

**Borun biyolojik etki mekanizması; Bor metabolizmasında
rol oynayan genlerin bulunması**

Proje No: 104T213

Doç. Dr. Ahmet KOÇ
Yrd. Doç. Dr. Çağlar Karakaya
Alaattin Kaya
İrem Uluişik

NİSAN 2010
İZMİR

ÖNSÖZ

Bu projede maya hücreleri model olarak kullanılarak borun biyolojik etki mekanizması araştırılmış, bor dirençliliği ve duyarlılığına neden olan genler tespit edilmiştir. Proje kapsamında DNA mikroarray analizleri, genomik DNA tarama yöntemleri, maya delesyon seti tarama yöntemleri kullanılarak yapılan analizler sonucu bor toksisitesi, dirençliliği ve duyarlılığı ile ilgili bir çok gen ve biyokimsayar yolak tespit edilmiştir.

Proje çalışmaları esnasında bazı yöntemler ve analizler hususunda bizlere yardımcı olan Nebraska Üniversitesi'nden Dr. Dmitri Fomenko ile Harvard Tıp Fakültesinden Dr. Vadim Gladyshev'e teşekkürlerimizi sunarız.

Bu proje TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubu tarafından desteklenmiş ve Doç. Dr. Ahmet Koç yürütücülüğünde tamamlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	7
ABSTRACT	8
1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER.....	9
1.1. Bor Biyokimyası.....	9
1.2. Borun canlı organizmalardaki fonksiyonu ve gerekliliği	9
1.3. Bor yetersizliği ve toksisitesi.....	10
1.4. Bitkilerde ve hayvanlarda bor alınımı ve taşınımı.....	11
1.5. Maya ve bor ilişkisi	12
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
2.1. Kullanılan maya suşları ve besiyerleri	13
2.2. Bor içermeyen besiyerinin geliştirilmesi.....	13
2.3. Maya genomik DNA kütüphanesi taraması	13
2.4. Li-Ac metoduyla maya transformasyonu	13
2.5. Bor toleranslarının belirlenmesi	14
2.6. DNA mikroarray analizleri.....	14
2.7. RNA izolasyonu ve real-time PCR analizleri	15
2.8. <i>ATR1</i> ve <i>VAN1</i> genlerinin aşırı ifadenmesi	15
2.9. Hücre içi bor konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	15
2.10. Protein lokalizasyonu.....	16
2.11. Western blot analizleri	16
2.12. Polizom profillemesi.....	16
2.13. S-35 metiyonin işaretlemesi	17
2.14. <i>ATR1</i> , <i>BOR1</i> , <i>DUR3</i> ve <i>FPS1</i> 'in prokaryot ve ökaryotlardaki karşılaştırmalı genomik analizleri.....	17
2.15. Çoklu sekans dizileri.....	17
3. BULGULAR	18
3.1. Maya hücrelerinin bor toleranslarının ölçülmesi	18
3.2. Bor içermeyen besiyerlerindeki maya büyümesi	19
3.3. Bor dirençliliği gösteren mutantların tespiti	20
3.4. Dirençli mutantların hücre içi bor konsantrasyonları.....	23
3.5. Dirençli mutantlarda ilgili genlerin klonlanması ve bor toleransındaki katkıları.....	24
3.6. Bora karşı duyarlı mutantların karakterizasyonu	26
3.7. Maya genomik DNA kütüphanesi kullanılarak bor dirençliliği sağlayan genlerin aydınlatılması.....	30
3.8. <i>ATR1</i> 'in bir bor dirençlilik geni olarak tanımlanması.....	31
3.9. <i>ATR1</i> 'in borun hücre dışına atılmasındaki görevi.....	34
3.10. <i>ATR1</i> 'in maya stres toleransındaki rolü.....	35
3.11. Bor muamelesine karşı maya hücrelerinin transkripsiyonel cevaplarının DNA mikroarray tekniği ile incelenmesi	36
3.12. <i>Atr1</i> proteininin hücredeki lokalizasyonu	41
3.13. İlave amino asit uygulamasının bor dirençliliğine etkisi	43
3.14. <i>ATR1</i> paraloglarının analizi	43
3.15. <i>QDR3</i> geninin bor toleransına etkisi	45
3.16. <i>SNQ2</i> geninin bor toleransına etkisi	45
3.17. Diğer türlerdeki <i>ATR1</i> homologlarının analizi.....	46
3.18. <i>ATR1</i> geninin transkripsiyonel kontrolü	48
3.19. Rekombinant <i>Atr1</i> proteini eldesi ve antikor üretimi	52
3.20. Borun protein sentezi üzerindeki etkileri.....	53
4. TARTIŞMA/SONUÇ/ ÖNERİLER	58
REFERANSLAR	60
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU.....	63

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Maya hücrelerinin bor toleranslarının ölçülmesi	18
Şekil 2. Üç farklı yabancı tip maya hücresinin bor toleransları	19
Şekil 3. Borsuz ortamda maya hücrelerinin büyümesi.....	20
Şekil 4. Bora dirençli maya hücreleri ve büyüebildikleri bor konsantrasyonları	21
Şekil 5. Mutantların % cinsinden hücre içi bor miktarları	23
Şekil 6. Mutantların mg/L cinsinden hücre içi bor miktarları	24
Şekil 7. Bora dirençlilik gösteren haploid maya mutantları	24
Şekil 8. Bora dirençlilik gösteren diploid maya mutantları	25
Şekil 9. Mutantlarda olmayan genlerin plazmit üzerinden aşırı ifadeleneşinin yabancı tip hücrelerdeki bor toleransına etkisi.....	25
Şekil 10. Mutant hücrelerde <i>ATR1</i> in aşırı ifadeleneşinin bor toleransına etkisi.....	26
Şekil 11. Bora duyarlılık gösteren maya mutantları	27
Şekil 12. Bora karşı duyarlılık gösteren 21 haploid mutantın homozigot diploid sette taranması.....	28
Şekil 13. 200 mM borik asit varlığında büyüeyebilen genomik DNA kütüphanesi ile transforme edilmiş yabancı tip hücreler	30
Şekil 14. Boş plazmit, <i>ATR1</i> ve <i>VAN1</i> genlerini taşıyan plazmitlerle transforme edilmiş yabancı tip maya hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda borik asit içeren YNB ortamlarındaki bor dirençlilikleri	32
Şekil 15. <i>ATR1</i> geninin bor dirençliliği sağladığının gösterilmesi	33
Şekil 16. <i>atr1Δ</i> , <i>bor1Δ</i> , <i>dur3Δ</i> ve <i>fps1Δ</i> mutantlarının bor toleranslarının karşılaştırılması....	34
Şekil 17. Yabancı tip ve <i>atr1Δ</i> mutantının hücre içi bor seviyeleri	35
Şekil 18. <i>ATR1</i> ifadeleneşinin sağladığı stres toleransı	36
Şekil 19. Bor ile muamele edilmiş hücrelerde gen ekspresyon analizleri. Borik asite cevaben ifadelenen genler	37
Şekil 20. Bor ile muamele edilmiş hücrelerde gen ekspresyon analizleri. Bor muamelesi ile ifadeleneşisi artan ya da azalan transporter genler	38
Şekil 21. İfadeleneşimlerinde değişim gözlenen ve amino asit metabolizmasında rol oynayan genler.....	39
Şekil 22. İfadeleneşimlerinde değişim gözlenen transkripsiyon faktör genleri	39
Şekil 23. İfadeleneşimlerinde değişim gözlenen fosfataz ve kinazlar	40
Şekil 24. <i>ATR1</i> mRNA seviyelerinin real-time PCR analizi	40
Şekil 25. Bor muamelesi ile <i>ATR1</i> , <i>BOR1</i> , <i>DUR3</i> , <i>FPS1</i> genlerinin transkripsiyonel regülasyonunu gösteren mikroarray sonuçları	41
Şekil 26. <i>Atr1</i> 'in lokalizasyonu	42
Şekil 27. Maya <i>ATR1</i> paraloglarının çoklu sekans uyumu analizi	43
Şekil 28. <i>atr1Δ</i> mutantı ve paraloglarının bor toleransı bakımından karşılaştırılması	44
Şekil 29. <i>ATR1</i> paraloglarının yabancı tip hücrelerde ifadeleneşinin bor toleransına etkisi ..	44
Şekil 30. <i>QDR3</i> delesyonu ve aşırı ifadeleneşinin bor toleransına etkisi	45
Şekil 31. <i>atr1Δ</i> ve <i>snq2Δ</i> mutantlarının farklı konsantrasyonlarda borik asit içeren YPD besiyerlerindeki büyümeleri	46
Şekil 32. <i>SNQ2</i> ifadeleneşinin bor toleransına etkisi.....	46
Şekil 33. <i>ATR1</i> 'in üç domaindeki dağılımı	48
Şekil 34. Haploid transkripsiyon faktör mutantlarının bor duyarlılıklarının karşılaştırılması....	49
Şekil 35. Bor muamelesi sonucunda transporter genlerinin transkripsiyon faktör mutantlarında ifadeleneşimlerinin mikroarray ile gösterilmesi.....	50
Şekil 36. Bor muamelesi sonucunda amino asit genlerinin transkripsiyon faktör mutantlarında ifadeleneşimlerinin mikroarray ile gösterilmesi.....	51
Şekil 37. <i>ATR1</i> ifadeleneşim seviyesinin real time PCR ile belirleneşisi	52
Şekil 38. <i>Atr1</i> proteininin SDS jelde gösterilmesi.	53
Şekil 39. Yabancı tip hücrelerde bor uygulanmamış ve 100 mM borik asit uygulanmış polizom profilleri	54

Şekil 40. Radyoaktif metiyoninin yeni sentezlenen proteinlere girmesi	55
Şekil 41. GCN4-MYC western blot analizi	56
Şekil 42. ATR1-GFP western blot analizi	56
Şekil 43. eIF2 α -P için western blot analizi	57
Şekil 44. Borun eIF2 α fosforilasyonundaki etkisinin S577'nin defosforilasyonuna ve GCN2'nin tRNA bağlama aktivitesine bağlı olduğunun western blot analizi ile gösterilmesi.....	57

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Bora duyarlılık gösteren mutantlar ve fonksiyonları.....	29
--	----

ÖZET

Bor bitkilerde ve hayvanlarda bulunan temel mikroelementlerden biridir ve biyolojik sistemlere sıvı ortamdan borik asit şeklinde alınır. Ancak borun hücre içerisindeki spesifik rolü ve bunların moleküler mekanizmaları bilinmemektedir. Bu proje kapsamında bor transportu ve fonksiyonunu anlamak amacıyla yapılan genetik çalışmalar ile model organizma olan maya hücrelerinde (*Saccharomyces cerevisiae*) bor dirençliliği ve duyarlılığı sağlayan genler tespit edildi. Bor metabolizmasında rol oynayan genleri tespit etmek için genomik ve proteomik yöntemler kullanıldı. İlk başta yüksek kopya sayılı genomik DNA kütüphanesi taranarak yabancı tip hücreleri bora karşı dirençli hale getiren genler tespit edildi. Bu çalışmaların sonucunda *ATR1* geninin kodladığı proteinin hücre içerisine giren boru hücre dışına pompalayarak bor dirençliliği sağlayan bir membran transport proteini olduğu tespit edildi. Daha sonra maya delesyon seti (4700 mutant) taranarak yabancı tip hücrelerin yaşayamadığı toksik konsantrasyonlarda bor içeren ortamlarda büyüeyebilen 6 delesyon mutanti tespit edildi. Benzer şekilde yabancı tip hücrelerin etkilenmediği düşük borlu ortamlarda dahi büyüemeyen 21 adet bor duyarlı delesyon mutanti elde edildi. Bu çalışmalara ilave olarak bor stresine maruz kalmış hücrelerin genomik ve proteomik ifadenme profilleri incelendi. Bor stresine maruz bırakılmış hücrelerde *ATR1* mRNA seviyesi yaklaşık 4 kat artmakta ve bu artış *GNC4* transkripsiyon faktörü çıkartılmış hücrelerde gerçekleşmemektedir. Bor stresinde *ATR1* ifadenmesine paralel olarak amino asit sentezi yapan ve genel amino asit kontrol sistemine dahil olan genlerin ifadenmeside ciddi derecede artış göstermektedir. Bor varlığında hücrelerin protein sentezi yapamadığı bor stresine maruz kalmış hücrelerde polizom analizleri, eIF2 apha altünitesinin fosfatlanması ve radyoaktif 35-S metiyonin işaretlemesi yöntemleri ile tespit edilmiştir. Ayrıca bora karşı dirençli olan 6 delesyon mutantında translasyon esnasında wobble baz modifikasyonu işleminden sorumlu genlerin olmayışı protein sentezi ve bor toksisitesi arasında bir ilişki olduğunu teyit etmektedir.

Anahtar Kelimeler

Borik asit, *ATR1*, *Saccharomyces cerevisiae*, bor dirençliliği, *GCN4*, translasyonel regülasyon, genomik, proteomik

ABSTRACT

Boron is an essential micronutrient for plants and it is either necessary or beneficial for animals. Studies identified only few genes related to boron metabolism thus far and details of how boron is imported into cells and used in cell metabolism are largely unknown. In order to identify genes that play role in boron metabolism, we screened a yeast genomic DNA library for genes that confer resistance to this element in *Saccharomyces cerevisiae* and found that that *ATR1* functions as a boron efflux pump and is required for boron tolerance. We screened the entire set of yeast haploid deletion mutants and identified 6 mutants that were resistant to toxic levels of boron, and 21 mutants that were highly sensitive to boron treatment. Furthermore, we performed a proteomic approach to identify additional proteins that are significantly up-regulated by boron treatment. Boron treatment activated the expression of *ATR1* and many genes that are regulated by general amino acid control in a *GCN4* dependent manner. Polysome analyses and 35-S methionine labelling assays suggested that boron blocks protein synthesis which was confirmed by phosphorylation of eIF2 alpha in boron treated cells. Overall, our results revealed many genes and pathways related to boron stress response and suggest a possible link between boron toxicity and translational control.

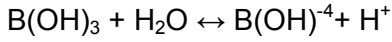
Key Words

Boric acid, *ATR1*, *Saccharomyces cerevisiae*, boron tolerance, *GCN4*, translational regulation, genomics, proteomics

1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

1.1. Bor Biyokimyası

Bor (B); 10.81 g/mol atomik kütleyle sahip, periyodik tabloda Grup 3'e ait olan metalloid bir elementtir (Bolanos et al. 2004). Bor doğal olarak oluşan bir elementtir ve çevrede birçok ortamda bulunmaktadır. Hayvanlarda ve insanlarda en yaygın olarak bulunan formu olan borik asit (H_3BO_3), renksiz ve kokusuzdur ve suda kolayca çözünebilen şeffaf kristal yapıda ya da beyaz granüler toz halinde bulunmaktadır (NRC, 2005). Bor doğada sodyum ve oksijenle bir kombinasyon halinde bulunmaktadır. Oksijen ve azot gruplarına bağlı bor içeren organik bileşikler organobor bileşikleri olarak adlandırılmaktadır. Bu bileşikler bitki, hayvan ve insan dokularında bulunmaktadır ve özellikle cis-hidroksil grubu içeren biyomoleküllerle etkileşime girmektedir. Bu biyomoleküllere örnek olarak riboflavin, adenzin-5-fosfat, piridoksin, pirimidin nükleotitleri ve şeker molekülleri verilebilir (Hunt, 2007). Borik asit bir Lewis asitidir ($K_a = 6 \times 10^{-10}$, pK_a 9,1) ve proton donörü olmaktan ziyade hidroksil iyonu akseptörüdür. Böylelikle tetrahedral $B(OH)_4^-$ anyonunu oluşturur.



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 (EPA, 2004). Bu bileşikler aynı zamanda geç alev alıcı malzeme olarak, herbisit, insektisit, katalist olarak kullanılmaktadır (Woods, 1994).

1.2. Borun canlı organizmalardaki fonksiyonu ve gerekliliği

Bor, ilk olarak 1923'de Warington tarafından bitki büyümesi ve gelişimi için temel bir mikrobesein olarak bulunmuştur (Warington, 1923). Daha sonra yapılan çalışmalar ile borun bitkiler ve hayvanlar için esasi bir mineral olduğu doğrulanmıştır. Borun mikrobiyolojik sistemlerde, bitkilerde ve hayvanlarda pek çok fizyolojik ve metabolik olayda rol oynadığı düşünülmektedir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu anda ise tüm bu organizmalara toksik etki göstermektedir (Nielsen, 1997).

Bor, bitkilerde nükleik asit metabolizmasında, karbonhidrat ve protein metabolizmasında, hücre duvarı sentezinde ve yapısında, membran bütünlüğünün korunmasında önemli roller

oynamaktadır (Moseman, 1994; Miwa, 2007). Ancak bu rollerin moleküler mekanizmaları çoğunlukla bilinmemektedir. Son zamanlarda borun bitkilerde moleküler seviyede bir primer fonksiyonu bulunmuştur. Bitki hücre duvarındaki ramnogalakturanon II için bir bağlayıcı olarak fonksiyon göstermektedir. Ramnogalakturanon II bir pektindir ve bu pektinlerin çapraz olarak bağlanmaları yaprakların uzaması için gereklidir (O'Neill, 2004).

Hayvanlarda embriyolojik gelişme esnasında borun gerekli olduğu ilk olarak zebra balığı ve alabalık embriyolarında gözlemlenmiştir (Rowe, 1998, 1999). Aynı zamanda diatomlar cyanobakteriler, deniz algleri ve kurbağalar için de esansiyeldir. Bor hayvanlarda da çeşitli mekanizmaları etkilemektedir. Bunlar arasında; karbonhidrat metabolizması, mineral metabolizması, enerji tüketimi, çeşitli enzimlerin aktivitelerinin düzenlenmesi, embriyonik gelişme sayılabilir. Ancak borun hayvanlardaki fonksiyonunun moleküler mekanizmaları henüz anlaşılammıştır (Tanaka, 2008).

İnsanlar yiyeceklerinden, içme sularından ve bazı tükettikleri ürünlerden (kozmetik, deterjan, sabun vs) bora maruz kalmaktadırlar. Borun insanlar için zorunluluğu henüz gösterilmemiştir, ancak yararlı etkileri olduğu bir gerçektir. 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, 2004). Borun sözü edilen bu fonksiyonlarının moleküler mekanizmalarının ortaya çıkarılması ve anlaşılması gerekmektedir.

1.3. Bor yetersizliği ve toksisitesi

Bor bitkiler ve hayvanlar için önemli bir besindir. Bu canlıların büyümesi ve gelişmesi için gerekli olduğu halde, yüksek konsantrasyonlarda bulunması da toksik etki yaratmaktadır.

Bitkilerde bor yetersizliğinin yarattığı semptomlar ilk olarak bitkinin büyüyen ve uzayan organlarında görülmektedir. Yaprak ve kök uzaması, çiçek ve meyve gelişimi inhibe olmaktadır. Aynı zamanda anormal hücre duvarı oluşumu, sitoiskelet polimerizasyonunun değişmesi, membran potansiyeli ve geçirgenliğinin değişmesi de görülebilen diğer belirtilerdir. Bor toksisitesinde ise hücre bölünmesi yavaşlamakta, fotosentez oranı azalmakta ve olgun yapraklar nekrotik hale gelmektedir (Juan, 2008).

Hayvanlarda ve insanlarda bor eksikliği büyüme bozukluklarına, anormal kemik gelişimine, üriner kalsiyum atılımının artmasına, kan steroid hormon seviyelerinin azalmasına ve dikkat dağınıklığına yol açmaktadır. Kurbağa ve farelerin de bor eksikliğinden kaynaklanan gelişme bozuklukları gösterdiği bulunmuştur. Borun fazla alınması ise böbreklerin hasar görmesine, ishal, kilo kaybı, anormal iskelet gelişimine neden olmaktadır. Aynı zamanda fare ve

köpeklerde testislerin zayıflamasına ve hamile hayvanlarda kardiyovasküler sorunlara yol açtığı gözlenmiştir (Yazbeck, 2005).

1.4. Bitkilerde ve hayvanlarda bor alınımı ve taşınımı

Esasi mikrobelerin metabolizmasında genel olarak besini hücre içine transfer eden özel taşıyıcı sistemler ve hücre içinde de bu besinlerin regülasyonunu yapan çeşitli faktörler vardır.

Bitkiler boru topraktan borik asit formunda almaktadır. Kökten alındıktan sonra bor üst kısımlardaki sürgünlere ulaştırılmak üzere ksileme yüklenmektedir. Ksilemdeki çözünmüş maddelerin uzun mesafelere taşınımı transpirasyon ile kolaylaşmaktadır. Bor da transpirasyonun yoğun bir şekilde gerçekleştiği olgun geniş yaprakların kenarlarına kadar taşınmaktadır (Brown, 1997).

İnsan ve hayvanlarda ise bor alınımının fizyolojik ve moleküler mekanizmaları konusunda yeterli bilgi yoktur. Meyve ve sebzeler primer bor kaynaklarını oluşturmaktadır. Bor kolaylıkla gastrointestinal ve soluk borularından absorblanabilmektedir ve %90'ından fazlası hızla atılmaktadır. Dokulardaki bor konsantrasyonları homeostasis ile sabit tutulmaktadır. Ancak bu homeostasisin mekanizması bilinmemektedir (Devirian, 2003).

Borun bitkiler için zorunlu besin olduğu bir gerçektir. Bu yüzden bor ile ilgili çoğu çalışmada model organizma olarak bitkiler kullanılmıştır. Dolayısıyla bor transportu ve toleransı ile alakalı çeşitli bitki genleri bulunmuştur. Uzun yıllar borun hücre içine alınma mekanizması anlaşılabilmiştir. Son zamanlara kadar bitkilerde bu olayda pasif difüzyonun rol oynadığı düşünülmüştür. Ama en son çalışmalarla borun membran transportuyla ilgili üç mekanizma ortaya çıkarılmıştır. Bunlardan ilki pasif difüzyondur (Hu ve Brown, 1997). Bir majör intrinsik protein olan NIP5:1 *Arabidopsis thaliana*'da borik asit kanalı olarak bulunmuştur. Bununla birlikte ikinci bir mekanizma ortaya çıkmıştır. Bu da borun, su ve diğer küçük, yüksüz moleküllerin membranda transportunu sağlayan majör intrinsik proteinlerin (MIP) rol aldığı kolaylaştırılmış difüzyon ile taşınımıdır (Takano, 2006). Bunlara ek olarak bor transporterlarıyla borun aktif olarak taşınması da üçüncü mekanizmadır. Örneğin *BOR1* geni *Arabidopsis thaliana* köklerinde borun dışarı atılması için gereklidir. *BOR1* geninin homoloğu hayvanlarda ve mayada tespit edilmiştir (Takano, 2002). Ancak bor transport mekanizmaları hala yeterince açık değildir.

