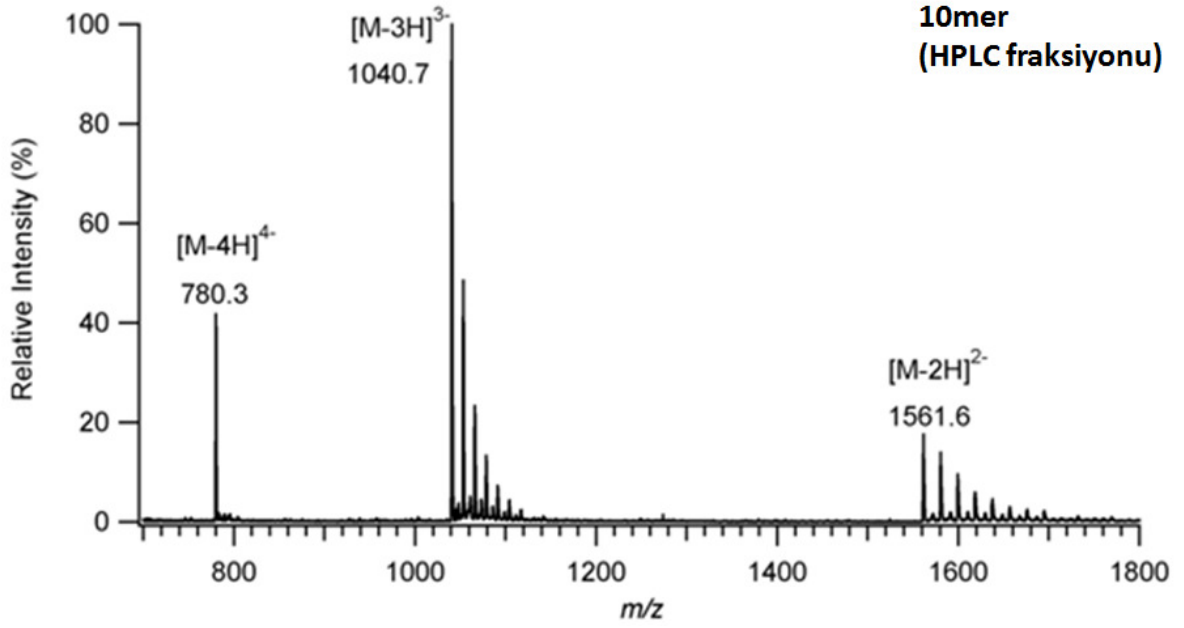
spektrumunun alınmasının daha doğru sonuç verebileceği düşünölmüştür. Şekil 26'da RNA oligomerine ait HPLC kromatogramı görölmektedir. Burada belirgin bir sinyal veren ve örneğe ait olan 13 numaralı fraksiyon toplanmış ve daha sonraki analizlerde kullanılmıştır.



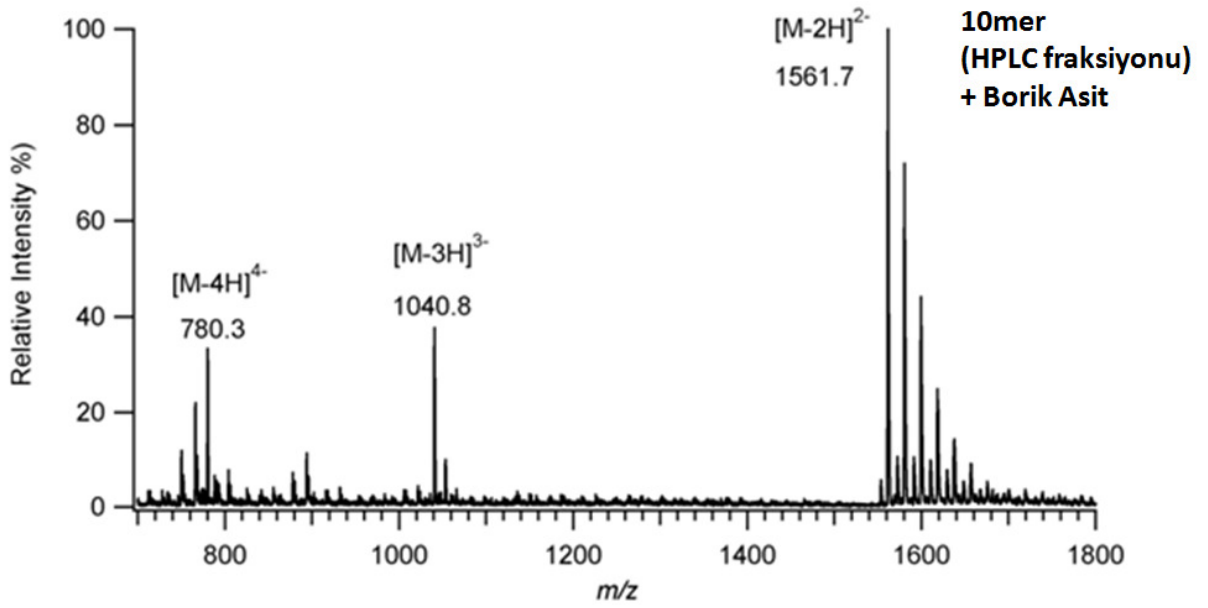
Şekil 26. Oligomere ait HPLC kromatogramı.

Şekil 27A'da oligomere ait olduğu belirlenerek toplanan fraksiyona ait ion-trap kütle spektrumu görölmektedir. Moleküle ait iyonlaşırken iki, üç ve dört proton kaybetmiş halleri de spektrumda gözlenebilmektedir. Daha sonra bu fraksiyona son konsantrasyonu 500 µM olacak şekilde borik asit eklenmiş ve yeniden kütle spektrometrisi ile analiz edilmiştir. Şekil 27B'deki spektrumda moleküle ait ikili ve üçlü yüklerdeki sinyal yoğunluklarının değiştiği gözlenmektedir. Borik asit muamelesinden önceki ve sonraki, ikili ve üçlü yüklerdeki bu yoğunluk farkı; ortama borik asit eklenmesi sonucunda solvent ortamının pH'sında meydana gelebilecek değişiklikler ile molekülün farklı çoklu yüklerde bulunması olabilir. Ancak borik asit ile muamele sonrasında elde edilen spektrum incelendiğinde, borik asitin 10 nükleotitlik RNA parçasına bağlanmasıyla meydana gelebilecek bir sinyalin olmadığı bulunmuştur.

(A)



(B)



Şekil 27. RNA primerine ait saflaştırılan fraksiyonun ion-trap kütle spektrometrisinde analizi. A) HPLC ile toplanan 13 numaralı fraksiyona ait kütle spektrumu. B) Aynı fraksiyon, toplandıktan sonra borik asit ile muamele edilmiş daha sonra kütle spektrumu elde edilmiştir.

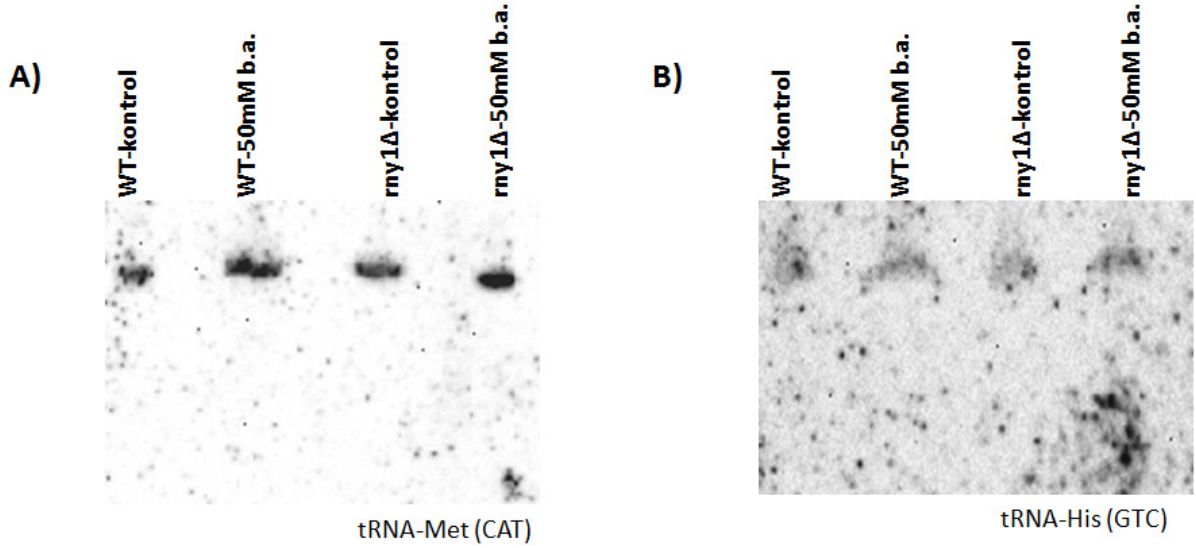
Ek olarak, HPLC kolonuna yüklenmeden önce stok RNA oligomer çözeltisine borik asit eklenmiş, HPLC'de saf fraksiyon gözlemlendikten sonra toplanmış ve LC-MS analizi

gerçekleştirilmiştir. Ancak borik asitin bağlandığını gösteren herhangi bir sinyal yine gözlenememiştir.