Arabidopsis thaliana BOR1 aynı zamanda bor toleransında rol oynadığı bulunan ilk genidir (Takano, 2002). Ancak borun yüksek konsantrasyonları kendi transporterını (*BOR1*) degradasyona uğratmaktadır. Dolayısıyla *A. thaliana BOR1*, yüksek seviyelerde bor içeren topraklarda büyüeyebilen genetik olarak modifiye edilmiş bitkilerin oluşturulmasında

kullanılmamaktadır (Takano, 2005). Fakat *BOR1*'in 6 paraloğundan biri olan *BOR4*'ün ifadelenildiği transgenik bitkiler, borun toksik seviyelerine karşı yüksek tolerans göstermiştir (Miwa, 2007).

1.5. Maya ve bor ilişkisi

Maya hücreleri üzerinde yapılan araştırmalar sonucu hücrelerin bor eksikliğine maruz kaldığı zaman bölünemediği ve hücre döngüsünün durduğu, fakat ortama bor ilave edildiğinde hücrelerin tekrar normal hale geldiği ve yüksek dozda bor verildiğinde maya hücrelerinin zehirlendiği tespit edilmiştir (Bennett, 1999).

Saccharomyces cerevisiae; hızlı bölünebilmesi, basit ortamlarda yetiştirilebilmesi, haploid veya diploid olarak büyütülebilmesi, ekstrakromosomal genlerin kolayca ifadelenebilmesi ve genom seviyesinde bütün genlerinin biliniyor olması nedeni ile bor genlerinin tespitinde gerekli olacak genetik ve biyokimyasal analizlerin yapılması için en uygun organizmadır. Bu nedenle bitki bor tolerans genlerini karakterize etmek için model organizma olarak kullanılmaktadır. 10 mM borik asit *Arabidopsis* için letal iken, maya 80 mM bor varlığında bile büyüebilmektedir ve bu yüzden bora toleranslı bir organizma olarak değerlendirilmektedir (Kaya, 2009). Maya Bor1'i (*YNL275w*) detaylı bir şekilde karakterize edilmiştir. Bu protein plazma membranında lokalize olmakta ve borik asitin dışarı atılmasında rol oynamaktadır. Bor1'e ilave olarak Dur3 ve Fps1'in de mayada bor toleransı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir ancak bu transporterların bor detoksifikasyonundaki fonksiyonları belli değildir. Dur3, üre ve poliamin transportunda rol alan bir membran transporterıdır. Fps1 ise majör intrinsik proteinlerinin bir üyesidir ve gliserol, asetik asit, arsenit ve antimonit transportunda rol almaktadır (Nozawa, 2006).

İlk olarak *gcn4Δ* mutantlarının 3-amino-1,2,4-triazol sensitivitesinin baskılayıcısı olarak karakterize edilen *ATR1*'in (Kanazawa, 1988); bir başka genetik taramada DNA hasar ajanı olan 4-nitrokinolin-*N*-oksit'e karşı dirençlilik sağladığı bulunmuştur (Mack, 1988). Maya Atr1'i membranı saran 14 segmentten oluşmaktadır ve ilaç: proton antiporterlarına ait DHA2 ailesinin bir üyesidir (Gbelska, 2006). Bunlara ek olarak bir maya genomik DNA kütüphanesi taranmış ve *ATR1* 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* ifadelenmesinin de bor muamelesiyle kontrol edildiği ortaya çıkarılmıştır (Kaya, 2009).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan maya suşları ve besiyerleri

Bu çalışmada haploid yabani tip *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (MATa *his3 leu2, met15 ura3*), homozigot diploid yabani tip BY4743 (MATa/ α *his3 Δ 1/his3 Δ 1 leu2 Δ 0 /leu2 Δ 0 lys2 Δ 0/LYS2 MET15/met15 Δ 0 ura3 Δ 0 /ura3 Δ 0) 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.*

2.2. Bor içermeyen besiyerinin geliştirilmesi

Bora özgü bir reçine olan Amberlite IRA 743 (Sigma) satın alınmıştır. Zengin besiyeri hazırlandıktan sonra, %1 (w/v) oranında IRA-743 ile 37 °C'de 1 saat/200 rpm çalkalanmıştır. Ardından reçineler santrifügasyon ile çöktürüldükten sonra besiyerinden uzaklaştırılmıştır. Otaklavlanarak steril hale getirilen besiyerinin bor içerik analizi atomik spektroskopik bir yöntem olan ICP-OES (Inductively coupled plasma optical emission spectrometry) ile yapılmıştır.

2.3. Maya genomik DNA kütüphanesi taraması

YEpl3 plazmidi içerisindeki maya genomik DNA kütüphanesi ticari olarak ATCC'den temin edilmiştir (no: 37323). Kütüphane plazmidleri *Escherichia coli*'den MaxiPrep kiti (Invitrogen) kullanılarak pürifiye edilmiştir. Elde edilen bu plazmidlerle, standart LiAc metodu kullanılarak, transforme edilen yabani tip maya hücreleri (BY4741) 100 mM borik asit içeren YNB besiyerinde 30°C'de 5 gün süreyle inkübe edilmişlerdir. 100 mM borik asit varlığında büyüeyebilen 30 koloni seçilerek daha yüksek bor konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır (125–200 mM). Seçilen transformantlardan plazmidler izole edilmiştir ve daha sonra bu plazmidler vektöre özel primerler ile sekanslanmıştır.

2.4. Li-Ac metoduyla maya transformasyonu

Maya hücreleri logaritmik faza ulaşana kadar YPD besiyerinde büyütülmüş ve ardından distile su ile yıkanmıştır. Hücre pelleti 0,1 M Li-Ac ile süspansiyon haline getirilir. Ardından

santrifügasyon ile yeniden pellet haline getirilen hücrelere 240 µl PEG (50 % w/v), 36 µl (1 M) LiAc, 5 µl ssDNA, 10 µl DTT (0,3 mM), 20 µl plazmit DNA, 10 µl dH₂O eklenir ve 1 dakika vortekslenir. 30°C çalkalamalı inkübatörde 30 dakika inkübe edilir. Arkasından 20–25 dakika 42°C sıcak su banyosunda ısı şokuna uğrattılır. Böylelikle transforme edilmiş hücreler ilgili seçici besiyerlerine ekilerek inkübe edilirler ve büyümeleri gözlenir.

2.5. Bor toleranslarının belirlenmesi

Bor kaynağı olarak borik asit kullanılmıştır. Yabani tip maya hücrelerinin bor toleransının belirlenmesi için sıvı besiyeri ile yapılan deneylerde YPD içerisine 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM ve 100 mM konsantrasyonlarında borik asit ilave edilmiştir. Önceki günden kültüre alınmış yabani tip (BY4741) maya hücreleri OD₆₀₀ spektrumları 0.05 olacak şekilde borlu besiyerlerinde seyreltilmiş ve 30°C /250 rpm de inkübe edilmişlerdir. Her iki saatte bir spektrum ölçümleri yapılarak hücrelerin büyüme hızları tespit edilmiştir. Katı besiyeri ortamında da yabani tip ve seçilen maya mutantları bor toleransı göstermeleri bakımından analiz edilmişlerdir. Bir gece boyunca büyümüş hücreler optik densiteleri 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 edilir ve hücrelerin koloni oluşturup oluşturmadığına bakılmıştır. Yabani tip hücre ile mutantlar arasındaki bor sensitivite farkları gözlenmiştir.

2.6. DNA mikroarray analizleri

200 ml YPD içerisinde büyüyen ve optik densiteleri 0,2 ile 0,3 arasında olan hücreler ikiye bölünerek bir grup kontrol grubu olarak kullanılarak borik asit eklenmezken; diğer grup 1 saat 20 mM borik asite maruz bırakılmıştır. Ardından santrifügasyon ile toplanan hücreler -80°C'de saklanmıştır. Ambion RiboPure maya kiti kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmıştır. İki renkli mikroarray hibridizasyonları için kullanılan floresan etiketli cRNA'ları oluşturmak için Agilent two-color low RNA input linear amplification kiti kullanılmıştır. Karışım reaksiyonundaki floresan işaretli cRNA'lar Qiagen RNeasy minikit kullanılarak pürifiye edilmiştir. cRNA örnekleri Agilent SureHyb hibridizasyon tamponu ile karıştırılmıştır. Hibridizasyonlar; 65°C'de 17 saat 10 rpm'de dönen Agilent SureHyb hibridizasyon çemberlerinde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu takiben mikroarray slaytları 1 dakika boyunca Gene Expression wash buffer 1 (6 x SSPE [1 x SSPE is 0.18 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, and 1 mM EDTA {pH 7,7}], 0.005% N-lauroylsarcosine at room temperature) ve Gene Expression wash buffer 2 ile yıkanmıştır. Yıkanan mikroarray slaytları kısa bir süreliğine asetonitril

solüsyonunda bekletildikten sonra kurutulup Agilent Technologies G2505B mikroarray tarayıcısı ile taranmıştır.

2.7. RNA izolasyonu ve real-time PCR analizleri

Total RNA RNeasy minikiti (Qiagen) kullanılarak izole edilmiştir. Genomik DNA'yı uzaklaştırmak için DNase enzimiyle (DNase RQ1; Promega) muamele yapılmıştır. Ardından First Strand cDNA synthesis kit (Fermentas) kullanılarak cDNA sentezlenmiştir. Bu cDNA'lar *ATR1* geninin 186bp'lik bir fragmentini ve kontrol olarak, *ACT1* geninin 103bp'lik bir fragmentini çoğaltmak için kullanılmıştır. Real-time PCR denemeleri IQ5 real-time PCR system (Bio-Rad) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan PCR şartları ise kısaca şöyledir: 30 çevrim- 94°C/ 30 sn, 62°C/ 30 sn, 72°C/30 sn.

2.8. *ATR1* ve *VAN1* genlerinin aşırı ifadenmesi

ATR1 ve *VAN1* genleri Pfu polimeraz enzimi (Fermentas) kullanılarak maya genomik DNA'sından çoğaltılmıştır. Çoğaltılan bu kısımlar sırasıyla BamHI ve XhoI restriksiyon bölgeleri içermektedir. Çoğaltılan fragment öncelikle pBluescript II KS (Stratagene) plazmitinin SmaI kısmına klonlanmıştır ve arkasından bir maya yüksek kopya ekspresyon vektörü olan p426GPD'nin BamHI/XhoI kısmına taşınmıştır. Böylelikle bir p426-*ATR1* ekspresyon ürünü oluşturulmuştur. Daha sonra maya hücreleri boş vektör olan p426 ya da p426-*ATR1* ile transforme edilmiş ve urasil prototrofi ile seçilmişlerdir.

2.9. Hücre içi bor konsantrasyonlarının belirlenmesi

Eksponansiyel olarak büyüyen hücreler 50 mM- 75 mM borik asit ile 1 saat muamele edilmiş ve santrifügasyon ile toplamıştır. Toplanan hücreler 3 kez distile su ile yıkanmış ve -80°de saklanmış ya da hemen denemede kullanılmıştır. Hücreler öncelikle 500 µl lizis tamponda (20 mM Tris, pH 7,6, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8, 2, Triton X-100, %1 SDS, 10 mg/ml protease inhibitor cocktail [Sigma], 500 µl glass beads) vorteks kullanılarak parçalanmıştır. Süpernatantlar yeni tüplere aktarılmış ve Bradford protein dedeksiyon yöntemi kullanılarak protein konsantrasyonları belirlenmiştir. Seyreltilmiş hücre ekstraktlarının bor konsantrasyonları boron cell test kit (Merck, Germany) kullanılarak belirlenmiştir ve hücre ekstraktında bulunan total protein miktarıyla normalize edilmiştir. Bor seviyeleri aynı zamanda ICP-MS metoduyla da doğrulanmıştır.

2.10. Protein lokalizasyonu

Kromozomal *ATR1* geni, C ucundan GFP ile etiketlenmiştir (13). Kullanılan primerler ile arka arkaya PCR'lar yapıp; GFP ve *Kluyveromyces lactis TRP1* markerini içeren bir kaset çoğaltılmıştır. Oluşturulan bu PCR fragmanı ile yabancı tip W3031-a (*MATa ade2 ura3 leu2 trp1 his3*) hücreleri transforme edilmiş ve YNB-Triptofan seçici besiyerinde büyüeyebilen transformantlar seçilmiştir. Daha sonra bu hücreler konfokal floresan mikroskobu ile analiz edilmiştir.

2.11. Western blot analizleri

İlgili maya suşları logaritmik faza ulaşıncaya kadar YPD besiyerinde büyütülmüşlerdir. Her suş için eşit sayıda hücre santrifügasyon ile toplanmıştır. Elde edilen hücre ekstraktları ile SDS-PAGE yapılmış ve ardından PVDF membrana blotlama yapılmıştır. İlgili proteinlere ait birincil antikorlar ve HRP konjuge edilmiş ikincil antikorlar ticari olarak elde edilmiştir. Sinyal görüntüleme amacıyla SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate solüsyonları (Pierce) kullanılmıştır.

2.12. Polizom profillemesi

Bu deneme; sükröz densite gradiyenti, örneklerin homojenizasyonu ve fraksiyonların toplanması olarak 3 kısımda incelenebilir. İlk olarak 1M NaCl, 1M MgCl₂, 1M Tris-HCl, RNase inhibitor (Fermentas) içeren %5'lik ve % 70'lik sükröz solüsyonları hazırlanır. Bu solüsyonlar ile ISCO sistemi kullanılarak sükröz gradiyentleri hazırlanmıştır. Optik densiteleri yaklaşık 0,7 ile 0,9 arasında olan, 30 ml'de büyütülen ve 1 saatlik 50 mM ve 100 mM borik asit ile muamele edilmiş hücreler santrifügasyonla toplanmıştır. 2 kez distile su ile yıkanmış ve -80°C'de pellet halinde dondurularak saklanmıştır. Denemenin yapılacağı gün total RNA elde etmek için; hücre pelletleri -80°C'den çıkarılmış ve 5 ml Lizis tamponu (100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 30 mM Tris-HCl (pH=7), 30 U/ml RNase inhibitor, 1% Triton X-100, 1% NaDOC, 100 ug/ml cycloheximide) içerisinde homojenize edilmiştir. Aynı zamanda cam boncuk ve vorteks ile muamele edilerek hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. 8 dakika buzda inkübasyondan sonra homojenat 4°C'de, 10 dakika, 12.000 x g'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant önceden hazırlanmış olan sükröz gradiyentlerine yayılır ve SW28 rotoru (Beckman Coulter Optima™ L-XP Ultracentrifuge System) kullanılarak 4°C'de, 2.55 saat, 27.000 rpm'de çökelmesi sağlanmıştır. Ultrasantrifüjden sonra ISCO Tris pompası kullanılarak gradiyentin en üstünden itibaren 40 fraksiyon toplanırken, 254 nm'deki absorpsiyon da ISCO monitoründe gözlenmiştir. Toplanan fraksiyonlardan daha sonra

kullanılmak üzere fenol-kloroform metodu ile RNA ekstraksiyonu yapılmış ve -80°C'de saklanmıştır.

2.13. S–35 metiyonin işaretleme

BY4741 maya hücreleri 200 ml YNB besiyerinde 600 nm'deki optik densiteleri 0,5 olana kadar büyütülmüştür. Ardından 100 ml'sine 20 mM borik asit uygulanırken; 100 ml'si kontrol grubu olarak kullanılmıştır. 1 saat inkübasyon sonunda her iki grup da 0.5 mCi EXPRE35S35S Protein Labeling Mix (Perkin-Elmer) ile 30 dakika muamele edilmiştir. Santrifügasyon ile toplanan hücreler üç kez PBS tamponuyla yıkanmış ve 10 dakika boyunca cam boncuklarla parçalanmaları sağlanmıştır. Ortaya çıkan hücre lizatları protein konsantrasyonlarına göre normalize edilip her birinden 10 µg SDS-PAGE' e yüklenmiştir. Burada ayrılan proteinler daha sonra PVDF membrana transfer edilmiştir. ³⁵S-işaretlenmiş proteinler Storm PhosphorImager System (Amersham Biosciences) ile görüntülenmiştir.

2.14. *ATR1*, *BOR1*, *DUR3* ve *FPS1*'in prokaryot ve ökaryotlardaki karşılaştırmalı genomik analizleri

Sekanslanmış 45 Archaea, 547 Bacteria ve 53 Ökaryot genomu (NCBI) bor transport genlerinin oluşumu bakımından analiz edilmiştir. *S.cerevisiae* Atr1 proteini TBLASTN ve BLASTP analizlerinde query olarak kullanılmıştır. Ortolog proteinler çift yönlü BLAST testi ile belirlenmiştir.

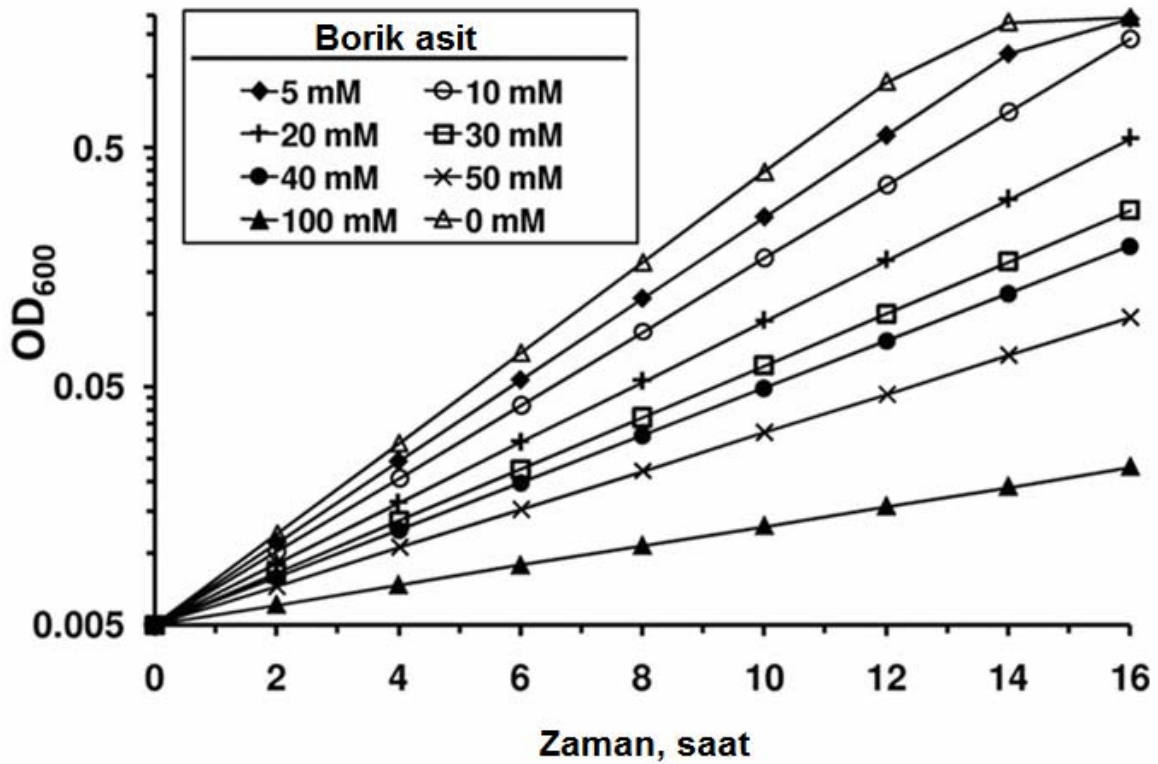
2.15. Çoklu sekans dizi analizi

Çoklu sekans dizileri varsayılan parametrelerle CLUSTALW ve T-Coffee kullanılarak yapılmıştır. Filogenetik ağaçlar Interactive Tree Of Life kullanılarak hazırlanmıştır.

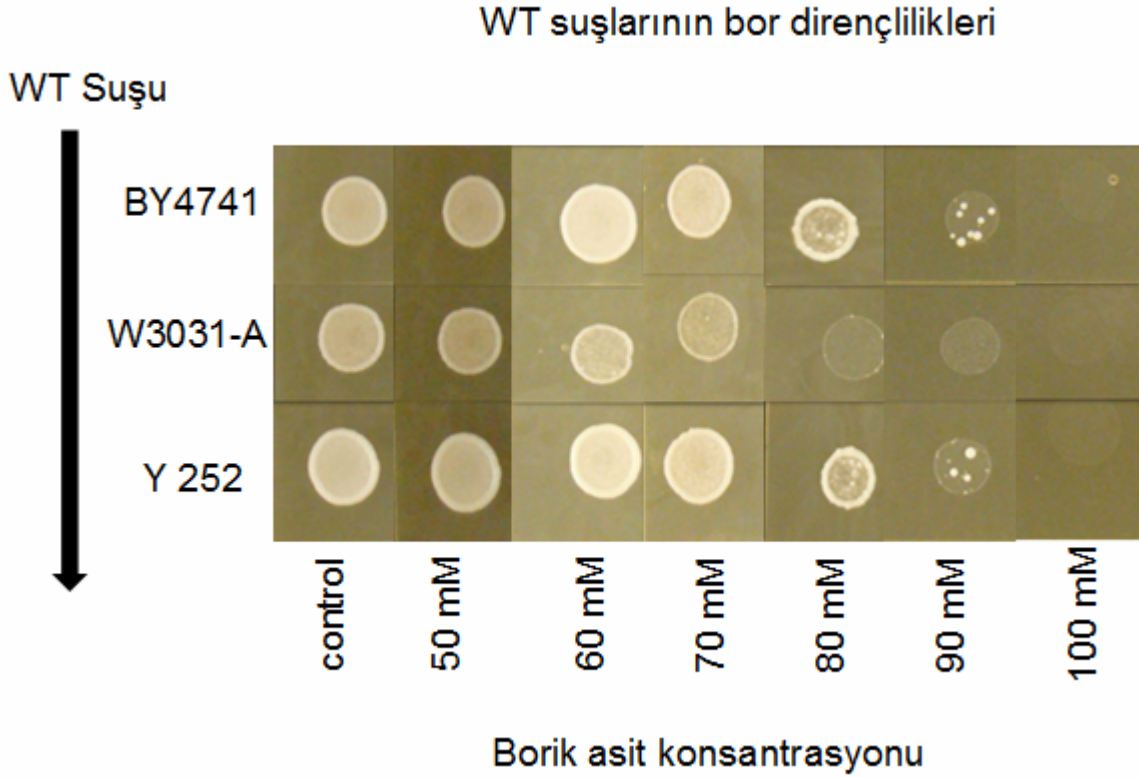
3. BULGULAR

3.1. Maya hücrelerinin bor toleranslarının ölçülmesi

Borik asitin maya büyümesi üzerindeki toksik etkileri ve yabani tip maya hücrelerinin borik asit tolerans seviyeleri daha önceki çalışmalardan bilinmektedir. Ancak farklı bir laboratuvarında farklı maya hücreleri kullanıldığı için ve belirlenen borik asit konsantrasyonunun yapılan diğer deneylerin temelini oluşturacağı için kendi yabani tip maya hücrelerimiz kullanılarak bor toleransları yeniden ölçülmüştür. Şekil 1'de, yapılan sıvı kültür denemesiyle; bor içermeyen besiyerindeki hücrelerin hızlı bir şekilde bölünerek yaklaşık 16 saat içerisinde logaritmik fazdan çıktıkları ve borik asit konsantrasyonuna bağlı olarak hücre büyümesinin olumsuz etkilendiği görülmektedir. Şekil 2'de ise farklı genetik alt yapıdaki yabani tip maya hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda borik asit içeren zengin katı besiyerlerindeki büyümeleri görülmektedir. Bu denemeye hücrelerin 80 mM borik asitin üzerindeki konsantrasyonlarda iyi büyümediği bulunmuştur.



Şekil 1. Maya hücrelerinin bor toleranslarının ölçülmesi

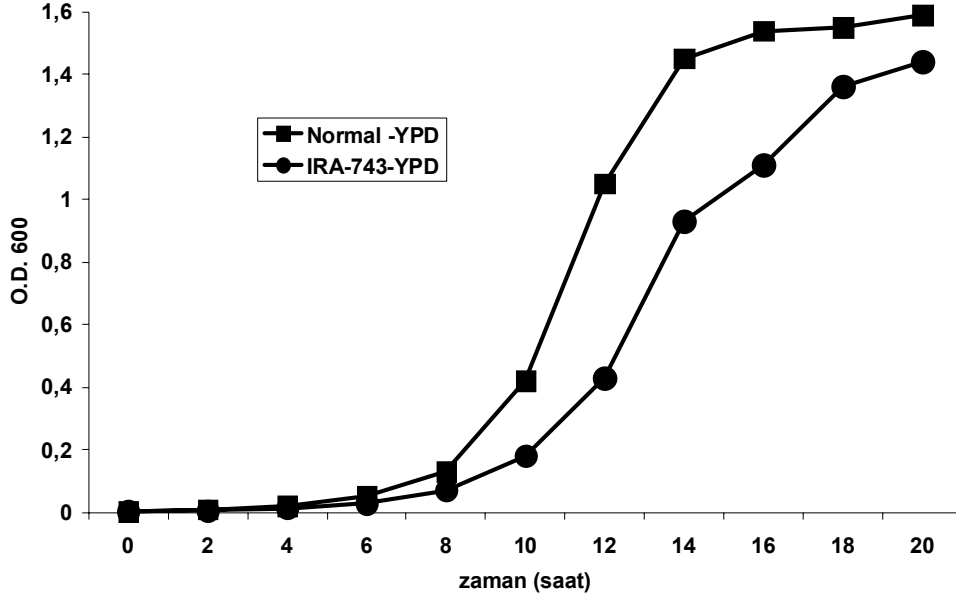


Şekil 2. Üç farklı yabancı tip maya hücrelerinin bor toleransları

3.2. Bor içermeyen besiyerlerindeki maya büyümesi

Borun hücrelerin büyümesine etki edip etmediğini anlamak için besiyerlerinden boru uzaklaştırmak gerekir. Zenginleştirici besiyeri, pepton ve maya ekstraktı içerdiği için bu karışımlar iz miktarda da olsa bor içerebilmektedir. Daha önce yapılan çalışmalar Amberlite IRA 743 adı altında ticari olarak satılan bir reçinenin atık sularda mevcut olan boru verimli bir şekilde yakaladığını göstermiştir. Bu denemede bora özgü olan bu reçine besiyeri ortamında olması muhtemel boru yakalamak için kullanılmıştır. Çıkan sonuçlara göre IRA-743 ile muamele edilmemiş zengin besiyerinde 0,4 μM ve IRA-743 ile muamele edilmiş ortamda ise 0,2 μM bor tesbit edilmiştir. Böylece deiyonize edilmiş su kullanılarak yapılan besiyerinde bor miktarının çok düşük olduğunu ve IRA-743 kullanılarak bu miktarın daha da düşürülebileceğini tesbit edilmiştir. Bu şekilde boru temizlenmiş besiyeri içerisinde hücrelerin büyüme hızları kontrol edildi. Şekil 3'de görüldüğü gibi IRA-743 ile muamele edilmiş besiyerinde hücreler daha yavaş büyüme göstermişlerdir. IRA muamelesi sonucu ortamdaki borun alınması ile hücrelerin jenerasyon hızı % 13 oranında yavaşlamıştır. Böylelikle borun

büyümede rol aldığı ve eksikliğinde hücrelerin bölünme ya da büyüme hızlarında yavaşlama olduğu sonucuna varılmıştır.



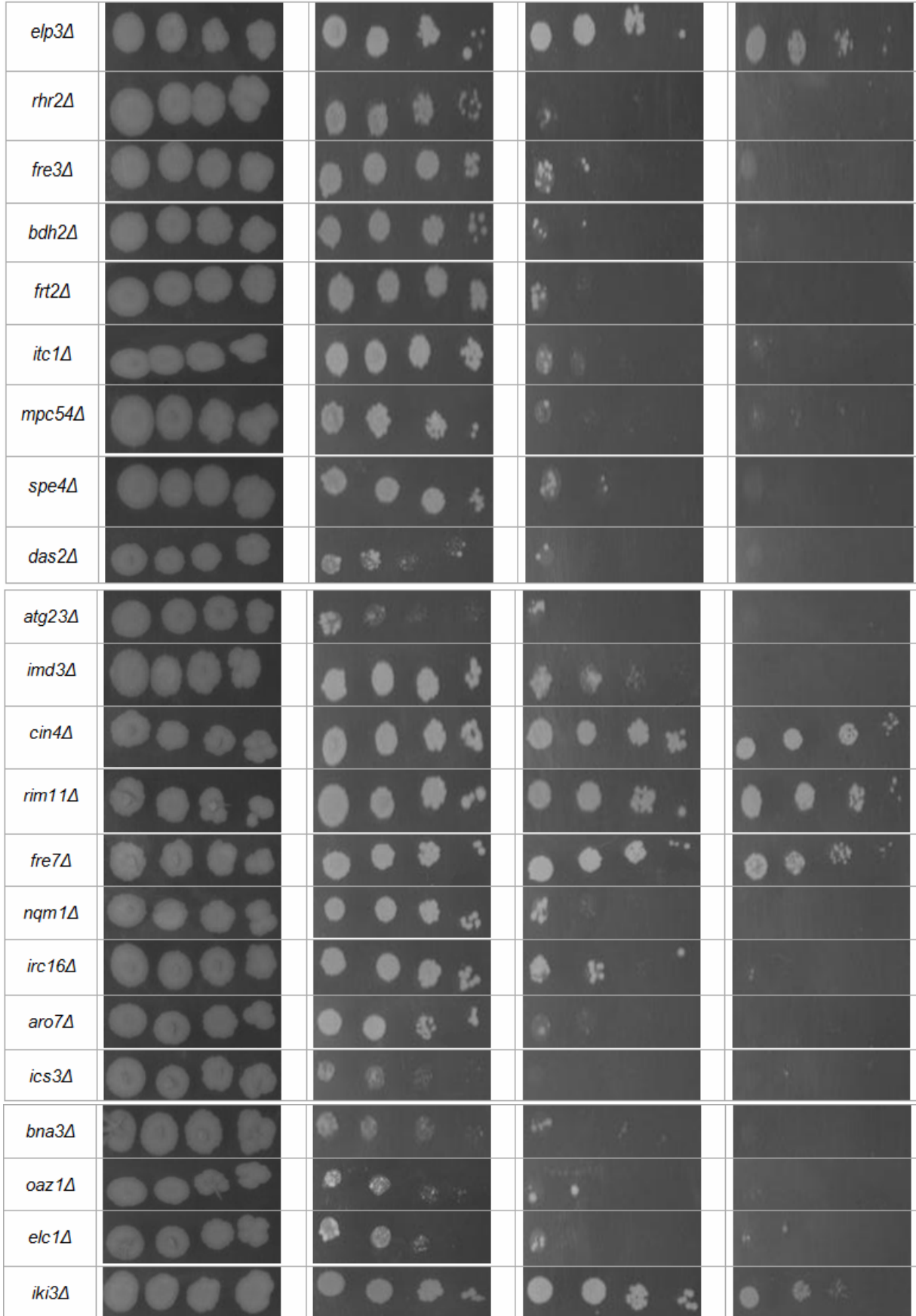
Şekil 3. Borsuz ortamda maya hücrelerinin büyümesi

3.3. Bor dirençliliği gösteren mutantların tespiti

1999 yılında Stanford Üniversitesi'nin önderliğinde yürütülen bir proje ile mayadaki bütün genler mutasyona uğratarak değişik mutasyon setleri elde edilmiştir (Winzeler, 1999). Bütün tekli mutantları içeren set ticari olarak pazarlanmaktadır. Bu mutantların kimliği önceden bilinmemektedir. Dolayısıyla tarama sonucu elde edilecek mutasyonları aydınlatmak için direkt olarak ilgili genler üzerinde çalışılacak olunması bir avantajdır. Bu denemede laboratuvarımızda mevcut olan haploid maya delesyon seti taranarak bora karşı dirençli olan mutantlar belirlenmiştir. Bunun için 100 mM borik asit ve üzerindeki konsantrasyonları içeren katı besiyerleri kullanılmıştır. Öncelikle 100 mM da büyüeyebilen 30 tane mutant izole edilmiştir. Bu hücreleri 150 mM borda büyütünce 12 tanesi ve 200 mM borda büyütünce de sadece 8 tanesi büyüeyebilmiştir. Sonuçta dirençli mutantların sayısı çalışılacak bir rakama kadar indirildiği için daha yüksek bor konsantrasyonları denenmemiştir. Mutant kütüphanesi sıralı bir şekilde replika edildiği için bütün denemeler boyunca hangi mutantın hangi noktada olduğu veya büyüüp büyümediği anında tespit edilmiştir. Şekil 4, tarama sonucu dirençlilik gösteren mutantları ve hangi bor konsantrasyonlarında büyüdüklerini göstermektedir. İlk sıradaki kontrol olarak kullanılan yabancı tip hücreler borsuz ortamda normal büyüme

gösterdikleri halde yüksek miktarda bor içeren ortamlarda büyümemişlerdir. Ancak mutant hücreler daha yüksek bor konsantrasyonunda büyüebilmişlerdir.

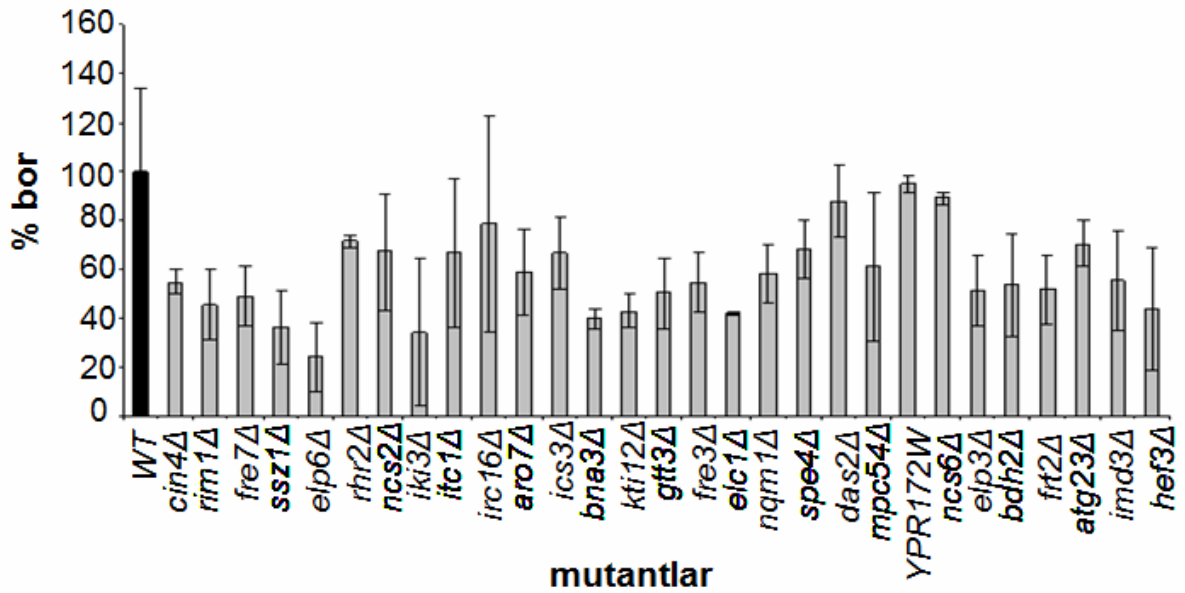
Mutantlar	YPD-0 mM borik asit				100 mM borik asit				150 mM borik asit				200 mM borik asit			
	0,2	0,02	0,002	0,0002	0,2	0,02	0,002	0,0002	0,2	0,02	0,002	0,0002	0,2	0,02	0,002	0,0002
WT																
<i>gtt3Δ</i>																
<i>hef3Δ</i>																
<i>ncs2Δ</i>																
<i>kti12Δ</i>																
YPR172W																
<i>ssz1Δ</i>																
<i>elp6Δ</i>																
<i>ncs6Δ</i>																



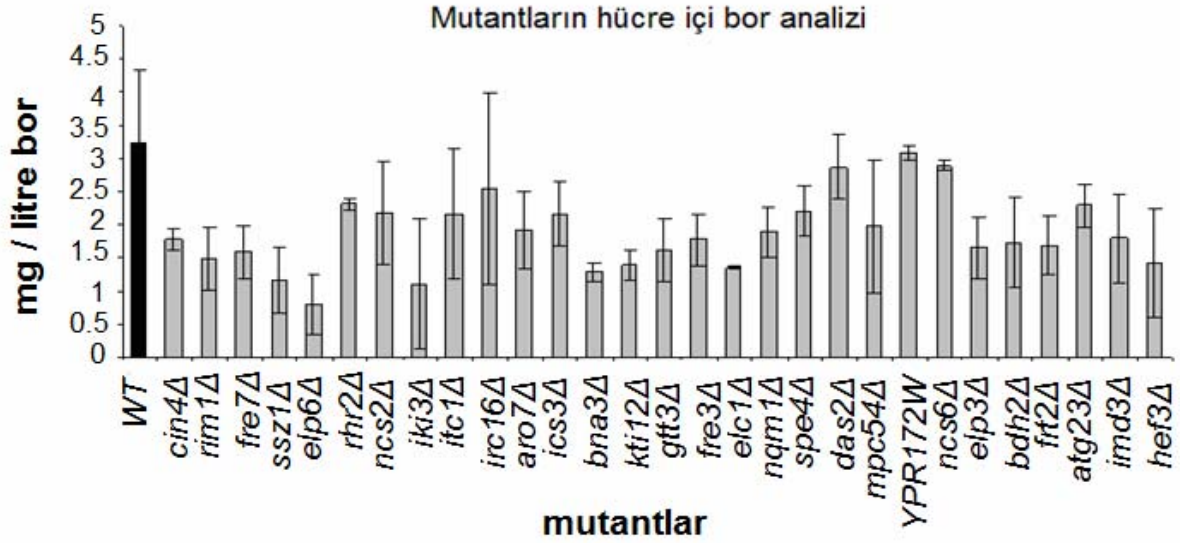
Şekil 4. Bora dirençli maya hücreleri ve büyüebildikleri bor konsantrasyonları

3.4. Dirençli mutantların hücre içi bor konsantrasyonları

İzole edilen mutantlar borlu ortamda büyütüldükten sonra hücre içi bor analizleri yapılmıştır. Bu sayede ilgili mutantların bora karşı dirençlilik mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmıştır. Yabani tip hücreler için 75 mM'ın üzerindeki borik asit konsantrasyonları hücrelere toksik etki yaptığı için bu konsantrasyon, mutantların büyüyeceği ve hücre içi bor analizlerinin yapılabileceği bor konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Zengin besi ortamında büyütülen WT ve mutant hücreler, logaritmik büyüme aşamasında iken ortamın bor konsantrasyonu 75 mM olacak şekilde borik asit ilave edildi ve hücreler normal bir hücre bölünmesi için gereken zaman kadar (90 dakika) bu ortamda inkübe edildiler. Ardından "Gereç ve Yöntem" kısmında anlatıldığı gibi toplanan hücre ekstraktlarında ticari olarak satın alınan bor miktar tayin testi (Merck, Boron Cell Test Kit) kullanılarak bor analizleri yapılmıştır. Bor analiz kiti duyarlılık bakımından ICP-MS ile kıyaslanabilecek düzeyde sonuçlar vermiştir. Sonuç olarak; 100 mM boric acid içerisinde büyüeyebilen 30 mutantın hepsi yabani tip hücrelere göre hücre içine daha az miktarda bor almıştır. Mutant hücrelerde, borun hücre içine girmemesi hücrelerin bora karşı dirençli hale gelmesini sağlamaktadır. 30 mutantın sadece 8 tanesi 200 mM boric asite karşı dirençlilik göstermektedir. 200 mM bora karşı dirençli mutantlara bakıldığında ilgili genlerin; RNA polimeraz-II'nin transkripsiyonel kontrolünde ve wobble baz modifikasyonunda (*ELP1*, *ELP3*, *NSC2*, *NSC6*), hücre içi sinyal iletimi (*RIM11*), tubulin sentezinde (*CIN4*), ve bilinmeyen fonksiyonlarda rol oynadığı (*NOP15*, *FRE7*) göze çarpmaktadır. Mutantlara ait hücre içi bor miktarları Şekil 5 ve Şekil 6'da gösterilmiştir.



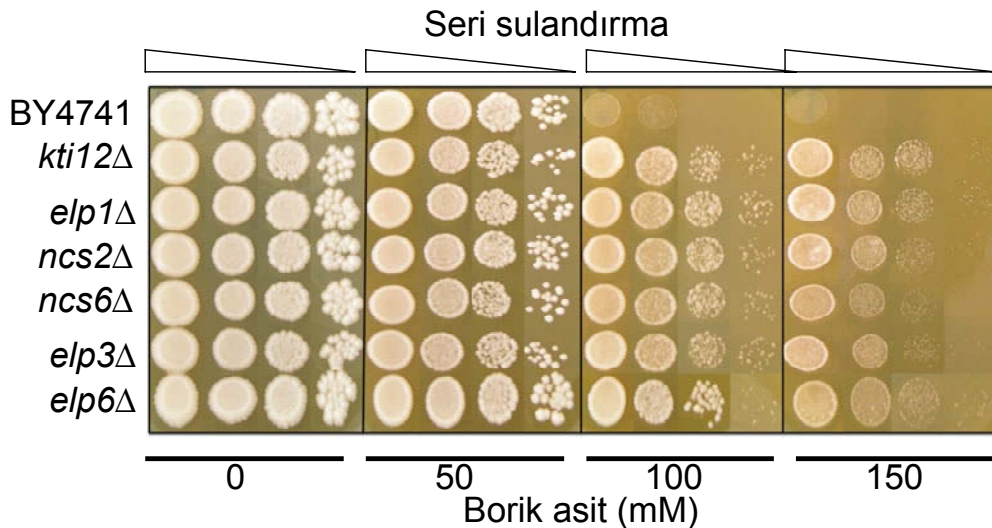
Şekil 5. Mutantların % cinsinden hücre içi bor miktarları



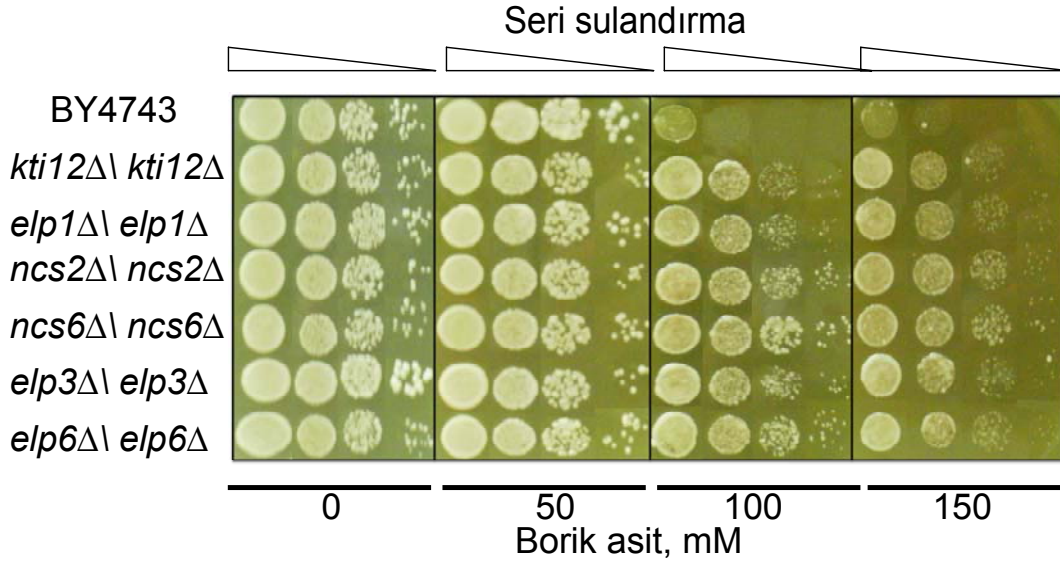
Şekil 6. Mutantların mg/L cinsinden hücre içi bor miktarları

3.5. Dirençli mutantlarda ilgili genlerin klonlanması ve bor toleransındaki katkıları

Haploid maya delesyon seti taranarak 200 mM bor varlığında büyüeyebilen mutant hücrelerin (8 mutant) homozigot diploid mutantları EUROSCARF (Frankfurt) firmasından temin edilerek benzer şekilde bor toleransları tespit edilmiştir. Haploid delesyon setinde her bir genin tek bir kopyasının olması ve çalışılan hücrelerde oluşabilecek diğer mutasyonların sonuçların yanlış yorumlanmasına neden olma durumunu önlemek amacıyla homozigot diploid delesyon mutantları da bu deneyler kapsamında kullanılmıştır. Aşağıdaki şekillerde hem haploidlerde (Şekil 7) hem de diploid delesyon setinde (Şekil 8) bor dirençliliği gösteren mutantlar gösterilmiştir (6 mutant).