Bor-tRNA ilişkisi teyit edilemediğinden dolayı NMR ile borun tRNA üzerinde bağlandığı yerin tespit edilmesine gereksinim kalmamıştır.

4.12. Borun hücrelerde yüksüz (amino asitsiz) tRNA sinyali oluşturma mekanizmasının northern blot yöntemi ile araştırılması

Borik asit, maya hücrelerinde Gcn2 kinazı aktif hale getirerek translasyon başlangıç faktörlerinden eIF2 α 'nın fosforlanmasını ve protein sentezinin durmasını sağlamaktadır. Gcn2 kinazın bor tarafından aktif hale getirilmesi için yüksüz tRNA'ların bağlandığı histidil tRNA-sentetaz (m2) bölgesinin bulunması gerekmektedir. Böylelikle GCN2'deki bölgeler arasında fiziksel etkileşimler olmakta ve Gcn2 aktif hale gelerek kinaz fonksiyonunu göstermektedir. İlgili bölgenin çıkartılmış olduğu Gcn2 bor varlığında kinaz aktivitesini gösterememektedir. Bor, hücre içerisinde yüksüz tRNA miktarını arttırarak Gcn2'nin de içinde bulunduğu yüksüz tRNA sinyal sistemini aktif hale getirebilir. Ancak borun bu sinyali nasıl oluşturduğu ve Gcn2 kinazı nasıl aktif hale getirdiği bilinmemektedir. Bazı stres koşullarında tRNA'ların antikodon bölgesinden parçalandığı bulunmuştur. Bu durumda da Gcn2 kinazı aktif hale gelebilmektedir (Thompson vd., 2008; Thompson ve Parker, 2009). Bor varlığında da benzer bir mekanizma rol oynayabilir ve tRNA'lar mayadaki spesifik bir RNase olan Rny1 sayesinde yıkıma uğrayarak parçalanabilirler. Bu da protein sentezini bloklayarak hücrelerin stres koşullarında metabolik olarak durağan bir faza girmesi ve koşulların düzelmesi için zaman sağlayacaktır. Bor stresinin tRNA'larda yıkıma neden olma ihtimalini araştırmak için borlu ortamda büyüyen yabani tip ve *rny1* Δ mutan hücrelerinden RNA izolasyonu yapılmış ve tRNA-histidin, tRNA-metiyonin, tRNA-treyonin'e spesifik işaretli olmak üzere üç farklı tRNA probu kullanılarak northern blot denemeleri gerçekleştirilmiştir.

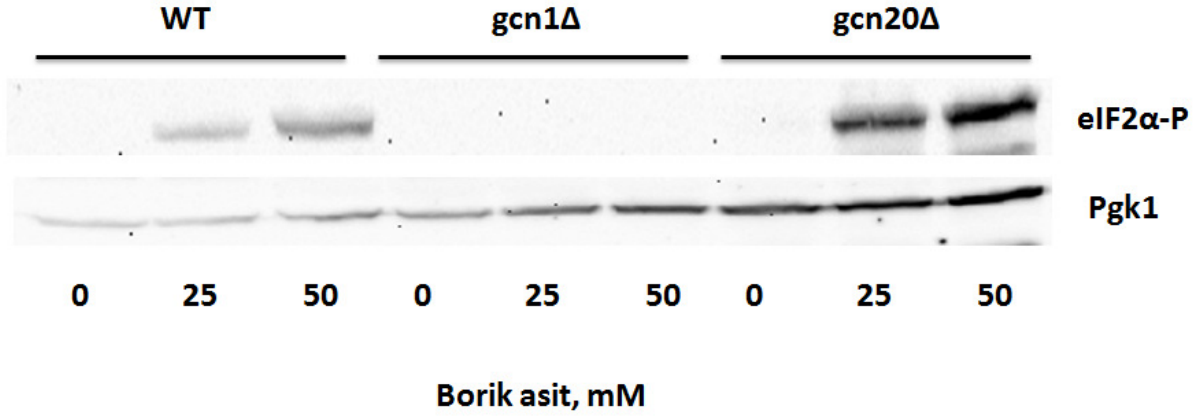


Şekil 28. Yabani tip ve *rny1Δ* mutant hücreleri 1 saat 50mM borik asit ile muamele edilmiş ya da borik asit muamelesi görmeden total RNA izole edilmiştir. Elde edilen RNA'lar northern blot denemelerinde kullanılmıştır. A) tRNA-Metiyonin (CAT) probu B) tRNA-Histidin (GTC) probu.

Northern blot denemeleri sonucunda borik asit stresinde tRNA'larda *RNY1* bağımlı ya da bağımsız meydana gelebilecek herhangi bir parçalanmaya ait bant gözlenmemiştir (Şekil 28). Bor stresinde, oksidatif stres koşulları altında gözlenen duruma benzer bir durum gözlenmiyor olabilir. Bu durumda alternatif olarak farklı tRNA problemleri dizayn edilerek farklı tRNA'larda parçalanmanın meydana gelip gelmediği incelenebilir.

4.13. Gcn1/Gcn20 kompleksinin bor stresindeki rolünün araştırılması

Gcn1 ve Gcn20 proteinleri, amino asit starvasyonu koşullarında Gcn2 kinazını aktive eden bir protein kompleksinin birimleridir. Gcn20; 85 kDA'dur, ABC proteinleri ailesinin bir üyesidir. Gcn1 ise 297 kDa'luk pek çok segmentten oluşan bir proteindir. Gcn1 ve Gcn20'nin in vivo olarak birbirleriyle etkileşim halinde oldukları bilinmektedir. Gcn1/Gcn20 kompleksi aynı zamanda proteinin N-terminal ucuna bağlanmak suretiyle fiziksel olarak Gcn2 ile de etkileşmektedir. Gcn1/Gcn20 kompleksinin Gcn2'ye bağlanması, yüksüz tRNA'lar tarafından Gcn2 aktivasyonu için gerekmektedir (Vazquez de Aldana vd., 1995; Marton vd., 1997; Garcio-Barrio vd., 2000). Mayadaki bilinen tek eIF2 α kinazı Gcn2'dir (Hinnebush, 1996). Bor stresinin *GCN1* ve *GCN20* genleri vasıtasıyla Gcn2'ye iletilmesi ihtimalini araştırmak için bu genlere ait mutantlarda bor muamelesine karşı Gcn2 kinaz aktivitesi eIF2 α 'nın fosfatlanması sayesinde incelenmiştir.



Şekil 29. Yabani tip, *gcn1Δ* ve *gcn20Δ* hücreleri büyütülüp, üçe ayrılmıştır. Bir gruba borik asit muamelesi yapılmazken, bir grup 25mM, diğer bir grup da 50mM borik asit ile muamele edilmiştir. eIF2α fosfatlanması, eIF2α üzerindeki fosfo-Ser51'e karşı bir antikor kullanılarak western blot analizleriyle belirlenmiştir. Membran daha sonra üzerindeki antikorlardan arındırılarak deneysel kontrol olarak yeniden maya Pgk1 antikoruna ile muamele edilmiştir.