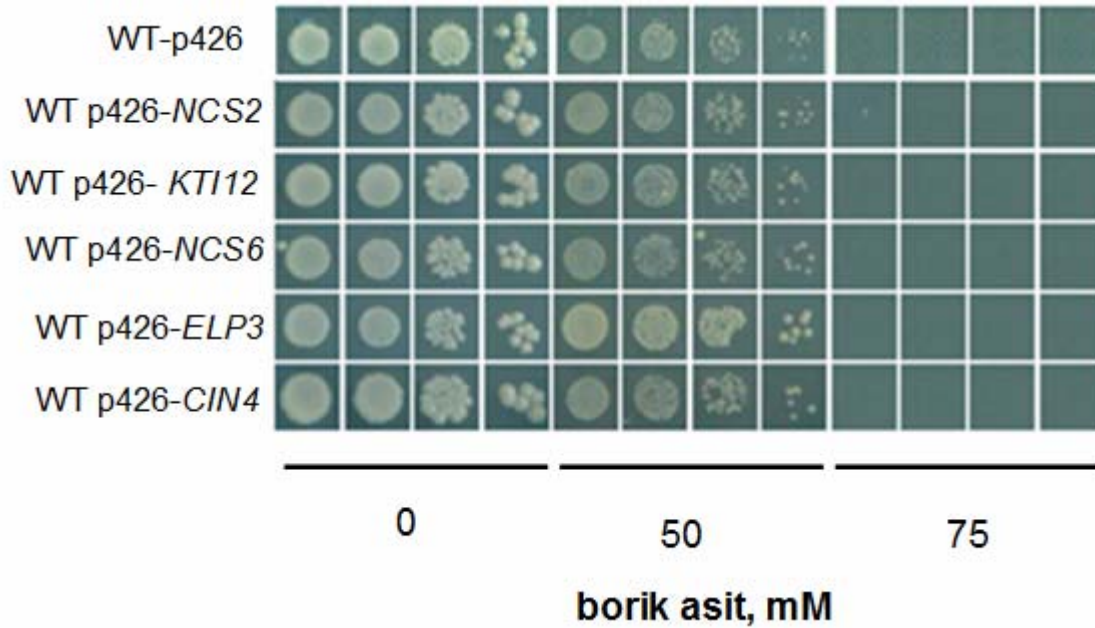


Şekil 7. Bora dirençlilik gösteren haploid maya mutantları



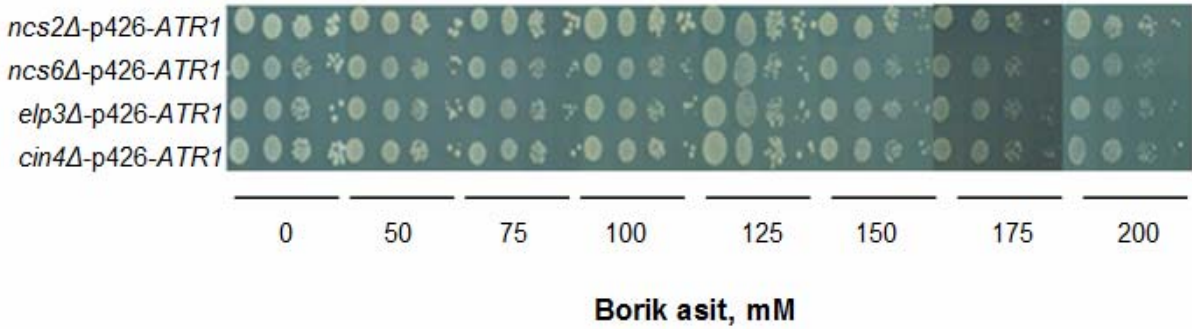
Şekil 8. Bora dirençlilik gösteren diploid maya mutantları

Yokluğunda mutant hücreleri bora karşı dirençli hale getiren bu genler klonlanarak yabancı tip maya ekspresyon vektörüne aktarılmış ve aşırı ifade edilmeleri durumunda hücrelerin bor toleransına etkileri (Şekil 9) gözlemlenmiştir. Boş plazmit içeren yabancı tip hücrelerle kıyaslandığı zaman, bu grup genlerin hücrelerde plazmit üzerinden ifade edilmelerinin bor duyarlılığına ya da direçliliğine neden olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 9. Mutantlarda olmayan genlerin plazmit üzerinden aşırı ifadenmesinin yabancı tip hücrelerdeki bor toleransına etkisi

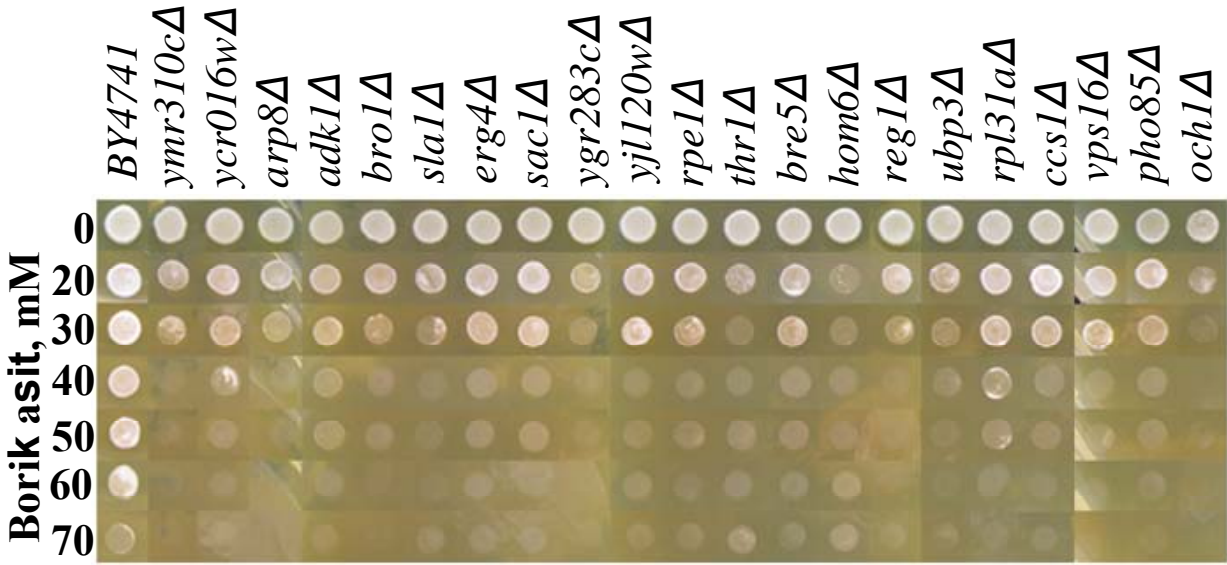
Buradaki sonuçlara göre bu genlerin doğal aşırı ifade edilmeleri bor dirençliliği bakımından bir etki yaratmamıştır. Fakat delesyonlarının bor dirençliliği sağlaması detaylı olarak araştırılması gereken bir konudur. Bu genler RNA polimeraz-II transkripsiyonel elongasyon kompleksinin bir parçası olup tRNA'lardaki wobble nükleotidlerinin modifikasyonu ile ilgili görev yapmaktadırlar. Mutant hücrelerin bora karşı dirençli olması ve *ATR1* geninin de hücrelere bor toleransı kazandırması (Kaya, 2009) fikirlerinden yola çıkılarak bazı mutant hücrelerde *ATR1* ifadenmesinin hücreleri bora karşı süper dirençli hale getirebileceği düşünülmüştür. Yapılan denemeler sonucunda *ATR1* aşırı ifadenmesinin test edilen mutant hücreleri bora karşı dirençli hale getirdiği görülmüştür. Ancak hücreler 200 mM'dan daha yüksek bor konsantrasyonlarda büyümede sorun yaşadılar ve bir süper dirençlilik durumu gözlemlenmedi (Şekil 10).



Şekil 10. Bor dirençli mutant hücrelerde *ATR1* in aşırı ifadenmesinin bor toleransına etkisi (Not. Bor dirençli delesyon mutantlarının bazıları *ATR1* ile transforme edilmişlerdir)

3.6. Bora karşı duyarlı mutantların karakterizasyonu

Bora karşı dirençli mutantların tespit edilmesinden sonra duyarlı mutantların da bulunması ve araştırılması bor metabolizmasında rol oynayan ilave genlerin bulunmasına katkıda bulunacaktır. Bu amaçla maya delesyon kütüphanesinde mevcut olan mutant hücreler içerisinde bora karşı duyarlı olan mutantlar tespit edilmiştir. Bunun için yaklaşık 4700 mutanttan oluşan maya delesyon seti 70 mM borik asite maruz bırakılmıştır ve yabancı tip mayaya göre daha az büyüme gösteren veya hiç büyüme göstermeyen 357 mutant tespit edilmiştir. Farklı borik asit konsantrasyonlarında tekrarlanan taramalar sonucunda 21 tane bora karşı duyarlı mutant elde edilmiştir (Şekil 11). Bu mutantların fonksiyonları Tablo 1'de gösterilmiştir.

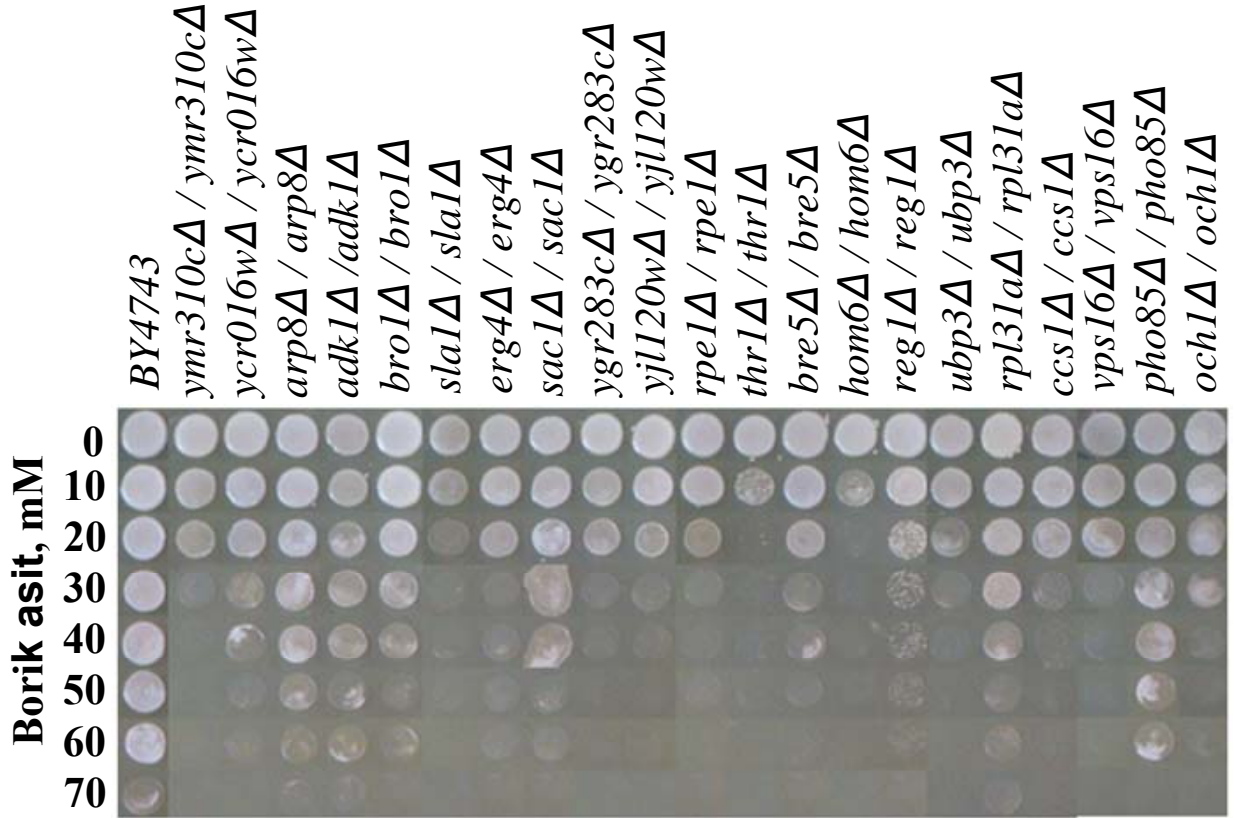


Şekil 10. Bora duyarlılık gösteren maya mutantları

İlk taramada kullanılan hücreler haploid olduklarından genomlarında meydana gelecek spontan bir değişikliğin doğrudan fenotipe yansması durumu söz konusudur. Yani farkında olmadığımız ikinci bir mutasyon hücrelerin özelliklerini değiştirebilmektedir. Diploidlerde ise ilgili genin dışında başka bir yerde meydana gelecek bir mutasyonun tolere edilmesi durumu söz konusudur. Bu yüzden ilgili mutantların bor duyarlılığı sağladığından emin olmak için diploid mutantların genetik taramalarda kullanılmasının daha doğru olacağı düşünülmüştür. Daha önce haploid delesyon setinden elde edilen bor duyarlı mutantların homozigot diploid olanları EUROSCARF'dan satın alınarak bor duyarlılık testleri yapılmıştır. İlgili genlere ait diploid mutantların da bora karşı duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Böylece daha önce haploid mutantlarla yapılmış tespitlerin doğru olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 12 ve Tablo 1).

Amino asit metabolizması ve bor toksisitesinin yakın ilişkili olduğu bilinmektedir (Kaya, 2009). Yapılan taramalar sonucunda bora karşı duyarlı olan mutantların birçok metabolik yolda rol oynayan genlerden yoksun olduğu bulunmuştur. Örneğin, amino asit metabolizmasıyla ilgili iki genin eksikliği bor duyarlılığına yol açmaktadır. Bu genler; genel amino asit kontrol mekanizmasıyla kontrol edilen ve treonin, serin, metiyonin, izolösin metabolizmasında rol alan *THR1*; treonin, serin, metiyonin ve lizin metabolizmasında rolleri olan *HOM6*'dir. Aynı zamanda bulunan delesyon mutantlarının bir kısmının veziküler ve vakuolar transport sistemleri hasarlıdır. Bu hücreler sırasıyla *VPS16*, *BRE5*, *UBP3*, *BRO1* and *SAC1* genlerinden yoksundurlar. Bu genler tarafından kodlanan proteinlerin ise otofaji, hücre duvarının korunması, salgılama, vakuol biyogenezi, endoplazmik retikulum ve golgi

arasındaki ileri ve geri taşınımlar gibi çeşitli proseslerde fonksiyonları olduğu bilinmektedir. Ortaya çıkarılan ve bor duyarlılığı ile ilgisi olduğu düşünülen diğer genler; hücre döngüsü esnasında transkripsiyonu kontrol eden ve çevresel stres koşullarına cevapta rol oynayan siklin ilişkili kinaz *PHO85*, bir antioksidan protein olan *CCS1*'dir. Ayrıca karbohidrat metabolizmasında yetersizlikleri olan bor duyarlı mutantlar da vardır (*rpe1Δ*, *reg1Δ*, *och1Δ*). Bunların dışında lipid metabolizmasındaki *ERG4* geninin eksikliği ve purin metabolizmasındaki *ADK1* geninin eksikliği de bor duyarlılığı yaratmaktadır. Ayrıca bu taramalar sonucunda fonksiyonları bilinmeyen ve bor duyarlılığı sağlayan çeşitli genler de bulunmuştur. Ancak tüm bu yollar ve bor toksisitesi arasındaki ilişki henüz bilinmemekte ve bu konuda daha ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir.



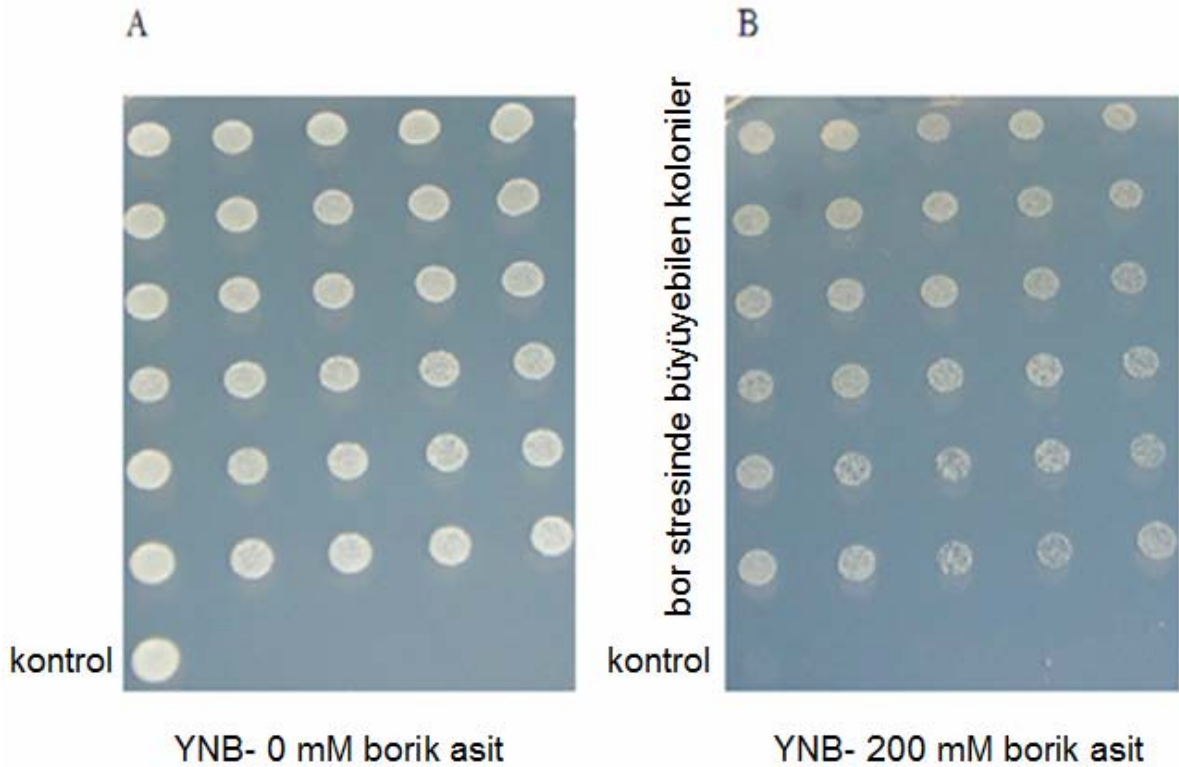
Şekil 12. Bora karşı duyarlılık gösteren diploid mutantlar

Tablo 1. Bora duyarlılık gösteren mutantlar ve fonksiyonları

Sistematik isim	Yaygın isim	Fonksiyon
YBL007C	SLA1	Sitoiskeletal protein bağlayıcı protein
YCR016W		Fonksiyonu bilinmeyen protein
YDL075W	RPL31A	Büyük ribosomal alt birimin (60S) protein komponenti
YDR028C	REG1	Tip 1 protein fosfataz Glc7p'nin düzenleyici alt birimi
YDR226W	ADK1	Adenilat kinaz
YER151C	UBP3	Ubiquitin-spesifik proteaz
YGL012W	ERG4	C-24(28) sterol redüktaz
YGL038C	OCH1	Cis-Golgi mekanizmasına ait mannoziltransferaz
YGR283C		Fonksiyonu bilinmeyen protein
YHR025W	THR1	Homoserin kinaz
YJL120W		Belirsiz protein kodlayıcı bölge
YJL121C	RPE1	D-ribuloz-5-fosfat 3-epimeraz
YJR139C	HOM6	Homoserin dihidrogenaz (L-homoserin:NADP oksidoredüktaz)
YKL212W	SAC1	Fosfatidilinositol fosfat (PtdInsP) fosfataz
YMR038C	CCS1	Süperoksit dismutaz Sod1p için bakır şaperonu
YMR310C		Fonksiyonu bilinmeyen protein
YNR051C	BRE5	Ubiquitin proteaz kofaktörü
YOR141C	ARP8	Nuklear aktin ilişkili protein
YPL031C	PHO85	Siklin ilişkili kinaz
YPL045W	VPS16	Vakuol füzyon ve protein tasnif HOPS kompleksi ve CORVET bağlayıcı kompleksinin alt ünitesi
YPL084W	BRO1	Sitoplazmik E sınıfı vakuolar protein tasnif (VPS) faktörü

3.7. Maya genomik DNA kütüphanesi kullanılarak bor dirençliliği sağlayan genlerin aydınlatılması

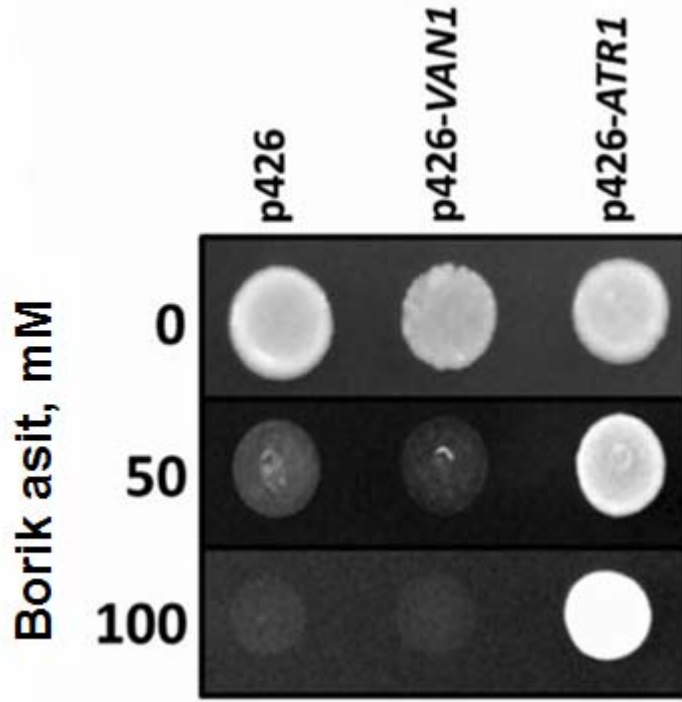
Ticari olarak ATCC firmasından (cat no #37323) Yep13 vektörü üzerinde yapılmış maya genomik DNA kütüphanesini satın alınmıştır. Bu kütüphane yaklaşık olarak 5–20 kb arasında maya genomik DNA fragmanları içermektedir ve yüksek miktarda ifadeleme işlemleri için uygundur. Kütüphane DNA'sı ile transforme olmuş hücrelerin bor toleranslarını ölçmeden önce, boş vektör taşıyan yabancı tip hücreler uygun amino asitlerle desteklenmiş YNB seçici ortamında yetiştirilerek büyümeyi sınırlayan bor konsantrasyonu tespit edilmiştir. YNB ortamı daha önce kullanmış olduğumuz zengin ortamdan (YPD) farklı olduğu için hücrelerin YNB ortamında bor toleranslarının değişebileceği düşünülmüştür. Buna göre yaklaşık 80 mM bor varlığında boş vektör taşıyan hücrelerin büyümediği tespit edilmiştir. Daha sonra genomik DNA kütüphanesi ile transforme olmuş hücreler 5 gün 100 mM borik asite maruz bırakılmışlardır. 100 mM borik asit varlığında büyüeyebilen 30 koloni tespit edilmiştir. Bu koloniler seçilerek daha yüksek miktarda borik asit içeren ortamlarda büyütülmüştür. Seçilen bütün maya kolonileri de 200 mM borik asit varlığında büyüeyebilmiştir (Şekil 13).