Şekil 29'da görüldüğü gibi yabani tip kontrol grubu hücrelerinde eIF2α'da herhangi bir fosfatlanma gözlenmezken, bor stresi ile eIF2α'daki fosfatlanma artmaktadır. *Gcn20Δ* mutanları için de benzer bir durum geçerlidir. Ancak *GCN1* delesyonu eIF2α fosfatlanmasını engellemektedir. *GCN1*'in, Gcn2 kinaz aktivitesinin pozitif regülatörü olduğu bilinmektedir. *GCN2*'nin N-terminal bölgesi ile *GCN1*'in C-terminal bölgesinin etkileşimi yüksek seviyelerde *GCN2* fonksiyonu ve genel amino asit kontrol mekanizması için esansiyeldir. *GCN1* ve *GCN2* ribozoma *GCN1/GCN20/GCN2* kompleksi şeklinde bağlı oldukları; bu kompleksin içinde de *GCN1*'in yüksüz tRNA'ları ribozomal A bölgesinden *GCN2* üzerindeki tRNA bağlanma bölgesine taşınımında rol aldığı böylelikle *GCN2*'nin kinaz aktivasyonunun sağlandığı gösterilmiştir (Sattlegger ve Hinnebusch, 2000). Bor stresinde de *GCN1* geninin, Gcn2'nin aktivasyonu için gerekli olduğu böylelikle gösterilmiştir.

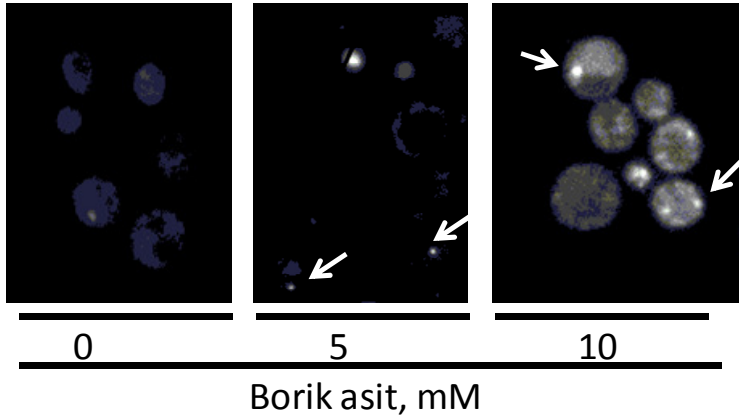
4.14. Bor stresi ve otofaji arasındaki ilişkiler

Bor stresinin maya hücrelerinde rapamisin ilacının yarattığı etkiye benzer şekilde genel amino asit kontrol mekanizmasını aktive ettiği ve protein sentezini blokladığı tespit edilmiştir (Ulusik vd., 2011b). Bu kapsamda borun rapamisin gibi otofaji yollarını aktif hale getirebileceği ve hayat süresini artırdığı düşünülmüştür.

Otofaji ökaryotlarda bulunan ve sitoplazmik içeriğin ya da organellerin lizozoma taşınarak parçalanmasını ve geri dönüşümünü sağlayan bir yoldur. Otofaji yolağı aktif hale gelirken

Atg8 proteinine lipid grubu takılarak membran yapılarına katılması sağlanır ve Atg8 otofagozom denilen otofaji vesiküllerinin ilk oluştuğu yerde lokalize olur. Atg8 proteinin hücre içindeki dağılımı yeşil flöresan protein sayesinde çalışılabilir.

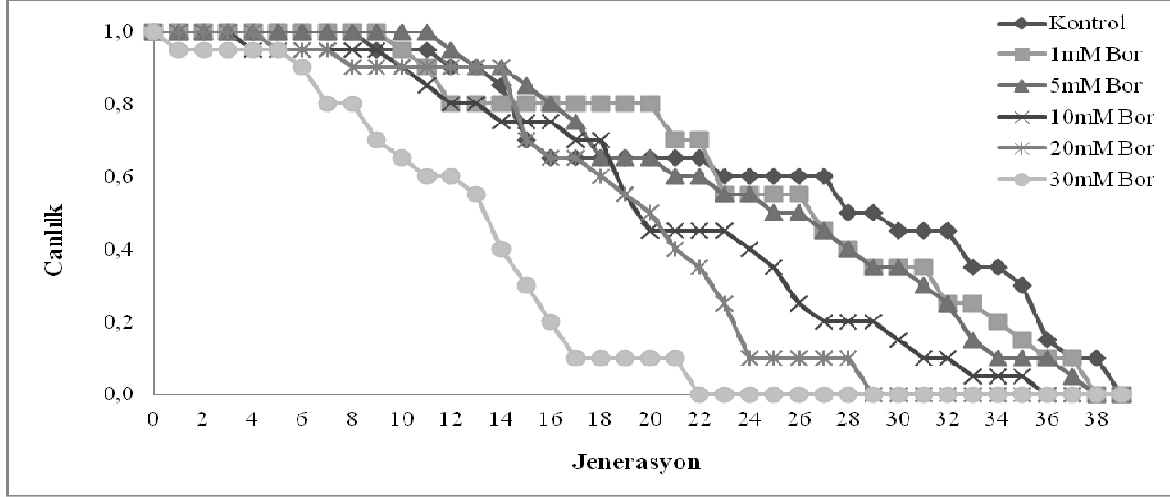
Bor stresinin otofaji yolağını aktif hale getirmesini araştırmak için mayada otofaji belirteç geni olarak kullanılan *ATG8* geninin GFP ile işaretlenmiş hali bir plazmit üzerinden maya hücrelerine aktarılmış ve hücreler bor stresine maruz bırakılmıştır. Şekil 30'da görüldüğü gibi bor muamelesi görmemiş hücrelerde GFP-Atg8 füzyon proteininin toplandığı odaklar olmadığı halde bor stresine maruz kalmış hücrelerde bu tür odakların oluştuğu gözlemlenmektedir.



Şekil 30. GFP-Atg8 proteinin bor muamelesinden otofagozomlarda (oklar ile belirtilmiştir) birikmesinin konfokal flöresan mikroskop ile görüntülenmesi.

Borun otofajiyi indükleyebildiği bulunduktan sonra maya hayat süreleri üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Farklı bor konsantrasyonlarına maruz kalmış hücrelerin replikatif ve kronolojik yaşlanma profilleri incelenmiştir. Replikatif yaşlanma için hücrelerin ölmeden önce kaç defa bölünme geçirdikleri mikromanüplatörlü mikroskop sayesinde sayılmış ve her bir gruptan 20 hücre takip edilmiştir. Kronolojik yaşlanma için ise hücrelerin iki hafta boyunca borlu ortamda hayatta kalma kabiliyetleri CFU (koloni oluşturabilen unitelerin) tespiti ile gerçekleştirilmiştir.

Şekil 31'da ve Tablo 4 de bor muamelesinin replikatif yaşlanmaya olan etkisi gösterilmiştir. Bor; konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerin hayat sürelerinde (bölünme sayılarında) azalmaya neden olmuştur.

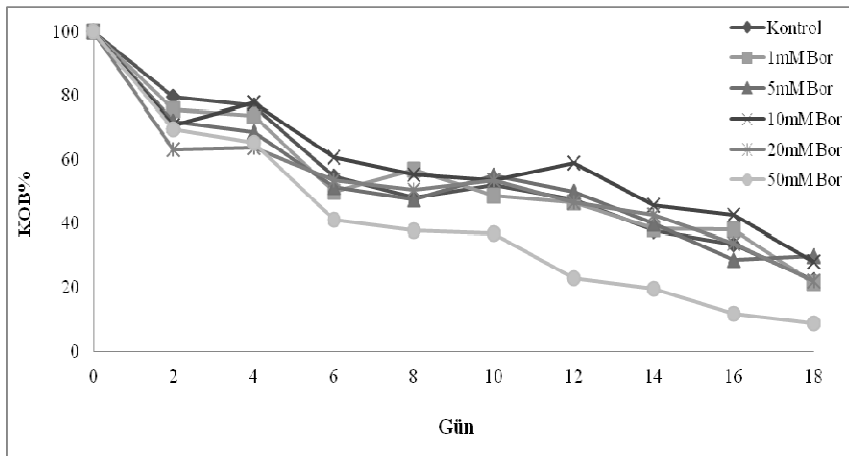


Şekil 31. Borun replikatif yaşlanmaya olan etkisi

Tablo 4. Borun replikatif yaşlanmaya olan etkisi

	N (örnek sayısı)	Ortalama yaşam süresi
Kontrol	40	24,5±1,6
1mM Borik asit	40	26,2±1,6
5mM Borik asit	40	24,6±1,6
10mM Borik asit	40	23,3±1,4
20mM Borik asit	40	21,8±1,4
30mM Borik asit	40	16,3±0,9

Kronolojik yaşlanmada da yine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Konsantrasyona bağlı olarak kronolojik hayat süreleri de kısalmıştır (Şekil 32, Tablo 5).

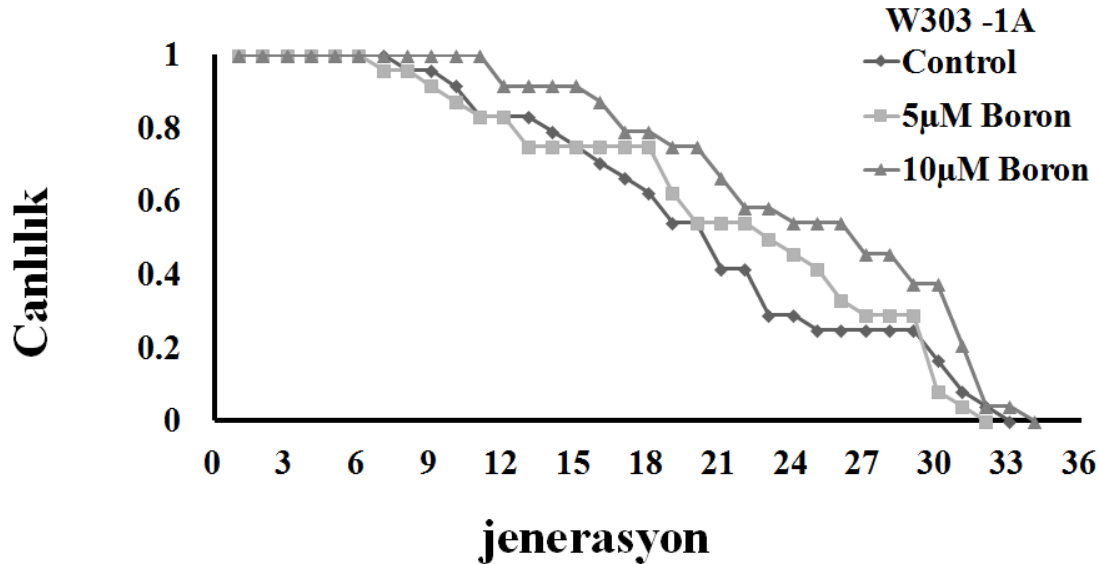


Şekil 32. Bor muamelesinin kronolojik yaşlanmaya olan etkisi

Tablo 5. Bor muamelesinin kronolojik yaşlanmaya olan etkisi

	0. Gün	2. Gün	4. Gün	6. Gün	8. Gün	10. Gün	12. Gün	14. Gün	16. Gün	18. Gün
Kontrol	100	80±6	77±3	55±8	48±1	52±4	48±7	38±2	34±4	22±1
1mM Bor	100	75±7	74±9	50±9	57±5	49±6	47±2	38±3	38±1	22±1
5mM Bor	100	72±3	69±4	51±7	47±7	55±2	50±4	40±3	29±5	30±7
10mM Bor	100	71±3	78±1	61±8	55±7	53±4	59±6	46±4	43±2	28±3
20mM Bor	100	63±9	64±5	53±6	51±7	54±4	47±3	43±3	34±2	22±10
50mM Bor	100	69±5	65±5	41±4	38±8	37±6	23±2	20±1	12±2	9±0,4

Yapılan daha ileri denemelerle replikatif yaşlılık denemeleri için yabancı tip hücreler (W303-1A) borik asitin mikromolar konsantrasyonlarını içeren YPD besiyerlerinde büyütülmüştür. Analizin sonuçlarına göre 10µM bor, W303-1A yabancı tip hücrelerin hayat süresini %20 oranında arttırmıştır (Şekil 33, Tablo 6). Borun düşük konsantrasyonlarının hayat süresinin uzamasına katkısı olduğu gözlenirken, yüksek konsantrasyonlarında böyle bir etki gözlenememiştir.



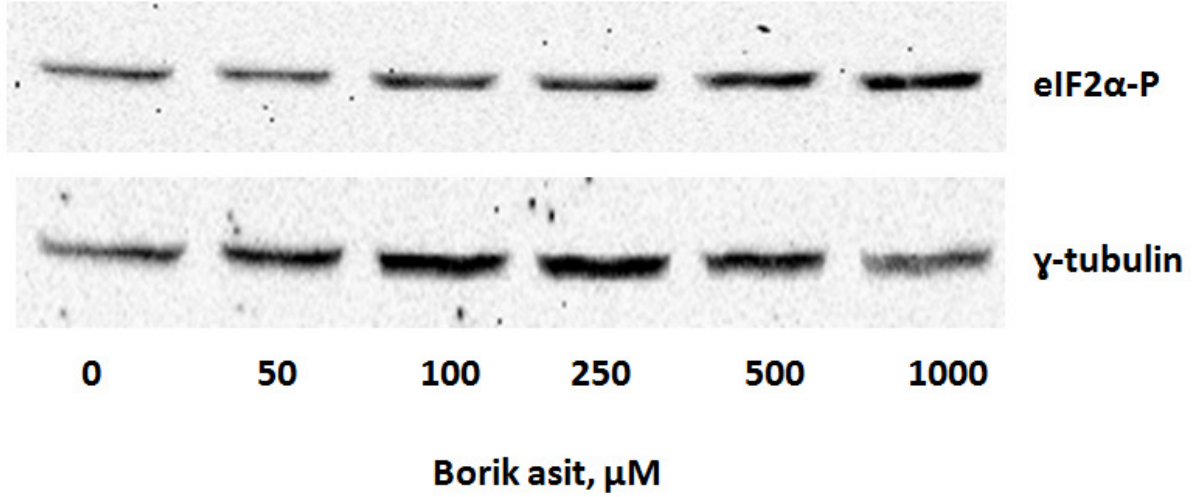
Şekil 33. Düşük konsantrasyonlardaki borun replikatif yaşlanmaya olan etkisi

Tablo 6. Düşük konsantrasyonlardaki borun replikatif yaşlanmaya olan etkisi

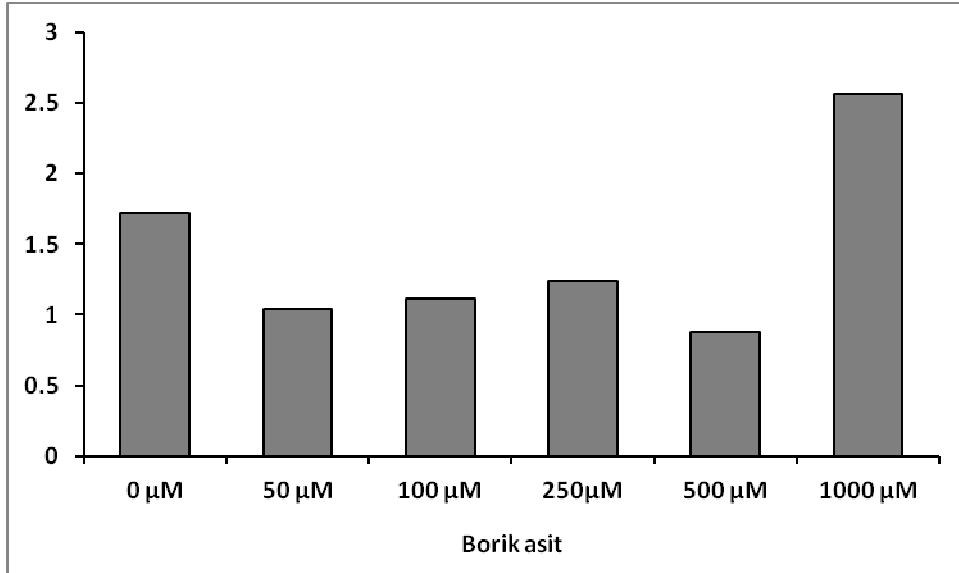
W303-1A	n	Ortalama hayat süresi
Kontrol	24	20,9±1,5
5µM Bor	24	21,8±1,6
10µM Bor	24	25 ± 1,4