Şekil 13. 200 mM borik asit varlığında büyüeyebilen genomik DNA kütüphanesi ile transforme edilmiş yabancı tip hücreler. A) Bor içermeyen YNB-His kontrol besiyeri B) 200 mM borik asit içeren YNB-His besiyeri

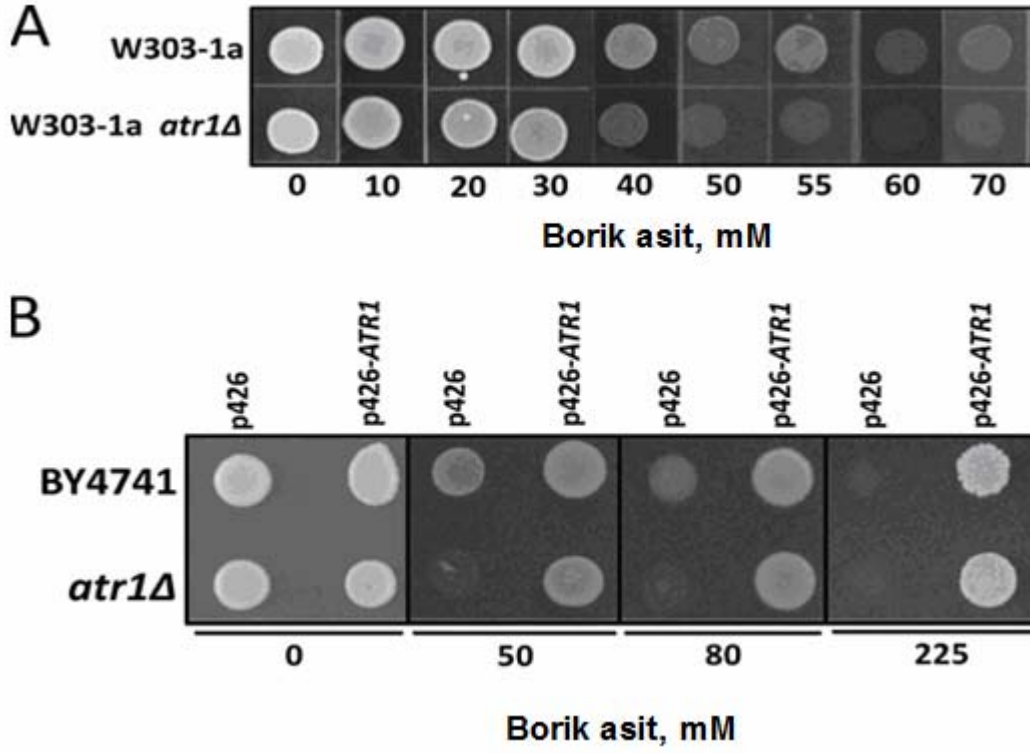
3.8. *ATR1*'in bir bor dirençlilik geni olarak tanımlanması

200 mM borik asit varlığında büyüeyebilen 30 koloniden ticari bir kit (Zymo, Yeast Plasmid Prep) yardımı ile plazmit izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra plazmite özgü primerler kullanılarak plazmitte mevcut olan genlerin sekans analizi yapılmıştır. Sekanslama sonucunda gerçekleştirilen BLAST analizleri ile bor dirençliliği sağlayan genetik materyalin bütün plazmitlerde aynı olduğu ve bunun da maya XIII. kromozomuna ait yaklaşık 5500 bp uzunluğunda bir bölgeden geldiği tespit edilmiştir. Geriye kalan transformantlardan elde edilen plazmitler de PCR yardımıyla genotiplenerek bütün izolatlarda aynı DNA fragmanın olduğu tespit edilmiştir. Böylece bora karşı dirençli 30 maya kolonisinin hepsinde genomik DNA kütüphanesinden gelen ve aynı genleri içeren fragmanların olduğu bulunmuştur. Maya genomu veritabanı kullanılarak bu kromozom bölgesi içerisinde *VAN1* (YML115c) ve *ATR1* (YML116w) olarak isimlendirilen iki tane gen bulunduğu belirlenmiştir. Bu genlerden *VAN1*'in mannan biyosentezinde ve vanadyum toleransında rol oynadığı (Kanik, 1990; Stolz, 2002); *ATR1*'in de 3-amino-1.2.4-triazole ve 4-nitroquinoline-N-oxide dirençliliğinde rol oynayan bir "multidrug efflux" pompası olduğu bilinmektedir (Gbelska, 2006; Kanazawa, 1988). *VAN1* ya da *ATR1*'in hücrelere bor dirençliliği sağlayıp sağlamadığını ortaya çıkarmak için her 2 gen de ayrı ayrı yüksek kopya sayılı maya ekspresyon vektörü olan p426GPD'ye klonlanmış ve yabancı tip hücrelerde ifade edilmişlerdir. p426-*ATR1* plazmitini ifade eden hücreler güçlü bir bor dirençliliği kazanırken p426-*VAN1* plazmitinin ifadenmesi böyle bir etki yaratmamıştır (Şekil 14). Böylece *ATR1* geninin bor toleransından sorumlu bir gen olduğu sonucuna varılmıştır.



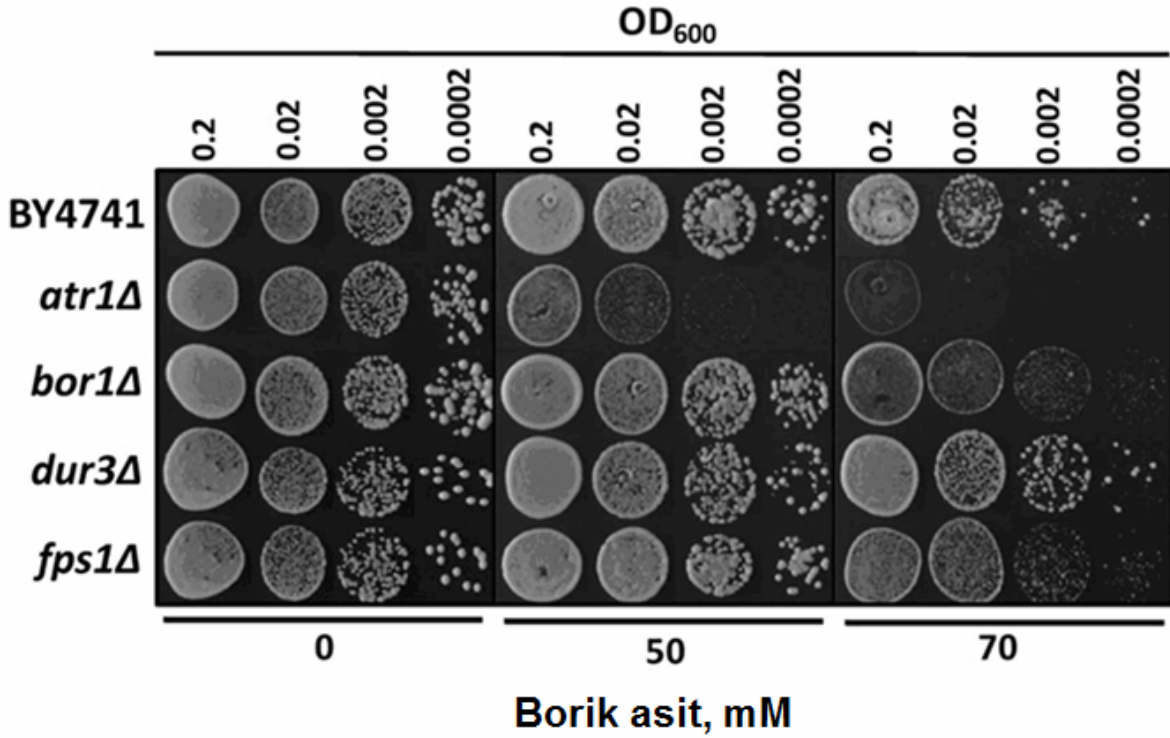
Şekil 14. Boş plazmit, *ATR1* ve *VAN1* genlerini taşıyan plazmitlerle transforme edilmiş yabancı tip maya hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda borik asit içeren YNB ortamlarındaki bor dirençlilikleri

ATR1'in delesyonunun bor sensitivitesi yaratıp yaratmadığını test etmek için yabancı tip ve *atr1Δ* mutanlığı, kontrol olarak boş plazmit (p426) ve p426-*ATR1* ile transforme edildiler ve 225 mM'a kadar farklı konsantrasyonlarda bor içeren ortamlara transfer edildiler. Şekil 15A ve B'de görüldüğü gibi iki farklı genetik alt yapıya sahip yabancı tip hücrelerdeki (W3031-a ve BY4741) *atr1Δ* mutanlığı 50 mM borik asitin üzerindeki konsantrasyonlarda büyüyemezken yabancı tip hücreler daha yüksek borik asit miktarlarını tolere edebilmişlerdir. Ayrıca *atr1Δ* mutanlığına *ATR1* geni plazmit (p426-*ATR1*) vasıtasıyla geri verildiğinde bora karşı dirençli hale gelmişlerdir. *atr1Δ* mutanlığına *ATR1* geni ifadenmesi ve yabancı tip hücrelerde *ATR1* geninin aşırı ifadenmesi; hem *Δatr1* mutanlığı hücrelere hem de yabancı tip hücrelere 225 mM borlu ortamda yaşayabilecek kadar güçlü bir dirençlilik sağlamıştır (Şekil 15B).



Şekil 15. *ATR1* geninin bor dirençliliği sağladığının gösterilmesi. A) W3031-a yabani tip hücresi ve izogenik *atr1Δ* mutantının YPD besiyerindeki bor toleransları B) *ATR1*'in ifade edildiği yabani tip ve *atr1Δ* hücrelerinin belirtilen konsantrasyonlarda borik asit içeren besiyerlerindeki büyümeleri

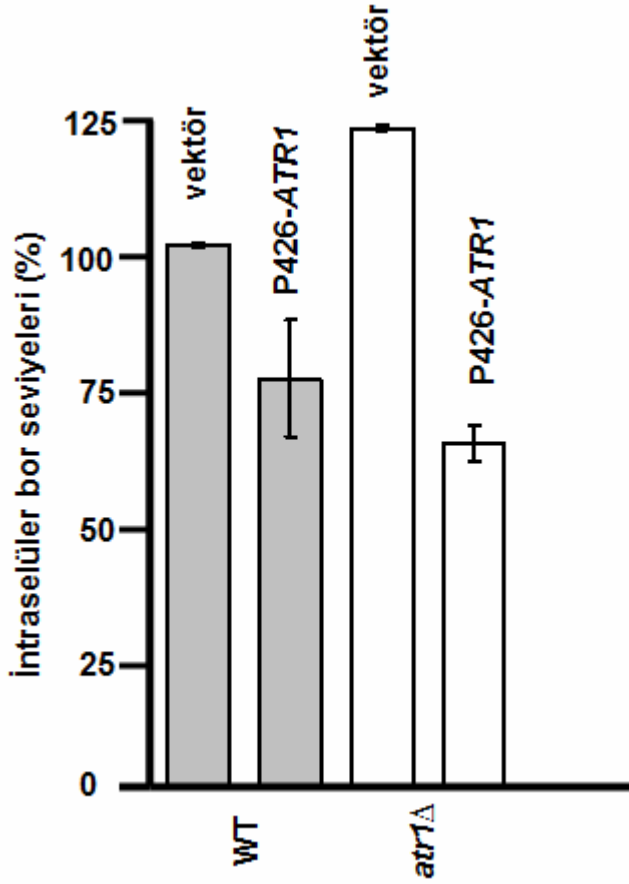
Bor toksisitesine dirençlilikte *ATR1*'in genel katkısını belirlemek amacıyla *atr1Δ* mutantının bor toleransı *bor1Δ*, *dur3Δ* ve *fps1Δ* mutantlarınıninkiyile karşılaştırılmıştır. Bu mutantlar daha önce bor dirençliliğinde rol oynadığı belirtilen genler yönünden noksanlardır. 4 mutant da bor içeren besiyerlerinde büyütülmüş ve bor toleransları karşılaştırılmıştır. *atr1Δ* mutantı bor muamelesine karşı en hassas olan mutant olarak Şekil 16'da gösterilmiştir. Bu mutantın büyümesi 50 mM borik asit ile inhibe edilirken diğer mutantlar bundan etkilenmemiştir.



Şekil 16. *atr1Δ*, *bor1Δ*, *dur3Δ* ve *fps1Δ* mutantlarının bor toleranslarının karşılaştırılması

3.9. *ATR1*'in borun hücre dışına atılmasındaki görevi

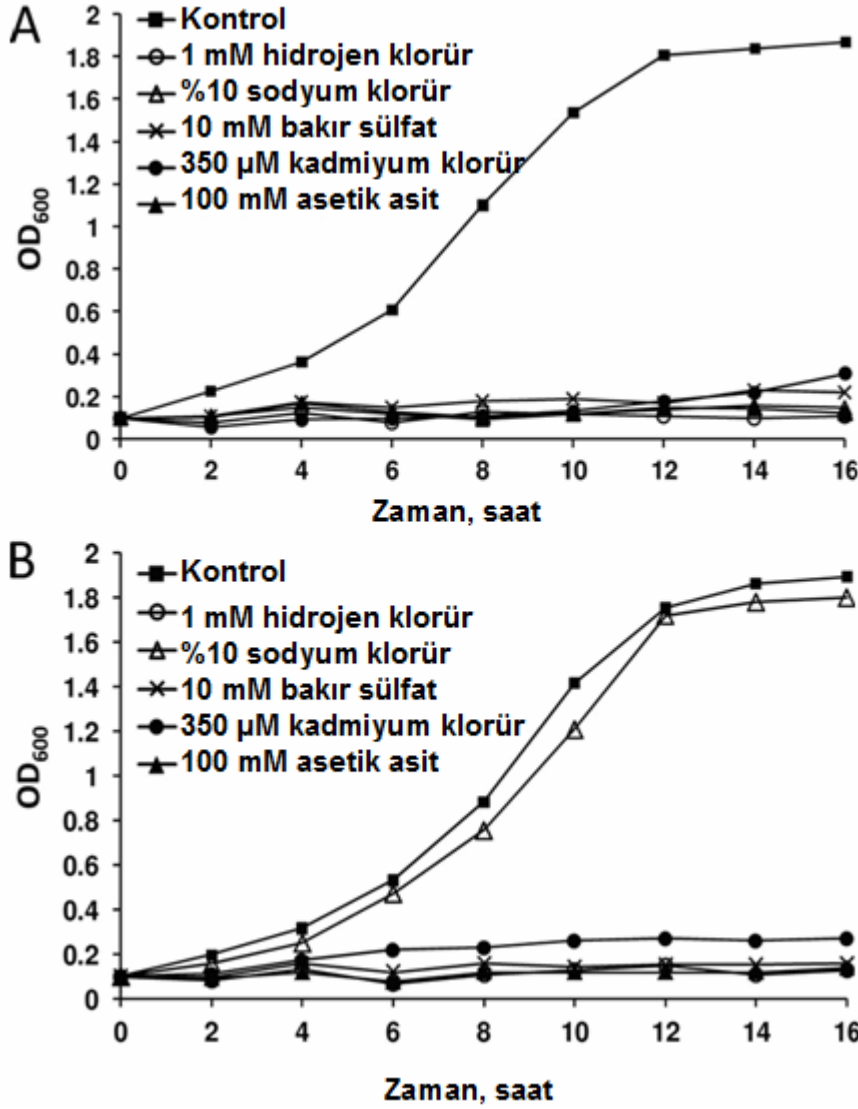
ATR1 geni bir bor dirençlilik geni olarak bulunduğundan sonra bor dirençliliğini nasıl sağladığı anlamaya çalışılmıştır. *ATR1* ile ilgili önceki çalışmalar Atr1 proteininin bir membran proteini olduğunu ve efflux pompası olarak görev yaptığını göstermektedir. Dolayısıyla Atr1 proteini hücre içindeki boru hücre dışına pompalayarak bora karşı dirençlilik sağlıyor olabilir. Bu hipotezi test etmek için yabani tip ve *atr1Δ* mutantının hücre içi bor konsantrasyonları ölçülmüştür. Şekil 17'de gösterildiği gibi *atr1Δ* hücreleri yabani tipe göre %21 daha fazla bor içermektedir. *ATR1*'in ifadenmesi hücre içi bor konsantrasyonlarını *atr1Δ* hücrelerinde %47, yabani tip hücrelerde ise %25 oranında azaltmıştır. Böylelikle *ATR1* geninin yokluğu borun hücre içerisinde birikmesine neden olurken, genin ifadenmesi borun hücreden atılmasına öncülük etmektedir.



Şekil 17. Yabani tip ve *atr1*Δ mutantının hücre içi bor seviyeleri

3.10. *ATR1*'in maya stres toleransındaki rolü

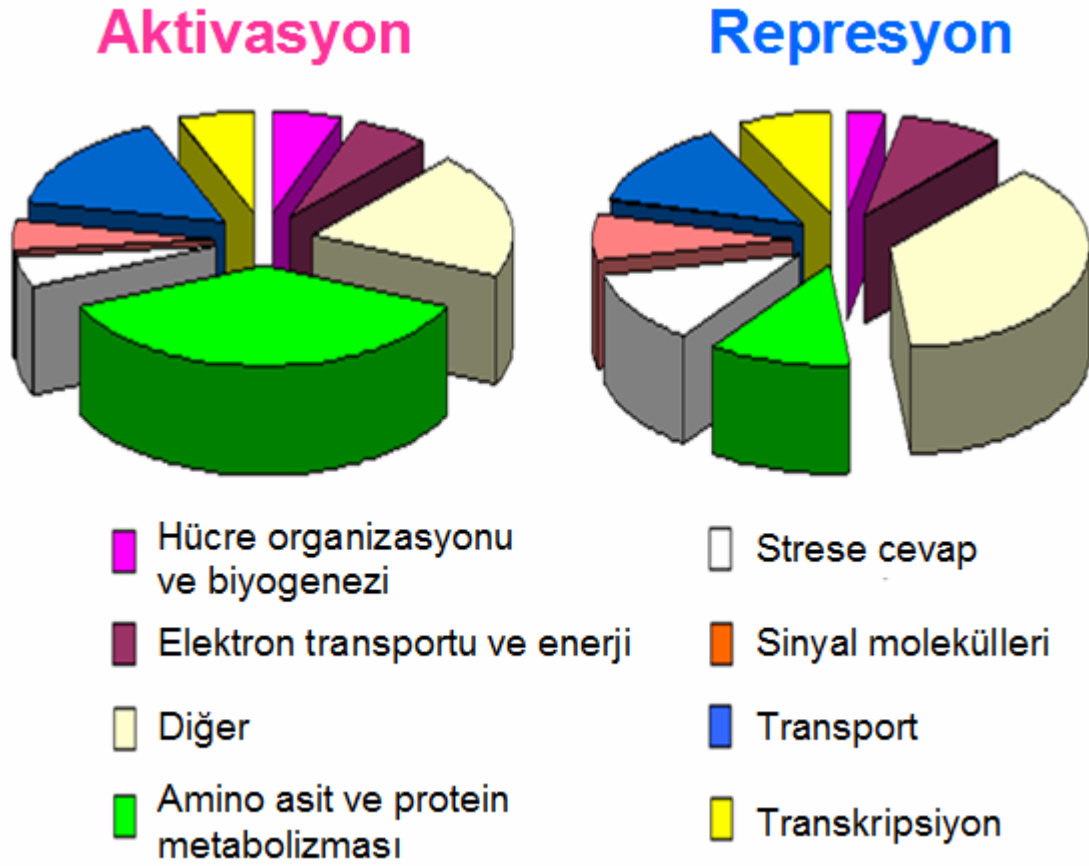
Atr1'in birçok substrata karşı genel bir stres tolerans proteini olması mümkündür. Bunu test etmek için *ATR1*'in ifadelendiği yabani tip maya hücreleri farklı stres yaratan koşullarda büyütülmüştür. Bu koşullar oksidatif stres (1 mM hidrojen peroksit), tuz stresi (%10 sodyum klorür), ağır metal stresi (10 mM bakır sülfat, 350 µM kadmiyum klorür) ve asetik asit stresini (100 mM asetik asit) içermektedir. Test edilen bu koşullar arasında *ATR1* ifadenmesi sadece tuz stresine karşı dirençlilik sağlamıştır (Şekil 18A ve B).



Şekil 18. *ATR1* ifadelenmesinin sağladığı stres toleransı A) Boş plazmit ile transforme edilmiş yabancı tip hücrelerin stres toleransları B) *ATR1* taşıyan plazmit ile transforme edilmiş yabancı tip hücrelerin stres toleransları

3.11. Bor muamelesine karşı maya hücrelerinin transkripsiyonel cevaplarının DNA mikroarray tekniği ile incelenmesi

Bu deneme için borlu ve borsuz ortamda yetiştirilen maya hücreleri kullanılmıştır. Yabancı tip hücrelerin 20 mM borik asite gösterdikleri transkripsiyonel değişiklikler incelenmiştir. Sonuç olarak mayada mevcut olan 6000 civarındaki genden yaklaşık 70 tanesi bor muamelesi sonucu ifadelenmelerini 3 kat ya da daha fazla değiştirmiştir. İfadelenmelerinde değişim gösteren genler arasında belirgin bir gruplaşma gösteren; biyokimyasal yollara ait genler (transporter genler, transkripsiyon faktörleri, kinaz/fosfataz grubu enzimler, amino asit metabolizmasında rol oynayan genler vs.) belirlenmiştir (Şekil 19).



Şekil 19. Bor ile muamele edilmiş hücrelerde gen ekspresyon analizleri. Borik asite cevaben ifadelenen genler

İfadenmesinde değişim gözlenen ve bilinen fonksiyonlu transporter olarak görev yapan genlerin listesi Şekil 20'de verilmiştir. Bu transporter genler arasında en çok artış (3 katın üzerinde) *ATR1* geninde görülmüştür. *ATR1*'in paralogları olan *YMR279c* ve *YOR378w* genlerinin ifadenmesi ise sırasıyla 1,4 ve 1,6 kat indüklenmiştir. Ayrıca diğer yollara ait genlerin isimlerini içeren mikroarray sonuçları da Şekil 21, Şekil 22 ve Şekil 23'de görülebilir.

3.2	ATR1	YML116W	Çoklu ilaç transporter pompası
3.2	YMC2	YBR104W	Mitokondriyel iç membran transporterleri
2.6	YMC1	YPR058W	Mitokondriyel iç membran transporterleri
2.6	ESBP6	YNL125C	Monokarboksilatların transportu
2.5	DUR3	YHL016C	Üre ve poliaminler için transporter
2.5	BAP2	YBR068C	Yüksek afiniteli lösin permeaz
2.4	GIT1	YCR098C	Plazma membran permeazı
2.4	MCH1	YDL054C	Monokarboksilat permeazları
2.4	TPN1	YGL186C	Piridoksin (B6 vitamini) transporterleri
2.4	SSU1	YPL092W	Plazma membran sülfid pompası
2.4	YKE4	YIL023C	Çinko transporterleri
2.4	AGP3	YFL055W	Düşük afiniteli amino asit permeaz
2.4	BAP3	YDR046C	Amino asit permeaz
2.3	PXA2	YKL188C	Bir ATP bağlayıcı transporterin alt ünitesi
2.3	OAC1	YKL120W	Mitokondriyel iç membran transporterleri
2.3	AGP1	YCL025C	Düşük afiniteli amino asit permeaz
2.2	YBT1	YLL048C	ATP bağlayıcı kaset transporterleri
2.2	PHO87	YCR037C	Düşük afiniteli inorganik fosfat (Pi)
2.1	MUP1	YGR055W	Yüksek afiniteli metiyonin permeaz
2.1	ENB1	YOL158C	Endozomal ferrik enterobaktin transporterleri
2.1	QDR3	YBR043C	Çoklu ilaç transporterleri
2.1	VBA2	YBR293W	Bazik amino asitler için permeaz
2	PDR12	YPL058C	ATP bağlayıcı kaset (ABC) transporterleri
2	HXT5	YHR096C	Hekzoz transporterleri
0.5	ACB1	YGR037C	Açıl- CoA esterlerini transport eder
0.5	HXT6	YDR343C	Yüksek afiniteli glukoz transporterleri
0.5	FUI1	YBL042C	Yüksek afiniteli üridin permeaz
0.4	HXT3	YDR345C	Düşük afiniteli glukoz transporterleri
0.4	GSP2	YOR185C	RNA proseslemesi ve transportu
0.4	CTR3	YLR411W	Yüksek afiniteli bakır transporterleri
0.4	HXT2	YMR011W	Yüksek afiniteli glukoz transporterleri
0.3	SSA1	YAL005C	(NLS) yönlendirilmiş nuklear transport
0.2	CTR1	YPR124C	Yüksek afiniteli bakır transporterleri
0.2	HXT4	YHR092C	Yüksek afiniteli glukoz transporterleri

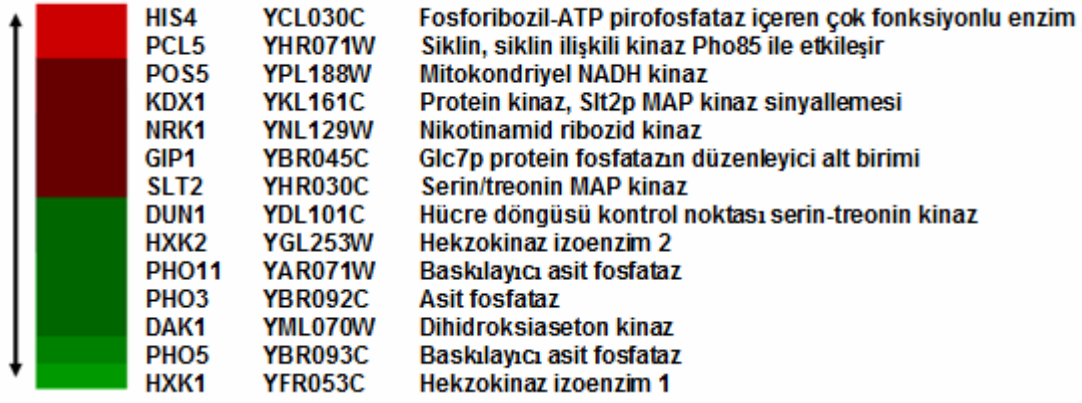
Şekil 20. Bor ile muamele edilmiş hücrelerde gen ekspresyon analizleri. Bor muamelesi ile ifadenmesi artan ya da azalan transporter genler

ARG4	YHR018C	Arjinin biyosentezi
ARG5, 6	YER069VV	Arjinin biyosentezi
CPA2	YJR109C	Arjinin biyosentezi
ARG1	YOL058VV	Arjinin biyosentezi
ARG3	YJL083VV	Arjinin biyosentezi
ARG7	YMR062C	Arjinin biyosentezi
STR3	YGL184C	Sistein metabolizması
BNA1	YJR025C	Triptofan metabolizması
ARO3	YDR035VV	Aromatik asit biyosentezi
ARO9	YHR137VV	Triptofan, fenilalanin ve tirozin katabolizması
ORT1	YOR130C	Arjinin biyosentezi
LYS2	YBR115C	Lizin biyosentezi
STR2	YJR130C	Sistein metabolizması
HOM2	YDR158VV	Metiyonin ve treonin biyosentezi
SER3	YER081VV	Serin ve glisin biyosentezi
ARO1	YDR127VV	Aromatik asit biyosentezi
ARG2	YJL071VV	Arjinin biyosentezi
LYS1	YIR034C	Lizin biyosentezi
TRP4	YDR354VV	Amino asit biyosentezinin genel kontrol sistemi
HIS7	YBR248C	Histidin biyosentezi
ILV3	YJR016C	Dallanmış zincirli amino asit biyosentezi
ARO4	YBR249C	Aromatik asit biyosentezi
ALD3	YMR169C	Beta alanin sentezi
ASN1	YPR145VV	Asparajin sentez
ILV2	YMR108VV	İzölsin ve valin biyosentezi
HIS5	YIL116VV	Histidin biyosentezi
LYS21	YDL131VV	Lizin biyosentezi
LEU9	YOR108VV	Lösin biyosentezi
TRP2	YER090VV	Triptofan biyosentezi
BAP2	YBR068C	Lösin, İzölsin ve valin alınımı
ILV6	YCL009C	Dallanmış zincirli amino asit biyosentezi
LEU1	YGL009C	Lösin biyosentezi
BAP3	YDR046C	Sistein, lösin, İzölsin ve valin alınımı
ARO8	YGL202VV	Amino asit biyosentezinin genel kontrolü
LYS14	YDR034C	Lizin biyosentezi
CPA1	YOR303VV	Arjinin biyosentezi
AGP1	YCL025C	Asparajin, glutamin ve diğer amino asitlerin alınımı
TRP5	YGL026C	Triptofan biyosentezi
LYS20	YDL182VV	Lizin biyosentezi
ARG8	YOL140VV	Arjinin biyosentezi
MUP1	YGR055VV	Metiyonin permeaz
LYS12	YIL094C	Lizin biyosentezi
SAM4	YPL273VV	Metiyonin metabolizması
MET22	YOL064C	Metiyonin metabolizması
SAM1	YLR180VV	Metiyonin metabolizması
MET6	YER091C	Metiyonin metabolizması
MHT1	YLL062C	Metiyonin metabolizması
CAR2	YLR438VV	Arjinin degradasyonu
SAM2	YDR502C	Metiyonin biyosentezi
HOM6	YJR139C	Metiyonin ve treonin biyosentezi
YPR1	YDR368VV	İzölsin katabolizması

Şekil 21. İfadelemelerinde değişim gözlenen ve amino asit metabolizmasında rol oynayan genler

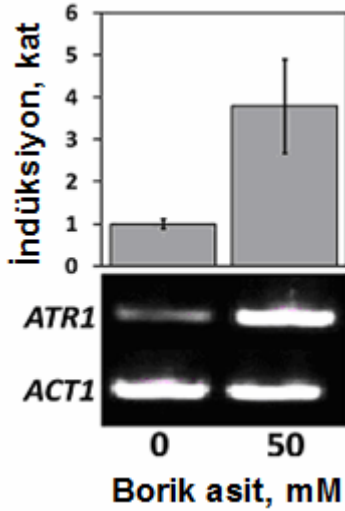
GAT4	YIR013C	GATA ailesi çinko parmak motiflerini içeren protein
MET28	YIR017C	Cbf1p-Met4p-Met28p kompleksindeki transkripsiyonel aktivatör
SIP4	YJL089W	C6 çinko grubu transkripsiyonel aktivatörü
CRF1	YDR223W	Transkripsiyonel korepresör, ribosomal protein genlerinin regülasyonu
PDR8	YLR266C	Transkripsiyon faktörü
LYS14	YDR034C	Transkripsiyonel aktivatör, lizin biyosentez yolağı
GLN3	YER040W	Transkripsiyonel aktivatör, nitrojen katabolit represyonu
NRG1	YDR043C	Transkripsiyonel represör
RTG3	YBL103C	bHLH/Zip transkripsiyon faktörü
TOS4	YLR183C	Transkripsiyon faktörü, feromona yamıt ve hücre döngüsü
ADR1	YDR216W	Karbon kaynağı duyan çinko parmak transkripsiyon faktörü
EMI2	YDR516C	Transkripsiyonel indüklenme
HAP4	YKL109W	Solunum gen ekspresyonunun global regülatörü
MTH1	YDR277C	Glukoza yönelik sinyal iletiminin negatif regülatörü
STP4	YDL048C	Protein içeren Kruppel-tipi çinko parmak domaini

Şekil 22. İfadelemelerinde değişim gözlenen transkripsiyon faktör genleri



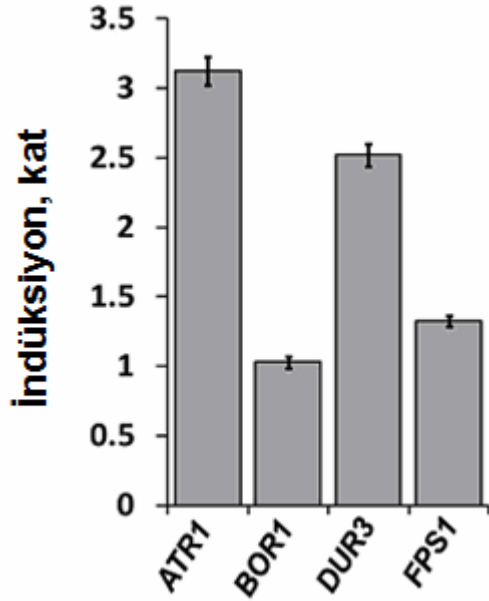
Şekil 23. İfadelenmelerinde değişim gözlenen fosfataz ve kinazlar

ATR1 geninin bor muamelesine tepki olarak ifadelendiği aynı zamanda real-time PCR ile Şekil 24 'deki gibi gösterilmiştir. Buna göre 1 saat 50 mM borik asitle muamele edilen hücrelerde *ATR1* transkriptleri kontrol hücrelerine göre 4 kat daha fazla ekspresyon göstermişlerdir.



Şekil 24. *ATR1* mRNA seviyelerinin real-time PCR analizi (üst kısım), PCR ürünlerinin %1'lik TAE-agaroz jeldeki görünümü (alt kısım). Actin 1 mRNA seviyesi kontrol olarak kullanılmıştır.

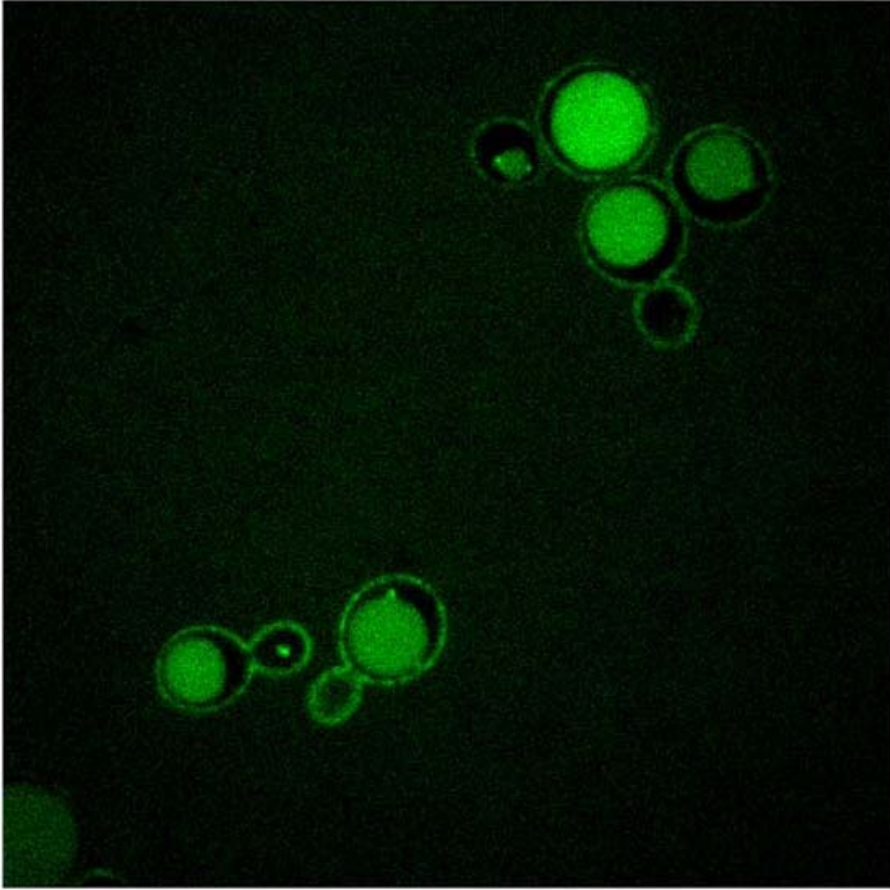
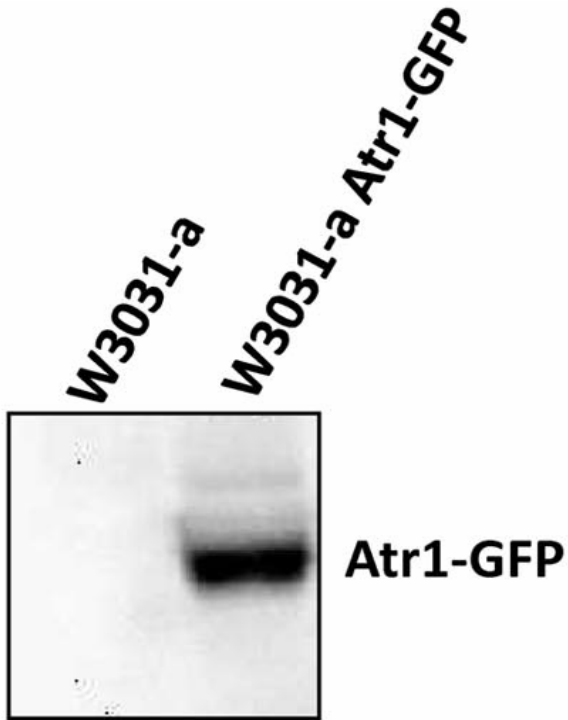
Bor muamelesine yanıtta *BOR1* ve *FPS1* genlerinin ekspresyonları değişmezken, *DUR3* ekspresyonu 2,5 kat artmıştır (Şekil 25). Böylelikle *ATR1*'in bor stresine cevaben ifade edilen bir gen olduğu ve bor varlığında *ATR1* geninin diğer bilinen bor transporter genlerine göre daha fazla artış gösterdiği ortaya çıkarılmıştır.



Şekil 25. Bor muamelesi ile *ATR1*, *BOR1*, *DUR3* ve *FPS1* genlerinin transkripsiyonel regülasyonunu gösteren mikroarray sonuçları

3.12. Atr1 proteininin hücredeki lokalizasyonu

Atr1, 14 transmembran segmenti içerdiği düşünülen bir membran proteindir (Gbelska,2006). *ATR1* geni kromozomal olarak GFP ile etiketlenmiştir. Daha sonra Atr1-GFP füzyon proteinini konfokal mikroskobu kullanılarak incelenmiş ve proteinin, vakuol ile plazma membranında yerleştiği bulunmuştur (Şekil 26A). Vakuolar lokalizasyonun proteinin parçalanmasından kaynaklanmadığını doğrulamak için ise GFP'ye karşı bir antikor kullanılarak western blot analizleri yapılmıştır. Şekil 26B'de görüldüğü gibi Atr1-GFP füzyon proteinine ait sadece bir bant vardır, bu da proteinin zarar görmemiş olduğunu göstermektedir.

A**B**

Şekil 26. Atr1 lokalizasyonu A) Atr1-GFP proteininin vakuoldeki ve hücre membranındaki lokalizasyonu B) Atr1-GFP proteininin western blot analizi

3.13. İlave amino asit uygulamasının bor dirençliliğine etkisi

Mikroarray çalışmasıyla bor muamelesinin hücrelerde amino asit biyosentezi yapan genlerin ifadelenmelerini artırdığı tespit edilmiştir. Bu sonuç ile bor muamelesinin bir şekilde amino asit kullanımını önlemiş olabileceği ve bu sebepten dolayı da hücrelerin amino asit açığını kapatmak için amino asit sentez genlerini aktive ettiği düşünülmüştür. Bu hipotezi test etmek için farklı borlu ortamlarda büyüyen hücelere normal besiyerinde bulunanın 10 katı kadar daha fazla amino asit ilavesi yapılmış ve hücrelerin büyümeleri gözlemlenmiştir. Yüksek amino asit konsantrasyonlarının hücelere bor dirençliliği yönünden bir fayda sağlamadığı bulunmuştur.

3.14. ATR1 paraloglarının analizi

Yapılan biyoinformatik analizler ile *S. cerevisiae* genomunda *ATR1*'e benzerlik gösteren iki tane gen bulunmuştur (*YMR279c* ve *YOR378w*). *Atr1* ve paralogları pfam07690 domainini içermekte ve sekanslarında %70'den daha fazla benzerlik göstermektedirler. Bu benzerlik *YMR279c* ve *YOR378w* genlerinin de bor dirençliliğinde rol oynayabileceğini düşündürmüştür. İlgili genlerin *ATR1*'e karşı alignmentları Şekil 27'de verilmiştir.

```
6323520 ATR1      1 -MGNQSLVVLTESKGEYENTELPEVNSRDNNIGSLTATDFQCSEEDVYQKQKQENYFYAWGCEHFEHETCMSSQLLNQAGTFCLEIMNLSSESPGSE-SSK
6323935 Ymr279cp    1 MFSIFKKTSVQGTDSSEIDKRTTKAKDKVVVSEPEEVTIVESRSTQVINDSFMODEHFSFGRELMFINTCMLAQLLNQAGTFCLEIMNLSKSESE-ANNQA
6324954 Yor378wp    1 -----MSSSVVQKNDITNREALRRELRWLSFDDTQTE-RFKSLMESAEYGVLCSAQLKIQAGLGGSLAPLHILIGNSEGITNAGLSE

6323520 ATR1      109 WLMASFPPLVSGSFILISGRLDIYGLKKMLVGYVIVTWSLIGGLIRYSQSEHFFHISRAFQGIATFVLPNNIGIIGNIVGGHFRKNIVISFVGAMAFISAHIGDLF
6323935 Ymr279cp    110 WLMASFPPLAAGSFILISGRLDIYGLKKMLVGYVIVTWSLISGLSKYSNSDAFFHISRAFQGVIAETLPNNIGIIVGHVYRNGSFRKNIVISFVGACAFEGMFGGLE
6324954 Yor378wp    84 WFSASASLITVCFILISGRLDIYGLKKKFFVIGFWYALWSLIGSSVYSN-QIEFDCCRAFOGMCFAETLPNATILGHTYRGC-PRKNIVISFVGASAFSEFFLGAVE

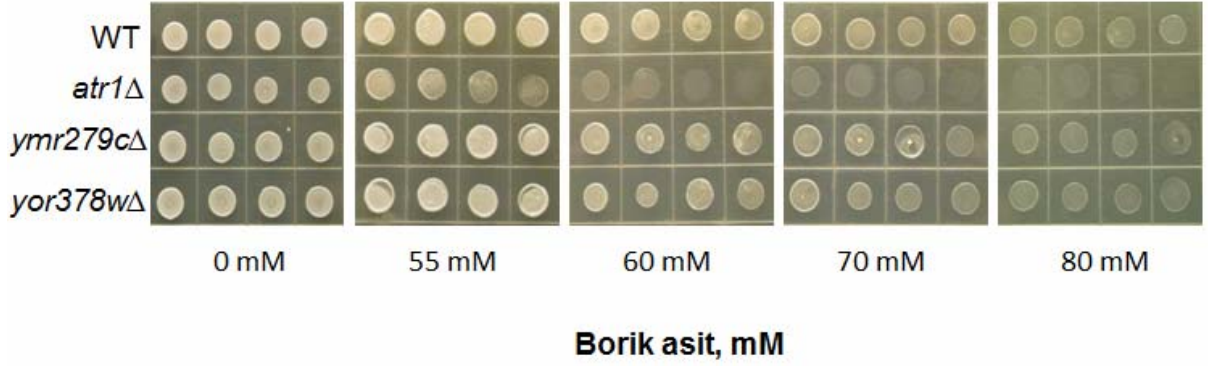
6323520 ATR1      219 AGLIGTEDEKQWPFAYANSTAAENWYSIMAFISPTIN-----IRHFSMDWNGSVLGVIGLILNFWVNOAPISGNQAVIIVLLISVPILVNEHIVYIRAKTE
6323935 Ymr279cp    220 GGLVITPDEKQWPFYAGIATPESLIMAWNSIFNNPTIN-----IRGLSMDWNGSRLAIGLILNFWVNOAPIVGNDREYIIVLLISVPILVNEHIVYIRAKTE
6324954 Yor378wp    192 SSMHC--QLAWPWAYNMGIAECLAWACYEVIHETMPSRDASSFKLLERIDRAGSVIGVGLILNFWVNOAPIVGNDREYIIVLLISVPILVNEHIVYIRAKTE

6323520 ATR1      323 LLPRATKDRHMTLILALFSGNGSFGIETFYYSQFQLNIPQYALVWAGTYEVEIKCHIAALLVGFETENSPSEVETFSMAFVNGSIMAEVVEVVEYVETLLESTI
6323935 Ymr279cp    324 LLPRATKDRHMTVILLALFSGNGSFGIETFYYSQFQLNIPQYALVWAGTYEVEIKCHIAALLVGFETENSPSEVETFSMAFVNGSIMAEVVEVVEYVETLLESTI
6324954 Yor378wp    299 LLFPAALSS-DTAFVLSQIAAGNSFGIETFYYSQFQLNIPQYALVWAGTYEVEIKCHIAALLVGFETENSPSEVETFSMAFVNGSIMAEVVEVVEYVETLLESTI

6323520 ATR1      433 LILSFGMDLSFPASSIILSDLEPMEYQGMAGSLVNTVYVNSLCLGMDGIVETQVNSIQKHLKGYVFAAVLIGIGLASLACNLSLWYVEEISFARAAAAYICTIVA
6323935 Ymr279cp    434 LILSFGMDLSFPASSIILSDLEPMEYQGMAGSLVNTVYVNSLCLGMDGIVETQVNSIQKHLKGYVFAAVLIGIGLASLACNLSLWYVEEISFARAAAAYICTIVA
6324954 Yor378wp    408 LILSFGMDLSFPASSIILSDLEPMEYQGMAGSLVNTVYVNSLCLGMDGIVETQVNSIQKHLKGYVFAAVLIGIGLASLACNLSLWYVEEISFARAAAAYICTIVA
```