4.15. Borun etki mekanizmasının maya hücrelerine özel olup olmadığının araştırılması

Borun etki mekanizmasının genelliğini aydınlatılabilmek için borun eIF2 α 'yı fosfatlayarak neden olduğu protein sentezi inhibisyonu memeli hücre kültürü kullanılarak da gösterilmiştir. GAAC sistemini uyaran şartların maya ve insan hücrelerinde benzer etkiyi yaptıkları bilinmektedir (Hinnebusch, 2005). Fakat bor toksisitesinde de aynı durumun geçerli olup olmadığı bilinmemektedir. İnsan ve maya eIF2 α 'sı primer yapı bakımından benzer olup, özellikle 51. serinin olduğu kısım benzerlik göstermektedir. Dolayısı ile mayaya özgü eIF2 α fosfatlamasını tanıyabilen benzer bir antikor ile memeli eIF2 α faktörünün bor varlığında fosfatlanması western blotlama sayesinde çalışılabilmektedir. Denemede memeli hücresi olarak insan serviks epitelyum hücrelerinden HeLa hücreleri kullanılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarla DU-145 prostat kanser hücre hattı borik asite karşı oldukça hassas bulunmuştur. 1000µM borik asit muamelesi ile 8. günde çoğalmaları %98 oranında azalmıştır (Barranco ve Eckhert, 2004). Bu inhibisyon da göz önünde bulundurularak; 0, 50, 100, 250, 500, ve 1000 µM borik asit konsantrasyonları western blot denememiz için seçilmiştir. Şekil 34'de de görüldüğü gibi eIF2 α , borik asit muamelesi sonucu memeli hücrelerinde de fosfatlanabilmektedir. Bu da bor toksisitesinin etki mekanizmasının sadece maya hücrelerine özgü olmadığını göstermekte ve aksine genel bir mekanizmanın varlığına işaret etmektedir.



Şekil 34. HeLa hücreleri belirtilen konsantrasyonlardaki borik asite 5 gün boyunca maruz bırakılmışlardır. Daha sonra protein izolasyonu yapılan hücrelerdeki protein miktarları Bradford analizi ile normalize edilip eşitlenmiş ve western blotlama deneylerinde kullanılmıştır. eIF2 α fosfatlanması, eIF2 α üzerindeki fosfo-Ser51'e karşı antikor kullanılarak belirlenmiştir. Membran daha sonra üzerindeki antikorlardan arındırılarak deneysel kontrol olarak yeniden γ -tubulin antikoruna muamele edilmiştir. Şekil 35'deki western blot denemesi sonucundaki bant yoğunluklarından elde edilen sütun grafikte görüldüğü gibi 1000 μM borik asit muamelesiyle eIF2 α 'daki fosfatlama oldukça artmıştır.



Şekil 35. HeLa hücreleri kullanılarak eIF2 α -P ve insan γ -tubulin'e karşı kullanılan antikorlar ile elde edilen protein ekspresyonunu ifade eden bant yoğunluklarının kendi içerisinde normalizasyonu.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Proje kapsamında öncelikle maya delesyon seti taramalarıyla bulunan ve bora dirençlilik gösteren *elp1Δ*, *elp3Δ*, *elp6Δ*, *ncs2Δ*, *ncs6Δ* ve *kti12Δ* mutantlarında tRNA wobble baz modifikasyonları ile ilgili bozukluklar olduğu tespit edilmiştir. Bu bozuklukların Gcn4 transkripsiyon faktörünü aktive edip etmedikleri β -galaktozidaz denemesi ile belirlenmiş ve mutantlardaki Gcn4-lacZ seviyeleri beklenenin aksine yabani tip hücrelere kıyasla daha az bulunmuştur. Aynı mutantlardaki *ATR1* mRNA ifadenme seviyeleri ise yabani tip hücrelere göre oldukça artmıştır. Bu da bor dirençlilik mekanizmasında Gcn4 transkripsiyon faktöründen bağımsız bir regülasyon mekanizmasını düşündürmektedir. Bor dirençliliğinin sağlanmasında *ATR1*'in aktivasyonunu sağlayan ve bu yolda henüz bulunmamış başka faktörler de rol oynuyor olabilir. Sözü edilen gen mutantlarındaki dirençlilik mekanizmasının tamamen ortaya çıkarılması için tRNA modifikasyonları ile bor stresi arasındaki ilişkinin daha ayrıntılı incelenmesi gerekmektedir.

Yine maya delesyon seti taramalarıyla bulunan 10 tane bor-duyarlı mutant ile ilgili yaptığımız çalışmalar sonucunda yokluğunda hücreleri bora karşı aşırı duyarlı hale getiren genlerin klonlanması ve yabani tip ile mutant hücrelerde plazmid üzerinden aşırı ifadenmesi ilgili hücrelere ek bir bor dirençliliği ya da hassasiyeti sağlamamıştır. Yapılan hücre içi bor denemeleri ile bazı mutantların hücre içerisinde fazlaca bor biriktirirken bazılarının yabani tip hücrelere göre daha az bor biriktirdikleri gözlenmiştir. Bora karşı duyarlı mutantların bor muamelesiyle hücre içerisinde fazla miktarda bor biriktirmesi beklenen bir sonuçtur ve ilgili mutantların bor duyarlılığının sebeplerinden biri olabilir. Ancak hücre içerisinde fazla miktarda bor biriktirmeyip bora karşı yine de duyarlı olan mutantlar ile ilgili duyarlılık mekanizmalarının anlaşılması için daha ayrıntılı araştırmalar yapılmalıdır.

Gcn4, genel amino asit kontrol mekanizmasının (GAAC) ana metabolik düzenleyicisidir ve bor stresine yanıtta rol oynadığı bilinmektedir (Uluişik vd., 2011b). Ancak bor stresinde hangi faktörlerin Gcn4 üzerinde etki yaptığı henüz bilinmemektedir. GCN4'ün promotor bölgesine bağlandığı tespit edilen 12 tane transkripsiyon faktörünün mutantları ile yapılan çalışmalar sonucunda *MGA1*, *STP1*, *GLN3*, *YAP1*, *FLO8* genlerinin delesyon mutantlarında Gcn4 seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir. Bu da, bu transkripsiyon faktörlerinin Gcn4'ü aktive etmek suretiyle işlev gördüğünü düşündürmektedir. Ancak ilgili genlerin eksikliğinde *ATR1* ifadenmesinde beklenildiği gibi bir azalış gözlenmemiştir. Söz konusu transkripsiyon faktörleri hücre içerisinde pek çok değişik sinyal yolağında düzenleyici roller üstlenmiştir. Dolayısıyla bu genlerin yokluğu hücre içerisindeki diğer sinyal yollarının düzenlenmesini

doğrudan etkileyecektir. Bu sebepten ötürü GCN4 seviyeleri düşük olan hücrelerdeki ATR1 seviyelerinde gözlenmeyen azalışın sebebi farklı yolakların birbiriyle etkileşiminden kaynaklanmış olabilir. Bulunan faktörlerin bor stresiyle ilişkileri daha ayrıntılı olarak anlaşılmalıdır.

Hücre içi sinyal iletimi ve bor stresi arasındaki ilişkiyi açığa çıkarmak için özellikle TOR, SNF1 ve PKA yolları üzerinde durulmuştur. Bu yollarda incelenen genler hücre içerisinde önemli metabolik yollarda rol almaktadırlar. Dolayısıyla bu genlerin delesyonu sadece bor stres yolağında değil başka yolların da birbiri ile iletişimini etkileyebilir. Bor stresinde özellikle TOR1 geninin yokluğunda Gcn4 ifadenmesinin oldukça düştüğü gözlemlenmiştir. Aynı şekilde ATR1 mRNA ifadenme seviyeleri de *tor1Δ* ve *gln3Δ* mutantlarında yabancı tip hücrelere kıyasla oldukça azdır. Dolayısıyla bu genlerin bor stres yanıt mekanizmasındaki önemli oyuncularından olduğu düşünülebilir. *Snf1Δ* mutantında ise Gcn4 seviyeleri yabancı tipe göre daha fazla bulunurken, ATR1 ifadenmesi daha az bulunmuştur. PKA yolağında ise bor muamelesinden sonra *pka2Δ* mutantında Gcn4 seviyeleri fazla bulunurken *pka1Δ* mutantında da ATR1 seviyesinin fazlalığı göze çarpmaktadır. PKA genleri bor stresinde Gcn4'e bağımlı ya da bağımsız olmak üzere *Atr1* regülasyonundan sorumlu olabilir. Ancak bu varsayımların doğruluğunu kanıtlayabilmek için ek deneylere ihtiyaç vardır.

Borun hücrelerde yüksüz tRNA sinyali oluşturma mekanizmasının araştırılması kapsamında kütle spektrometresi ve northern blot yöntemleri kullanılmıştır. Kütle spektrometresi proteomik analizler için yaygın olarak kullanılan bir cihazdır. Nükleik asitler ile ilgili yapılan denemeler sınırlıdır, dolayısıyla bu tarz denemelerin optimizasyonunda hala sıkıntılar yaşanmaktadır. Farklı tRNA örnekleri ile yapılan analizlere göre borik asitin tRNA'ya bağlandığına dair bir gözlem kütle spektrometresi ile elde edilememiştir. Hücrenin bir takım çevresel stres koşullarına adaptasyonunda tRNA'larda parçalanmalar meydana geldiği bilinmektedir (Thompson 2009). Bor stresinde de aynı durumun söz konusu olup olmadığını anlamak için bor stresine maruz kalmış hücrelerden elde edilen RNA örnekleri ile northern blot denemeleri gerçekleştirilmiştir. Ancak yapılan denemelere göre kullanılan üç tRNA probu (His, Met, Thr) için de tRNA'larda bir parçalanma gözlenmemiştir. Dolayısıyla borik asitin yüksüz tRNA sinyalini nasıl oluşturduğunu anlamak için farklı deney dizaynlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Aynı zamanda bor stresinde Gcn2 kinazının aktivitesi için GCN1 genine ihtiyaç duyulduğu bulunmuştur. Borun otofajiyi indüklediği ancak maya hücrelerinin hayat sürelerini kısalttığı da bu projede elde edilen bulgular arasındadır. Bor toksisitesinin etki mekanizmasının maya hücrelerine özel olmadığı bor muamelesi ile HeLa memeli hücre hattında da eIF2α

fosfatlamasının gerçekleştirildiği gösterilmiştir. Borun etki mekanizmasının genelliğinin kanıtlanması konusunda daha çok deneysel verinin sağlanması faydalı olacaktır.

Bor yeryüzündeki sulara, kayalarda ve toprakta doğal olarak oluşmaktadır ve dünyanın belli bölgelerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Ülkemiz de doğal bir bor deposudur ve dünya bor rezervlerinin yaklaşık %73'lük bir kısmına sahiptir (Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü, 2012). Bor endüstriyel olarak çeşitli kullanım alanlarına sahip olmasının yanı sıra bitki büyüme ve gelişimindeki öneminden dolayı tarımda da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle bor eksikliği ve fazlalığının yol açtığı bitkideki büyüme bozuklukları büyük ekonomik ve tarımsal kayıplara sebep olmaktadır. Bu yüzden organizmalar yeteri kadar bor alırken bir taraftan da bor toksisitesinden korunmalıdırlar. Borun; bu organizmalardaki asıl rolü ve bor toksisitesinin moleküler mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılmış değildir. Organizmaların bor metabolizmalarını nasıl dengelediklerini anlamak ve buna uygun yeni teknik ve ortamların geliştirilmesi için moleküler çalışmalardan elde edilecek bilgilere ihtiyaç vardır. Bor toksisite mekanizmalarının açıklanması özellikle zirai ve tıbbi çalışmalar için büyük önem taşımaktadır. Bu durum, ülkemizin bor yönünden zengin topraklara sahip olması nedeniyle ek olarak önem taşımaktadır.

Ancak bir metalloidin sebep olduğu toksisitenin moleküler mekanizmalarının anlaşılması hususu karmaşık bir olaydır ve hücre içerisindeki pek çok yolağın birbiriyle etkileşmesi, birbirini baskılaması ya da aktive etmesi anlamlarına gelebilmektedir. Bu sebepten dolayı yapılan analizler sonucu hücrenin bor stresine oluşturduğu yanıtı net bir şekilde ortaya koyabilmek henüz mümkün olmamıştır. Ancak bu projeden elde edilen veriler bor toksisitesindeki moleküler mekanizmaların işleyişini anlamak adına yapılacak daha ileri ve ayrıntılı çalışmalar için yol gösterici olacaktır.

6. REFERANSLAR

1. Ahmed, I., Yokota A., Fujiwara T. 2007. "A novel highly boron tolerant bacterium, *Bacillus boroniphilus* sp. nov., isolated from soil, that requires boron for its growth", *Extremophiles*, 11, 217-224.
2. Amin, S. A., Kupper F. C., Green D. H., Harris W. R., Carrano C. J. 2007. "Boron binding by a siderophore isolated from marine bacteria associated with the toxic dinoflagellate *gymnodinium catenatum*", *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 478-479.
3. Anderson, G.R., Jordan J.V. 1961. "Boron. A non-essential growth factor for *Azotobacter chroococcum*", *Soil Sci.*, 92, 113-116.
4. Baker, R.T., Tobias J.W., Varshavsky A. 1992. "Ubiquitin-specific proteases of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of UBP2 and UBP3, and functional analysis of the UBP gene family", *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 23364-23375.
5. Baker, S. J., Tomsho, J. W., Benkovic, S. J. 2011. "Boron-containing inhibitors of synthetases", *Chem. Soc. Rev.*, 40, 4279-4285.
6. Barranco, W. T., Eckhert C. D. 2004. "Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation", *Cancer Letters*, 216, 21-29.
7. Beck, T., Hall M. N. 1999. "The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors", *Nature*, 402, 689-92.
8. Bennett, A., Rowe, R. I., Soch, N., Eckhert, C. D. 1999. "Boron stimulates yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) growth", *J. Nutr.*, 129, 2236–2238.
9. Bertram, P. G., Choi J. H., Carvalho J., Chan T. F., Ai W., Zheng X. F. 2002. "Convergence of TOR-nitrogen and Snf1-glucose signaling pathways onto Gln3", *Mol. Cell Biol.*, 22, 1246-52.
10. Blevins, D. G., Lukaszewski K. M. 1994. "Proposed physiologic functions of boron in plants pertinent to animal and human metabolism", *Environ Health Perspect.*, 102(7), 31-33.
11. Bolanos, L., Lukaszewski K., Bonilla I., Blevins D. 2004. "Why Boron", *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 907–912.
12. Bozdag, G. O., Uluisik I., Gulculer G. S., Karakaya H. C., Koc A. 2011. "Roles of ATR1 paralogs YMR279c and YOR378w in boron stress tolerance", *BBRC*, 409, 748-751.
13. Camacho-Cristobal, J. J., Rexach J., Gonzales-Fontes A. 2008. "Boron in Plants: Deficiency and Toxicity", *Journal of Integrative Plant Biology*, 50, 1247-1255.
14. Carlson, M. 1999. "Glucose repression in yeast", *Curr.Opin. Microbiol.*, 2, 202-207.