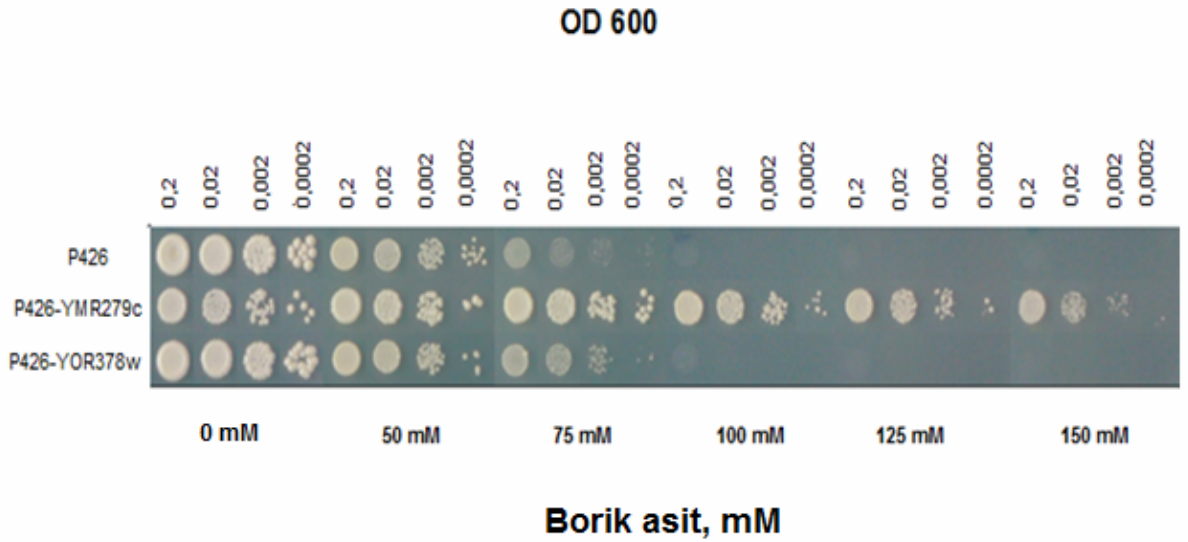
Şekil 27. Maya *ATR1* paraloglarının çoklu sekans uyumu analizi

Belirtilen genlerin bor dirençliliğinde rol alıp almadıklarını kontrol etmek amacıyla bu genlere ait mutantların bora karşı duyarlılıkları test edilmiştir. Şekil 28'de görüldüğü üzere ilgili gen mutantlarının yabancı tip maya hücresiyle kıyaslandığında bor toleransı açısından herhangi bir fark göstermediği bulunmuştur. Bu da üç paralog arasında sadece *ATR1*'in bor dirençliliği sağladığını göstermektedir.



Şekil 28. *atr1*Δ mutanı ve paraloglarının bor toleransı bakımından karşılaştırılması

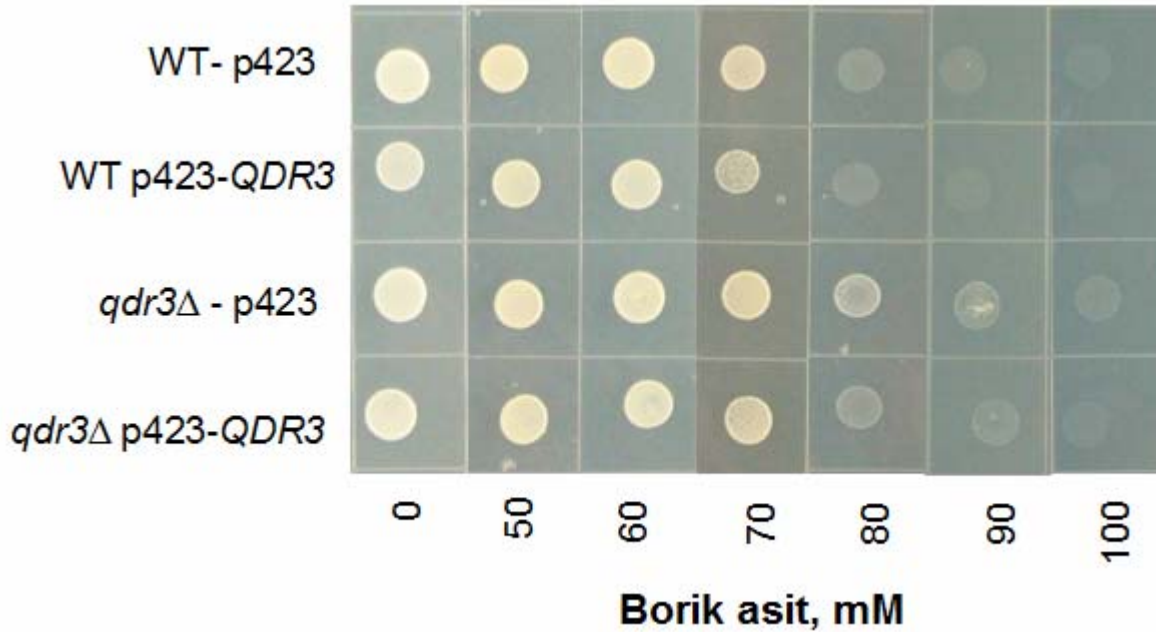
Bir sonraki aşamada bu genlerin ifade edildiği yabancı tip hücrelerde bora karşı dirençlilik olup olmadığı test edilmiştir. Bu amaçla bu iki gen klonlanmış ve yabancı tip maya hücrelerine transformasyonları yapılmıştır. Daha sonra da aşırı ifadelenenin yol açtığı sonuçları gözlemek için farklı konsantrasyonlarda borik asit içeren seçici besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Şekil 29'da *YMR279c* geninin yabancı tip hücrelerde aşırı ifadeleneninin bu hücrelere bor dirençliliği sağladığı görülmektedir.



Şekil 29. *ATR1* paraloglarının yabancı tip hücrelerde ifadeleneninin bor toleransına etkisi

3.15. QDR3 geninin bor toleransına etkisi

Mikroarray analizlerinde *ATR1*'e ilave olarak *QDR3* (YBR043c) geninin de bora cevaben transkripsiyonunun iki kat artması ve *ATR1* ile aynı aileden olması nedeni ile *QDR3* geninin bor toleransı yönünden karakterizasyonu yapılmıştır. Bu genin kodladığı proteinin drug:H⁺ antiporterlarına ait DHA1 ailesinin bir üyesi olduğu bilinmektedir (*Atr1*, Drug:H⁺ antiporterlarına ait DHA2 ailesinin bir üyesidir). *QDR3* geninin de *ATR1*'e benzer şekilde rol oynayarak bor toleransı sağlayıp sağlamadığını test etmek için bu gen klonlanmıştır. Daha sonra *qdr3Δ* delesyon mutantındaki ve yabancı tip maya hücresinde ifadelenmeleri gözlenmiştir. Ancak Şekil 30'da görüldüğü gibi *QDR3* geninin aşırı ifadelenmesi de, delesyonu da hücrelerin bor tolerans seviyelerini değiştirmemiştir.

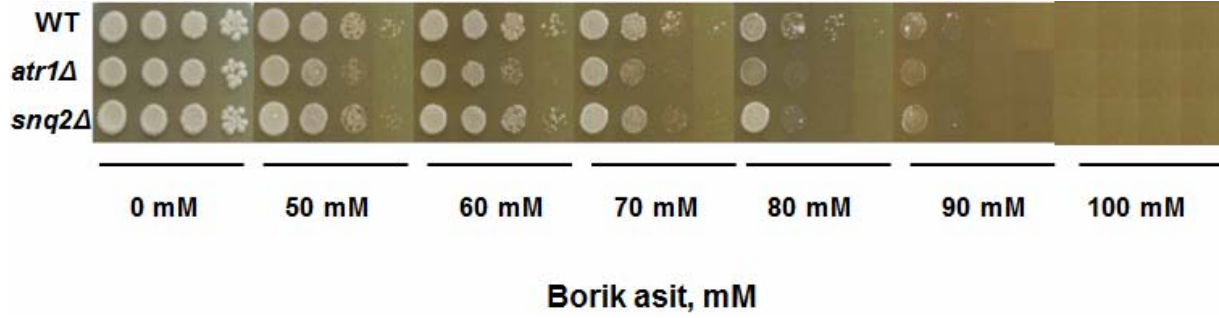


Şekil 30. *QDR3* delesyonu ve aşırı ifadelenmesinin bor toleransına etkisi

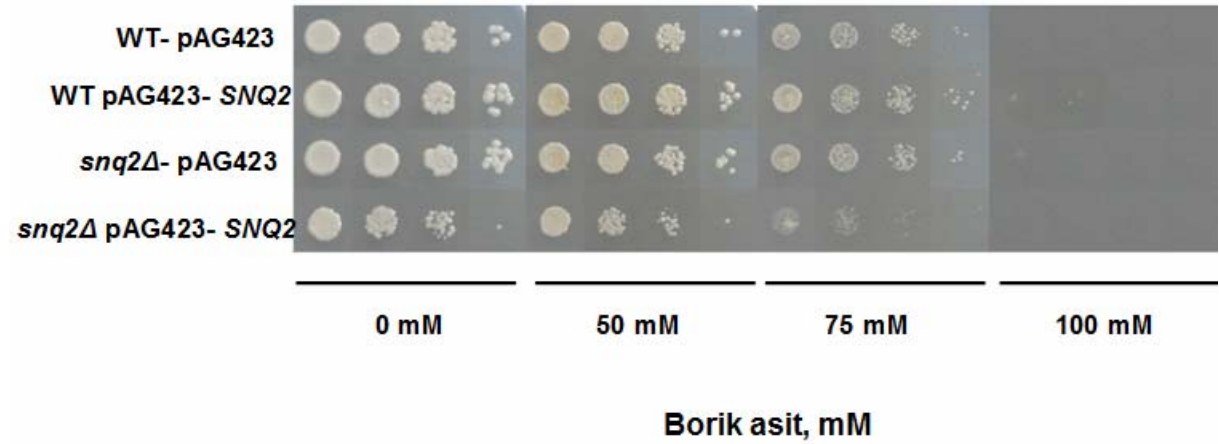
3.16. SNQ2 geninin bor toleransına etkisi

Saccharomyces cerevisiae genomu ABC transporterleri kodlayan 16 tane gen içermektedir. *SNQ2* geni de bunlardan bir tanesidir. *SNQ2* geni ilk olarak nitroksikinolin oksitlere ve diğer mutajenlere dirençlilik gösteren mutantların taramasında keşfedilmiştir (Servos, 1993). *SNQ2* geninin de tıpkı *ATR1* geni gibi plazma membran ABC transporterlerinden olması, 4-Nitrokinolin-N-oksit'e dirençlilik sağlaması ve çoklu ilaç dirençliliğinde içerilmesinden dolayı *ATR1*'e benzer hareket edebileceği düşünülmüştür. Öncelikle *SNQ2* gen mutantının zengin

besiyerindeki (YPD) büyüme profilleri çıkarılmıştır. Buna göre *snq2Δ* mutantının artan bor konsantrasyonlarında büyümesi azalmıştır (Şekil 31). Ardından genin ifadelenmesinin bu mutantlara sağlayacağı bor toleransını araştırabilmek için *SNQ2* geni klonlanmış; yabancı tip ve mutant hücrelerde ifade edilmiştir. Daha sonra ilgili transformantlar farklı konsantrasyonlarda bor içeren seçici besiyerlerinde büyütülmüştür. Ancak Şekil 32'den gözlenebileceği gibi *SNQ2* geninin aşırı ifade edilmesi hücrelerin bora karşı dirençli hale gelmesini sağlayamamıştır.



Şekil 31. *atr1Δ* ve *snq2Δ* mutantlarının farklı konsantrasyonlarda borik asit içeren YPD besiyerlerindeki büyümeleri

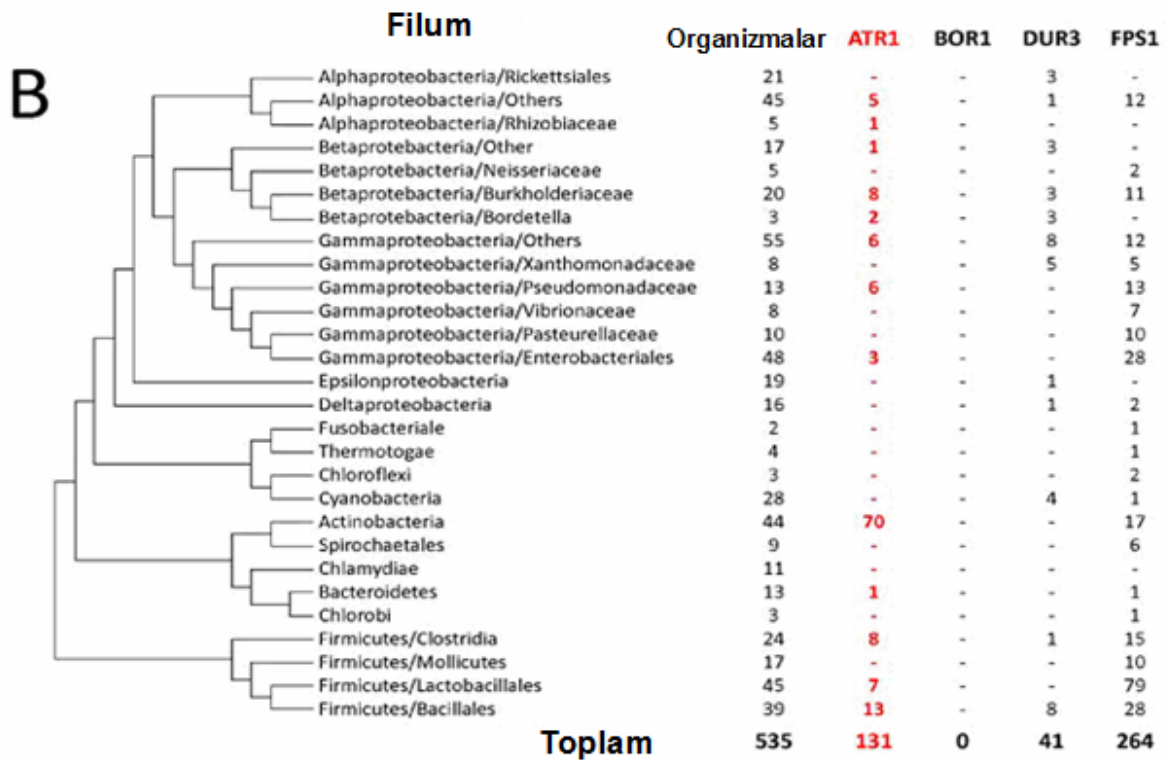
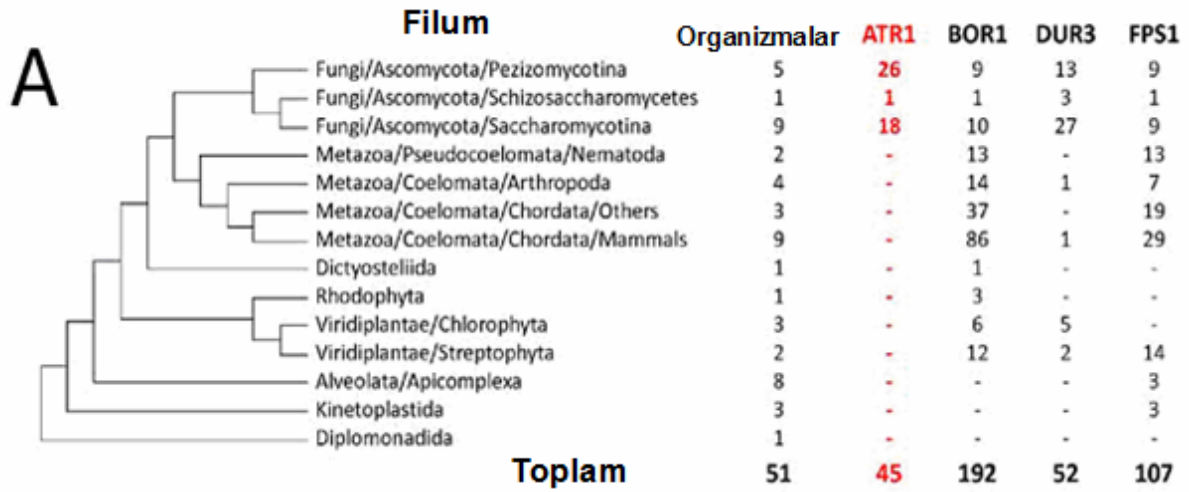


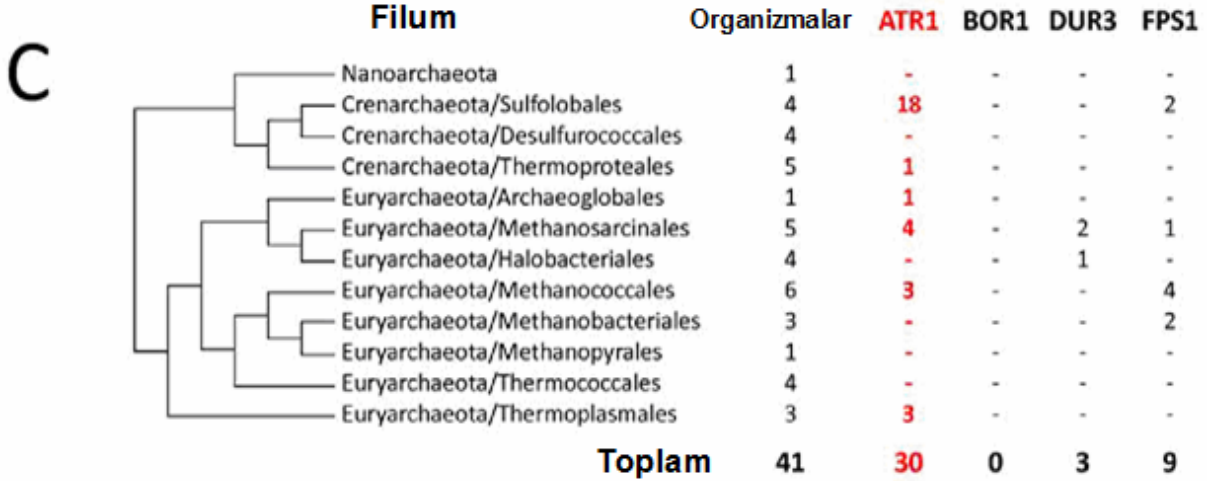
Şekil 32. *SNQ2* ifadelenmesinin bor toleransına etkisi

3.17. Diğer türlerdeki *ATR1* homologlarının analizi

Biyoinformatik yöntemler kullanılarak yapılan analizler sonucunda Fungi, Bacteria ve Archaea' da *ATR1* homologlarına rastlanırken; hayvanlarda, vasküler bitkilerde ve alglerde bulunamamıştır (Şekil 33 A,B,C). Ökaryotlardaki *ATR1* dağılımı mantarlarla sınırlı kalmıştır. Bu sonuçlara göre; *ATR1*'in prokaryot ve basit ökaryotlardaki bor toleransından sorumlu olabileceği ancak yüksek yapıllı ökaryotik canlıların bor detoksifikasyonu için farklı

mekanizmalar geliřtirmiř olabileceđi dűřűnűlmektedir. Aynı řekilde; bor tařınımında rolű olduđu ileri sűrűlen *FPS1*, *DUR3* ve *BOR1* genlerinin de Fungi, Bacteria ve Archaea domainlerindeki analizleri yapılmıřtır. *FPS1* ve *DUR3* homologları dűzensiz bir dađılım gűstermesine rađmen *BOR1* bűyűk ۆlűde ۆkaryotlarda bulunmaktadır.