15. Chen, X., Schauder S., Potier N., Van Dorsselaer A., Pelczer I., Bassler B., Hughson F.M. 2002. "Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron", *Nature*, 415, 545-549.
16. Cherkasova, V. A., Hinnebusch A.G. 2003. "Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2 α kinase GCN2", *Genes & Development*, 17, 859-872.
17. Cohen, M., Stutz F., Dargemont C. 2003. "Deubiquitination, a new player in Golgi to endoplasmic reticulum retrograde transport", *J. Biol. Chem.*, 278, 51989–51992.
18. Creppe, C., Malinouskaya L., Volvert M.L., Gillard M., Close P., Malaise O. 2009. "Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of α -tubulin", *Cell*, 136, 551-564.
19. Cui, Y., Winton M. I., Zhang, Z. F., Rainey C., Marshall J., deKernion J. B., Eckhert, C. D. 2004. "Dietary boron intake and prostate cancer risk". *Oncol Rep.*, 11(4), 887-92.
20. Devirian, T.A., Volpe S.L. 2003. "The physiological effects of dietary boron", *Crit Rev Food Sci Nutr*, 43, 219–231.
21. Engelberg, D., Klein C., Martinetto H., Struhl K., Karin M. 1994. "The UV response involving the ras signaling pathway and AP-1 transcription factors is conserved between yeast and mammals", *Cell*, 77, 381-390.
22. Environmental Protection Agency. 2004. "Toxicological Review of Boron and Compounds", 7440, 42–8.
23. Garcio-Barrio, M., Dong J., Ufano S., Hinnebusch A. G., 2000. "Association of GCN1-GCN20 regulatory complex with the N-terminus of eIF2 α kinase GCN2 is required for GCN2 activation", *The EMBO Journal*, 19(8), 1887-1899.
24. Gietz, R.D., Schiestl R.H. 1995. "Transforming yeast with DNA", *Methods Mol. Cell. Biol.*, 5, 255-269.
25. Harbison, K. T., Gordon D. B., Lee T. I., Rinaldi N. J., Macisaac K. D., Danford T. W., Hannett N. M., Tagne J. B., Reynolds D. B., Yoo J., Jennings E. G., Zeitlinger J., Pokholok D. K., Kellis M., Rolfe P. A., Takusagawa K. T., Lander E. S., Gifford D. K., Fraenkel E., Young R. A. 2004. "Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome", *Nature*, 431, 99-104.
26. Hinnebusch, A.G. 1985 "A hierarchy of trans-acting factors modulates translation of an activator of amino acid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*", *Molecular and Cellular Biology*, 5, 2349-2360.
27. Hinnebusch, A.G. 1996. "Translational control of GCN4: gene-specific regulation by phosphorylation of eIF2", In Hershey, J. W. B., Mathews, M. B. and Sonenberg, N. (eds), *Translational control*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring

- Harbor, NY, 199-244.
28. Hinnebusch, A. G. 2005. "Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast", *Annual Review of Microbiology*, 59, 407-450.
 29. Hu, H., Brown P. H. 1997. "Absorption of Boron by Plant Roots", *Plant and Soil*, 193, 49-58.
 30. Huang, B., Johansson M. J. O., Byström A. S. 2005. "An early step in wobble uridine tRNA modification requires the Elongator complex", *RNA*, 11, 424-436.
 31. Huang, B., Lu J., Byström A. S. 2008. "A genome-wide screen identifies genes required for formation of the wobble nucleoside 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine in *Saccharomyces cerevisiae*", *RNA*, 14, 2183-2194.
 32. Hunt, C. D. 2003. "Dietary boron: An overview of the evidence for its role in immune function", *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 16, 291-306.
 33. Hunt, C. D. 2007. "Dietary Boron: Evidence for Essentiality and Homeostatic Control in Humans and Animals", *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition*, Springer, 251-267.
 34. Hütter, R., Keller-Shien W., Knüsel F., Prelog V., Rodgers jr. G.C., Suter P., Vogel G., Voser W., Zahner H. 1967. "Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 57. Mitteilung. Boromycin", *Helvetica Chimica Acta*, 50, 1533-1539.
 35. Ishii, T., Matsunaga T. 1996. "Isolation and characterization of a boron-rhamnogalacturonan-II complex from cell walls of sugar beet pulp", *Carbohydr Res*, 284, 1-9.
 36. Johansson, M. J. O., Esberg A., Huang B., Björk G. R., Byström A. S. 2008. "Eukaryotic wobble uridine modifications promote a functionally redundant decoding system", *Mol Cell Biol*, 28, 3301-3312.
 37. Jorgensen, M. U., Gjermansen C., Andersen H. A., Kielland-Brandt M. C. 1997. "STP1, a gene involved in pre-tRNA processing in yeast, is important for amino-acid uptake and transcription of the permease gene BAP2", *Curr Genet*, 31, 241-247.
 38. Juan, J. C., Jes´us R., Agust´in G. 2008 "Boron in Plants: Deficiency and Toxicity", *Journal of Integrative Plant Biology*, 50 (10), 1247–1255.
 39. Juhnke, H., Krems B., Kotter P., Entian K. D. 1996. "Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress", *Mol. Genet. Genomics*, 252, 456-464.
 40. Kaya, A., Karakaya C. H., Fomenko E. D., Gladyshev N. V., Koc A. 2009. "Identification of a novel system for boron transport: Atr1 is a main boron exporter in yeast", *Molecular and Cellular Biology*, 29, 13, 3665-3674.

41. Kim, D. H., Faull K. F., Norris A. J., Eckhert C. D. 2004. "Borate-nucleotide complex formation depends on charge and phosphorylation state", *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 743-751.
42. Lee, T. I., Rinaldi N. J., Robert F., Odom D. T., Joseph Z. B., Gerber G. K., Hannett H. P., Harbison J. T., Thompson C. M., Simon I., Zeitlinger J., Jennings E. G., Murray H. L., Gordon D. B., Ren B., Wyrick J. J., Tagne J. B., Volkert T. L., Fraenkel E., Gifford D. K., Young A. R. 2002. "Transcriptional Regulatory Networks in *Saccharomyces cerevisiae*", *Science*, 298, 799 – 804.
43. Lemire, J. A., Harrison, J. J., Turner, R. J. 2013. "Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications", *Nature reviews Microbiology*. 11, 371-84.
44. Li, Y., Wang Y. 2013. "Ras protein/cAMP-dependent protein kinase signaling is negatively regulated by a deubiquitinating enzyme, Ubp3, in yeast", *J. Biol. Chem.*, 288, 11358-11365.
45. Limbach, P. A., Crain P. F., McCloskey J. A. 1995 "Molecular mass measurements of intact ribonucleic acids via electrospray ionization quadrupole mass spectrometry", *J Am Soc Mass Spectrom*, 6, 27-39.
46. Ljungdahl, P. O., Daignan-Fornier B. 2012. "Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*", *Genetics*, 190, 885-929.
47. Loewith, R., Hall M. N. 2011. "Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control", *Genetics*, 189, 1177-1201.
48. Marton, M. J., Vazquez de Aldana C. R., Qiu H., Chakraborty K., Hinnebusch A. G. 1997. "Evidence that GCN1 and GCN20, translational regulators of GCN4, function on elongating ribosomes in activation of eIF2 α kinase GCN2", *Molecular and Cellular Biology*, 17(8), 4474-4489.
49. Miwa, K., Takano J., Omori H., Seki M., Shinozaki K., Fujiwara T. 2007. "Plants Tolerant of High Boron Levels", *Science*, 318 (5855), 1417.
50. Nagakawa, Y., Hanaoka H., Kobayashi M., Miyoshi K., Miwa K., Fujiwara T. 2007. "Cell-type specificity of the expression of OsBOR1, a rice efflux boron transporter gene, is regulated in response to boron availability for efficient boron uptake and xylem loading", *Plant Cell*, 19, 2624-2635.
51. Nakayama, K., Nagasu T., Shimma Y., Kuromitsu J., Jigami Y. 1992. "OCH1 encodes a novel membrane bound mannosyltransferase: outer chain elongation of asparagine linked oligosaccharides", *EMBO J.*, 11, 2511-2519.
52. Nielsen, F. H. 1996. "Dietary supplementation of physiological amounts of boron increases plasma and urinary boron of perimenopausal women", *Professional Communication. Proc North Dakota Acad Sci* 50:52.

53. Nielsen, F. H. 1997. "Boron in human and animal nutrition", *Plant and Soil*, 193, 199-208.
54. O'Neill, M. A., Ishii T., Albersheim P., Darvill A. G. 2004. "Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide", *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 109–139.
55. Parrella, E., Longo V. D. 2008. "The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* to study mitochondrial dysfunction and disease.", *Methods*, 46(4), 256-262.
56. Park, M., Li Q., Shcheynikov N., Zeng W., Muallem S. 2004. "NaBC1 is a ubiquitous electrogenic Na⁺-coupled borate transporter essential for cellular boron homeostasis and cell growth and proliferation", *Molecular Cell*, 16(3), 331-341.
57. Rahl, P. B., Chen C. Z., Collins R. N. 2005. "Elp1p, the yeast homolog of the FD disease syndrome protein, negatively regulates exocytosis independently of transcriptional elongation", *Mol Cell*, 17, 841-853.
58. Reid, R. J., Hayes J. E., Post A., Stangoulis J. C. R., Graham R. D. 2004. "A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants", *Plant Cell and Environment*, 27, 1405-1414.
59. Rezanka, T., Sigler K. 2008. "Biologically active compounds of semi-metals", *Phytochemistry*, 69, 585-606.
60. Rowe, R. I., Bouzan C., Nabili S., Eckhert C. D. 1998. "The response of trout and zebrafish embryos to low and high boron concentrations is U-shaped", *Biol Trace Elem Res.*, 66(1-3), 261-70.
61. Rowe, R. I. 1999. "Boron is required for zebrafish embryogenesis", *J. Exp. Biol.*, 202, 1649–1654.
62. Scorei, R. 2012. "Is boron a prebiotic element? A mini-review of the essentiality of boron for the appearance of life on Earth", *Orig Life Evol Biosph*, 42, 3-17.
63. Shirra, M. K., McCartney R. R., Zhang C., Shokat K. M., Schmidt M. C., Arndt K. M. 2008. "A chemical genomics study identifies Snf1 as a repressor of GCN4 translation", *J. Biol. Chem.*, 283, 35889-35898.
64. Sattlegger, E., Hinnebusch A. G. 2000. "Separate domains in GCN1 for binding protein kinase GCN2 and ribosomes are required for GCN2 activation in amino-acid starved cells", *The EMBO Journal*, 19(23), 6622-6633.
65. Sole, C., Nadal-Ribelles M., Kraft C., Peter M., Posas F., de Nadal E. 2011. "Control of Ubp3 ubiquitin protease activity by the Hog1 SAPK modulates transcription upon osmostress", *EMBO J.*, 30, 3274-84.
66. Takano, J. 2002. "Arabidopsis boron transporter for xylem loading", *Nature*, 420(6913), 337-40.

67. Takano, J., Wada M., Ludewig U., Schaaf G., Wiren N., Fujiwara T. 2006. "The Arabidopsis Major Intrinsic Protein NIP5:1 Is Essential for Efficient Boron Uptake and Plant Development under Boron Limitation", *The Plant Cell*, 18, 1498-1509.
68. Tamás, M. J., Sharma, K. S., Ibstedt, S., Jacobson, T., Christen, P. 2014. "Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation", *Biomolecules*, 4, 252-267.
69. Tanaka, M., Fujiwara T. 2008. "Physiological Roles and Transport Mechanisms of Boron: Perspectives from Plants", *Eur J Physiol*, 456, 671–677.
70. Teixeira, M. C., Monteiro P., Jain P., Tenreiro S., Fernandes A. R., Mira N.P., Alenquer M., Freitas A. T., Oliveira A. L., Sá-Correia I. 2006. "The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*", *Nucleic Acids Res.*, 34, 446-51.
71. Thompson, D. M., Lu C., Green P. J., Parker R. 2008. "tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes", *RNA*, 14, 1-9.
72. Thompson, D. M., Parker R. 2009. "The RNase Rny1p cleaves tRNA and promotes cell death during oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*", *J. Cell Biol.*, 185, 43-50.
73. Uluisik, I., Kaya A., Unlu E. S., Avsar K., Karakaya H. C., Yalcin T., Koc A. 2011a. "Genome-wide identification of genes that play a role in boron stress response in yeast", *Genomics*, 97(2), 106-111.
74. Uluisik, I., Kaya A., Fomenko D. E., Karakaya H. C., Carlson B. A., Gladyshev V. N., Koc A. 2011b. "Boron stress activates the general amino acid control mechanism and inhibits protein synthesis", *PLoS ONE*, 6(11), e27772.
75. Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü. "Dünya Bor Rezervlerinin Dağılımı (2012)". <http://www.boren.gov.tr/tr/bor/bor-rezervleri>
76. Valenzuela, L., Aranda C., Gonzales A. 2001. "TOR modulates GCN4-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation", *Journal of Bacteriology*, 183, 2331-2334.
77. Vazquez de Aldana, C. R., Marton M. J., Hinnebusch A. G. 1995. "GCN20, a novel ATP binding cassette protein and GCN1 reside in a complex that mediates activation of the eIF-2 α kinase GCN2 in amino acid-starved cells", *EMBO J.*, 14, 3184-3199.
78. Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H. 2009. "Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants", *Curr Opin Plant Biol.*, 12, 364-72.
79. Virgilio, C., Loewith R. 2006. "The TOR signaling network from yeast to man", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38, 1476-1481.
80. Warrington, K. 1923. "The effects of boric acid and borax on the bread bean and certain other plants", *Ann. Bot.*, 37, 629-672.

81. Warren, D. T., Andrews P. D., Gourlay C. W., Ayscough K. R. 2002. "Sla1p couples the yeast endocytic machinery to proteins regulating actin Dynamics", *J. Cell Sci.*, 115, 1703-15
82. Wlodarski, T., Kutner J., Towpik J., Knizewski L., Rychlewski L., Kudlicki A., Rowicka M., Dziembowski A., Ginalski K. 2011. "Comprehensive structural and substrate specificity classification of the *Saccharomyces cerevisiae* methyltransferome", *PLoS One*, 6.
83. Wolkenstein, K., Gross J. H., Falk H. 2010. "Boron-containing organic pigments from a Jurassic red alga", *PNAS*, 107(45), 19374-19378.
84. Woods, W.G. 1994. "An introduction to boron: History, sources, uses, and chemistry", *Environmental Health Perspective*, 102, 5–11.
85. Yazbeck, C., Kloppmann W., Cottier R., Sahuquillo J., Debotte G., Huel G. 2005. "Health impact evaluation of boron in drinking water: a geographical risk assessment in northern France", *Environ Geochem Health*, 27, 419–427.
86. Yeast Genome Database. <http://www.yeastgenome.org/>
87. York, W. S., Darvill A. G., McNeil M., Albersheim P. 1985. "Structure of plant-cell walls: 16. 3-Deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO) is a component of rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the primary-cell walls of plants", *Carbohydr Res*, 138, 109-126.
88. Zurita-Martinez, S. A., Cardinas M. E. 2005. "Tor and cyclic AMP-protein kinase A: Two parallel pathways regulating expression of genes required for cell growth", *Eukaryotic Cell*, 63-71.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 110T917
Proje Başlığı: Bor toksisitesinin moleküler mekanizmalarının araştırılması
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof. Dr. Ahmet Koç (Yürütücü) Araştırmacılar: Doç.Dr. Çağlar Karakaya
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 35430, Urla, İzmir
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.05.2011 – 01.05.2014
Öz (en çok 70 kelime) Proje kapsamında; bor fazlalığında ortaya çıkan toksisitenin sebepleri, hücrelerin bu toksisiteye verdikleri cevaplar ve eksikliğinde bor dirençliliği sağlayan ya da bor duyarlılığına neden olan genlerin etki mekanizmaları araştırılmıştır. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> model organizması kullanılarak klonlama, beta-galaktozidaz denemeleri, real time PCR, western ve northern blot, kütle spektrometresi analizleri sonucu bor toksisitesinde ol oynayabilecek yollara işaret edilmiştir.
Anahtar Kelimeler: Borik asit, bor toksisitesi, ATR1, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , GCN4, translasyonel regülasyon, transkripsiyonel regülasyon
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/>
Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: “Boron stress activates the general amino acid control mechanism and inhibits protein synthesis.” Uluisik I, Kaya A, Fomenko D.E., Karakaya H.C., Carlson B.A., Gladyshev V.N., Koc A., PLoS ONE 6(11): e27772. doi:10.1371/journal.pone.0027772, 2011.

(Makale)

“Boron exhibits its toxicity by inhibiting protein synthesis”, İrem Uluisik and Ahmet Koc, EMBO Young Scientists' Forum, June 2012, İstanbul, Türkiye. (Poster Sunumu)

“Boron stress response in *Saccharomyces cerevisiae*”, İrem ULUISIK, Small Meeting on Yeast Transport and Energetics (SMYTE), 24-28 September 2013, Antalya, Türkiye. (Sözlü Sunum)