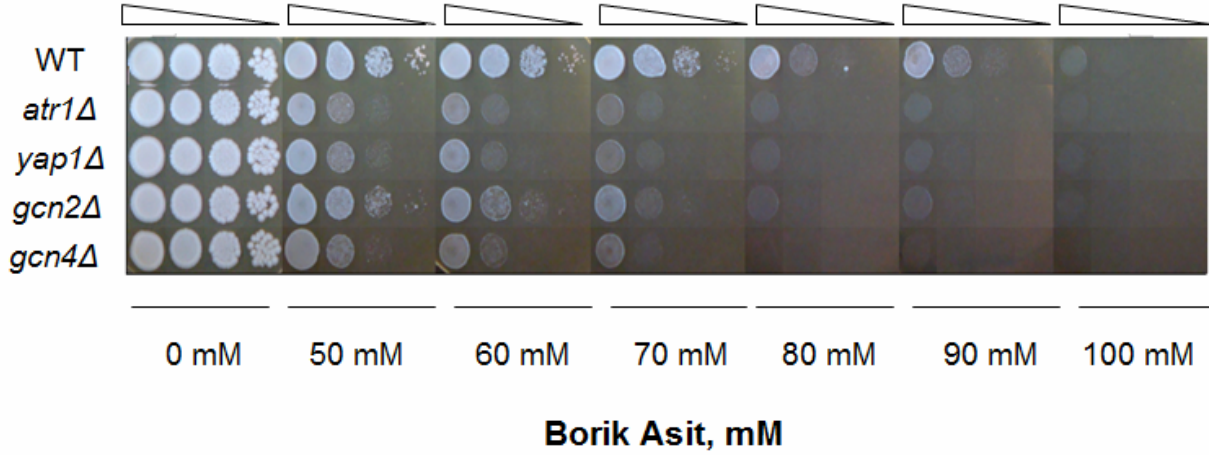
Şekil 33. *ATR1*'in üç domaindeki dağılımı A) Bor taşınımında rol oynayan genlerin ökaryotlardaki dağılımı B) Bor taşınımında rol oynayan genlerin bakterilerdeki dağılımı C) Bor taşınımında rol oynayan genlerin Archaea'deki dağılımı

3.18. *ATR1* geninin transkripsiyonel kontrolü

Şu ana kadar yaptığımız çalışmalar bor muamelesinin *ATR1* gen ifadenmesini üç kattan daha fazla arttırdığını ve aynı zamanda amino asit biyosentezi yapan genlerin de aktivasyonuna sebep olduğunu göstermiştir. Bu konuda *GCN4* transkripsiyon faktörü ön plana çıkmaktadır. Gcn4 protein seviyeleri amino asit kıtlığında ve diğer kıtlık ya da stres yaratan koşullar altında artmaktadır. Protein sentezi; ekstraselüler sinyaller, hücresel büyüme ve stres koşullarına yanıtta ilk olarak translasyon başlangıç seviyesinde kontrol edilmektedir. Bir protein kinaz olan *GCN2* de, stres koşulları altında ökaryotik translasyon başlangıç faktörlerinden *eIF2*'nin alfa alt birimini fosfatlamaktadır. Bu mekanizma çoğu proteinin translasyonunu genel olarak inhibe ederken, stres ile kontrol edilen bir takım proteinlerin translasyonunu ise aktive etmektedir. Maya Gcn4 proteini de bunlardan biridir. Borun maya hücreleri üzerinde stres yarattığı daha önceki çalışmalarımızla gösterilmiştir. Dolayısıyla, borun bir şekilde *GCN2* ile etkileşip *eIF2 α* 'nın fosfatlanmasını sağladığı, bu fosfatlanmanın da genel translasyonu baskılayıp *GCN4* translasyonunu aktive ettiğini, sonrasında *GCN4*'ün *ATR1* ve aminoasit biyosentez genlerinin aktivasyonunu sağladığı düşünülmektedir.

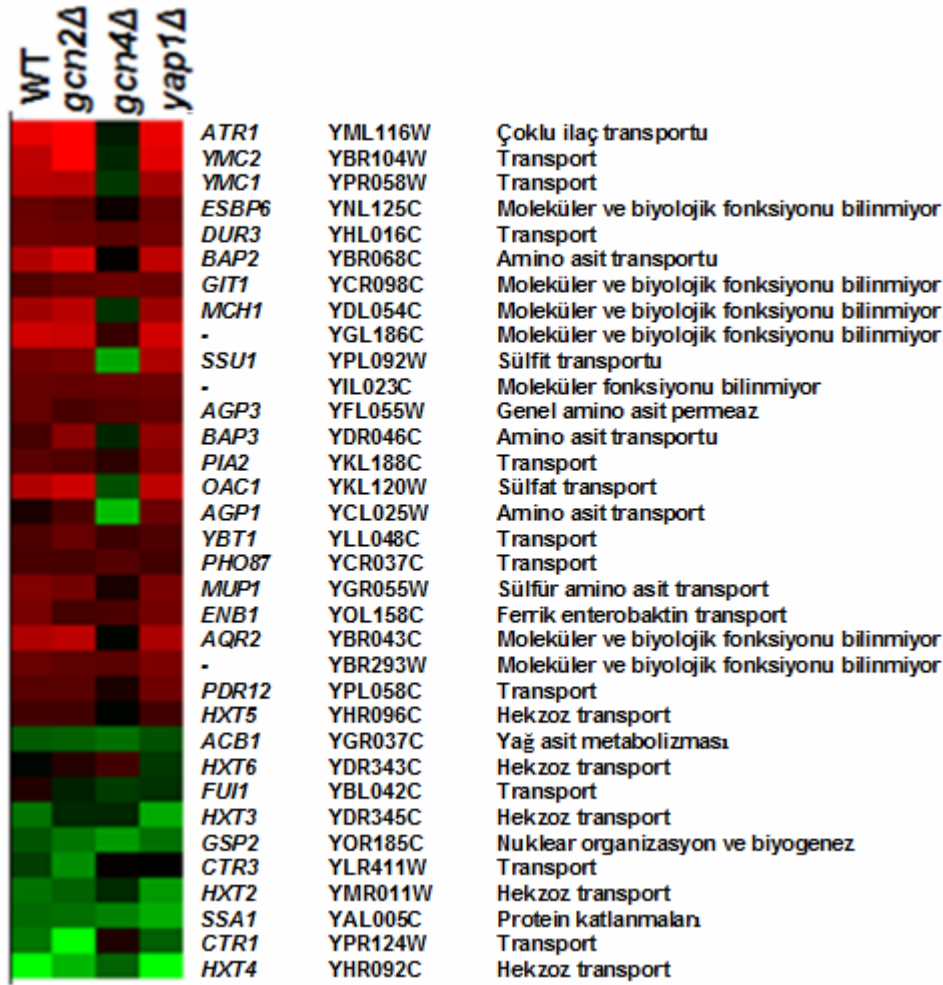
Bunlara ek olarak; *ATR1* ekspresyonunun hidrojen peroksit, diamid ve menadion muameleleri sonucu arttığı bilinmektedir. Bu da *YAP1*'e bağlı bir mekanizmayı düşündürmektedir. *YAP1*, oksidatif stres yanıt genlerinin ekspresyonunu kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür ve *ATR1* aktivasyonunda rol alması muhtemeldir.

Bu hipotezleri test etmek için öncelikle ilgili genler bakımından mutant olan hücrelerin bor duyarlılık seviyeleri tespit edilmiştir. Bunun için farklı konsantrasyonlarda borik asit içeren zengin besiyerlerine ekimler yapılarak büyüme profilleri takip edilmiştir. Şekil 34'de mutantların bora karşı *atr1Δ* mutanlığı kadar duyarlı olduğu görülmektedir.



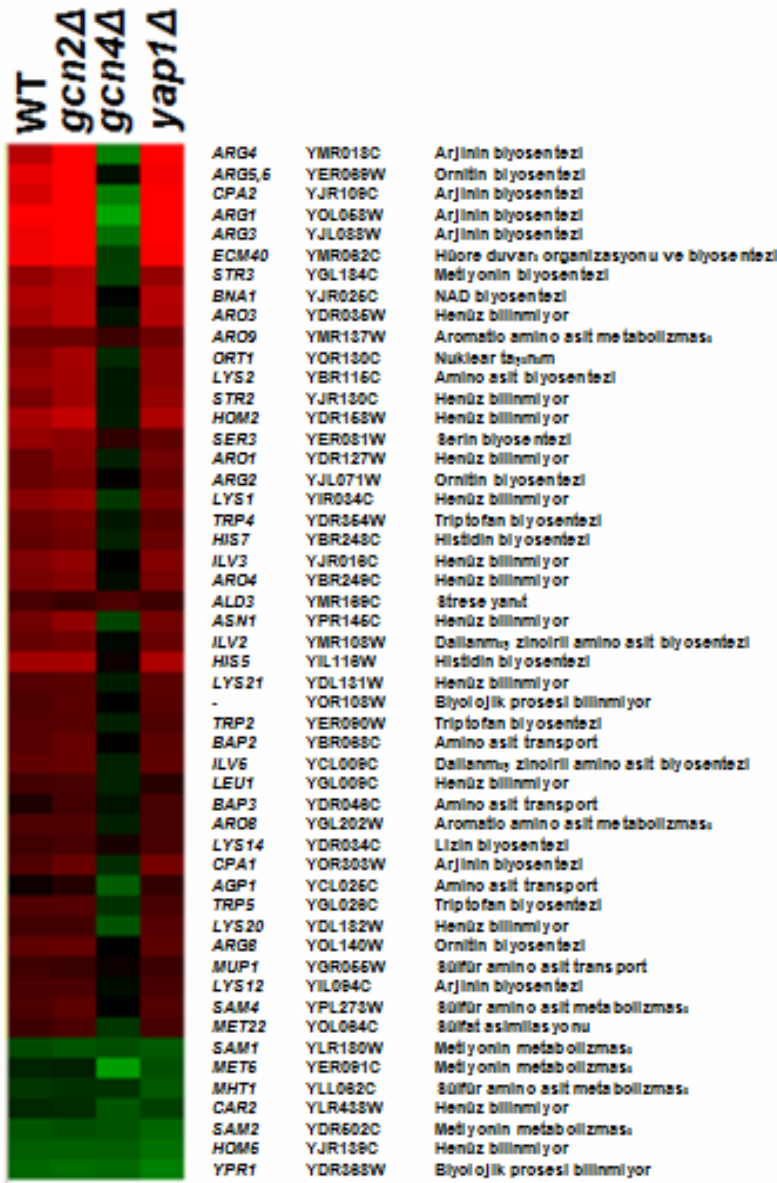
Şekil 34. Haploid transkripsiyon faktör mutanlarının bor duyarlılıklarının karşılaştırılması

Bor varlığında *ATR1* ve diğer gen ifadenmelerinin bu transkripsiyon faktörleriyle ilişkili olup olmadığını anlayabilmek için DNA mikroarray deneyleri yapılmıştır ve yabani tip ve *gcn2Δ*, *gcn4Δ*, *yap1Δ* mutantlarında 20 mM bor muamelesi sonucunda *ATR1*, amino asit biyosentez ve transporter genlerinin ifadenmeleri incelenmiştir. Şekil 35'de görüldüğü gibi *ATR1*'in ifadenmesi özellikle *gcn4Δ* mutantında gerçekleşmemektedir. Bu da *GCN4*'ün *ATR1* ifadenmesinde bir rolü olduğunu göstermektedir. *Gcn4*'ün *ATR1* dışındaki birçok transporter genin ifadenmesinde görev aldığı da açıkça görülmektedir.



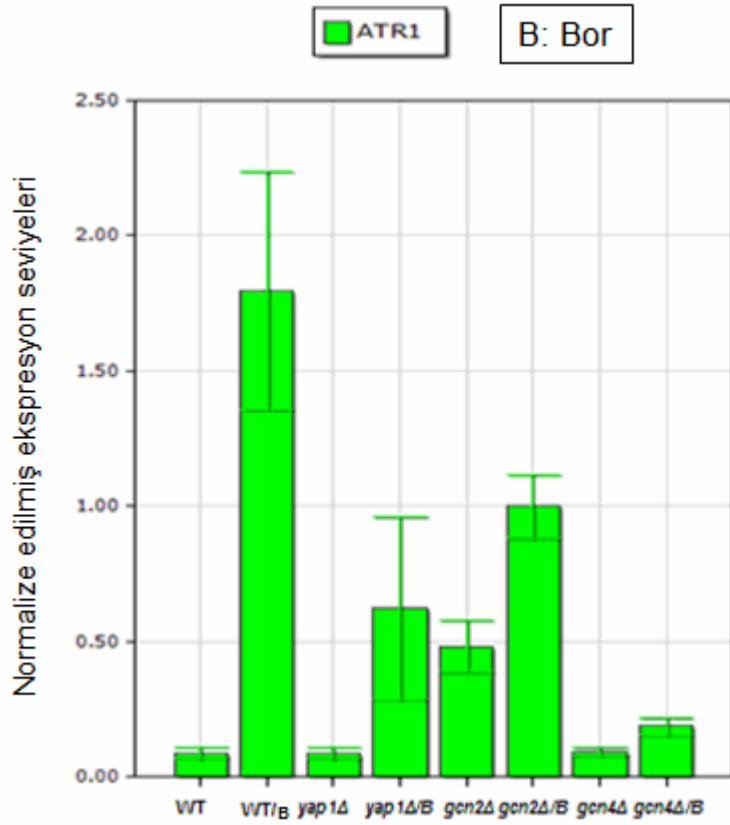
Şekil 35. Bor muamelesi sonucunda transporter genlerinin transkripsiyon faktör mutantlarında ifadenmelerinin mikroarray ile gösterilmesi (Yeşil=inhibisyon, siyah=nötr, kırmızı=aktivasyon)

Aynı şekilde ilgili mutantlarda bor muamelesi karşısında amino asit genlerinin ifadenmelerindeki değişikliklere bakıldığında (Şekil 36), aminoasit biyosenteziyle ilgili genlerin çoğunun ifadenmesi (özellikle arginin biyosentezinden sorumlu genler) *GCN4* transkripsiyon faktörü eksikliğinde azalmıştır. Dolayısı ile *Gcn4* transkripsiyon faktörü hem *ATR1*'in hem de amino asit sentezi yapan genlerin bor stresi karşısında aşırı ifade edilmesini sağlayan transkripsiyon faktörüdür.



Şekil 36. Bor muamelesi sonucunda amino asit genlerinin transkripsiyon faktör mutantlarında ifadenmelerinin mikroarray ile gösterilmesi

Mikroarray sonuçlarını kontrol etmek için benzer şartlar altında yetiştirilen hücrelerdeki *ATR1* mRNA seviyeleri real time PCR analizleri ile de incelenmiştir (Şekil 37). *ATR1* geninin bor stresine cevaben ifade edilen bir gen olduğu daha önceki denemelerimizde gösterilmişti. Bu analizin sonucunda yabancı tip, *yap1Δ* ve *gcn2Δ* hücrelerinde bor varlığında *ATR1* mRNA seviyesinin arttığı, bu artışın *gcn4Δ* mutantlarında gerçekleşmediği tespit edilmiştir. Dolayısı ile real time PCR sonuçları mikroarray sonuçlarını desteklemektedir.



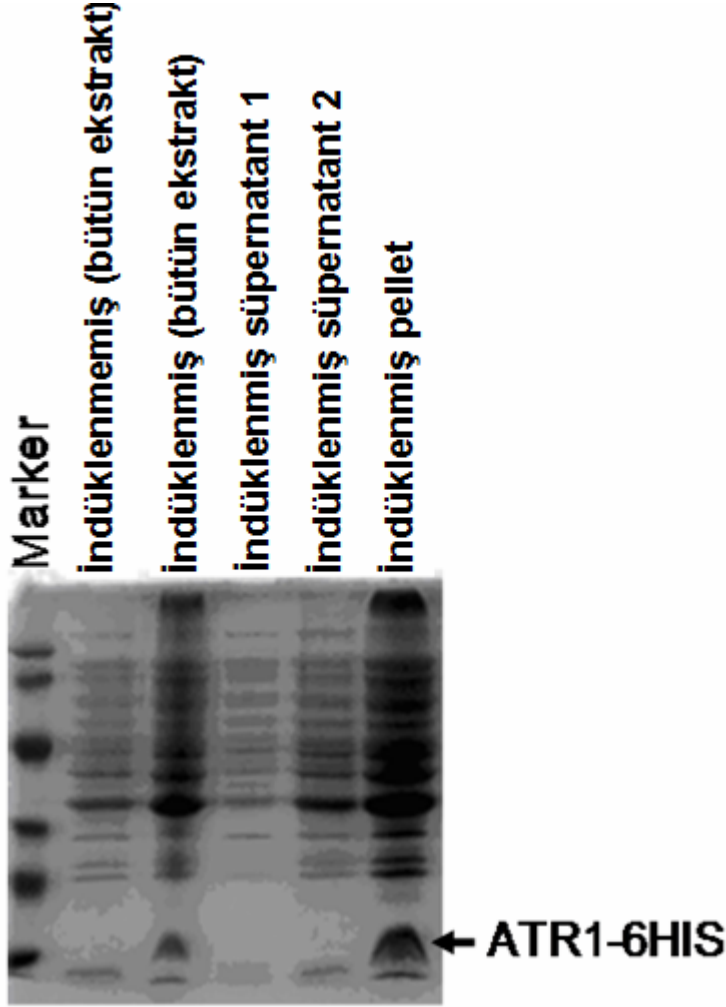
Şekil 37. *ATR1* ifadelenme seviyesinin real time PCR ile belirlenmesi

Ayrıca *GCN2*, *GCN4* ve *YAP1* genleri Gateway klonlama sistemi kullanılarak klonlanmıştır. Bu genlerin aşırı ifade edilmelerinin *ATR1* aktivasyonuna bağlı olarak bor dirençliliği sağlaması beklenmiştir. Fakat beklenildiği gibi bir sonuç elde edilememiştir.

3.19. Recombinant Atr1 proteini eldesi

ATR1 ile ilgili yolakların çalışılması için bu proteine karşı geliştirilmiş bir antikor çok faydalı olabilir. Bu amaçla maya *Atr1* proteinini bakteriden elde etmek için bu gen *pet28a* vektörüne klonlanmıştır ve BL21 hücre hattında ifade edilmiştir. İfadesini indüklemek için IPTG kullanılmıştır. Daha sonra hücre ekstraktından *Atr1* proteini 6xHIS afinite kromatografisi ile elde edilmeye çalışılmıştır. Ancak Şekil 38 'da görüldüğü gibi, bakteride elde edilen *Atr1* proteini hücre ekstraktının suda çözünebilir kısmında değil, çözünmeyen proteinleri içeren pellet kısmında tespit edilmiştir. Kendisi 14 transmembran segmenti içeren bir membran proteini olduğu için hidrofobitesi yüksek olup suda çözünmemektedir. Bu durumda bu proteini hücre ekstraktından elde etmek için ilave çalışmalar gerekmektedir yada *Atr1*

proteinin suda çözülebilir bir kısmının klonlanıp ifade edilmesi ve antikor üretim işlemlerinde kullanılması gerekmektedir..

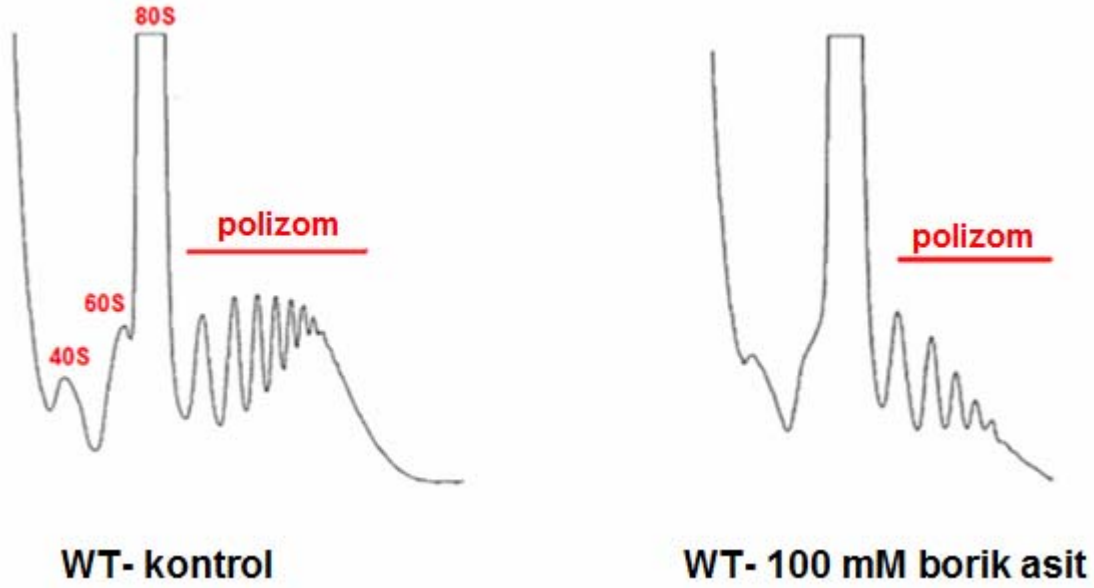


Şekil 38. Atr1 proteininin SDS jelde gösterilmesi. Atr1 proteini sadece induced örneklerde gözlemlenmektedir.

3.20. Borun protein sentezi üzerindeki etkileri

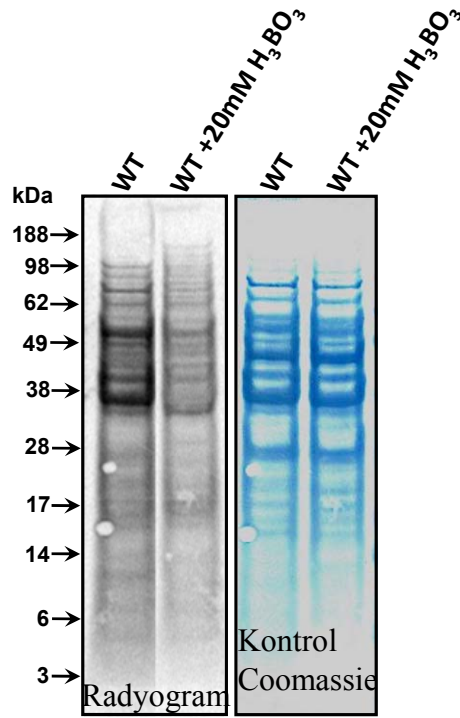
Bor muamelesi sonucu amino asit sentez genlerinin neden aktive olduğu bilinmemektedir. Fakat bu grup genlerin normalde hücre içerisinde yüksüz tRNA ların birikmesi sonucu (amino asit taşımayan tRNA) aktive edildiği bilinmektedir. Kısaca amino asit kıtlığında tRNA'lara amino asitler bağlanamaz ve bu da Gcn2 proteinini aktif hale getirir. Gcn2 bir kinaz olup başlıca iki görevi vardır; eIF2alpha alt ünitesini fosfatlayarak protein sentezinin durmasını ve translasyonel olarak Gcn4'ün aktivasyonunu sağlar. Gcn4 ise hem Atr1'in hem de amino asit

sentez genlerinin aktivasyonunu sağlar. Eğer bu yolak bor stresinde de benzer şekilde çalışıyorsa bor muamelesi eIF2alpha proteininin fosfatlanmasına ve protein sentezinin durmasına neden olması beklenir. Bu modeli test etmek için bor stresine mazur kalmış hücrelerin polizom profilleri incelenmiştir ve yeni sentezlenen proteinlere radyoaktif 35-S işaretli metiyoninin girmesi takip edilmiştir. Şekil 39'da görüldüğü gibi sukroz gradient santrifügasyon ile ayrıştırılan örneklerde bor muamelesinin polizom miktarını (aktif olarak translasyona uğrayan mRNA ların miktarlarını) azalttığı tespit edilmiştir.



Şekil 39. Yabani tip hücrelerde bor uygulanmamış ve 100 mM borik asit uygulanmış polizom profilleri

Benzer şekilde bora maruz kalmış hücrelerde yeni protein sentezinin durumu radyoaktif metiyoninin yeni sentezlenen proteinlere girmesiyle takip edildiğinde protein sentezinin yine borlu örneklerde yavaşladığı tespit edilmiştir (Şekil 40). Radyogramda borik asitin yeni protein sentezini yavaşlattığı gösterilmektedir.

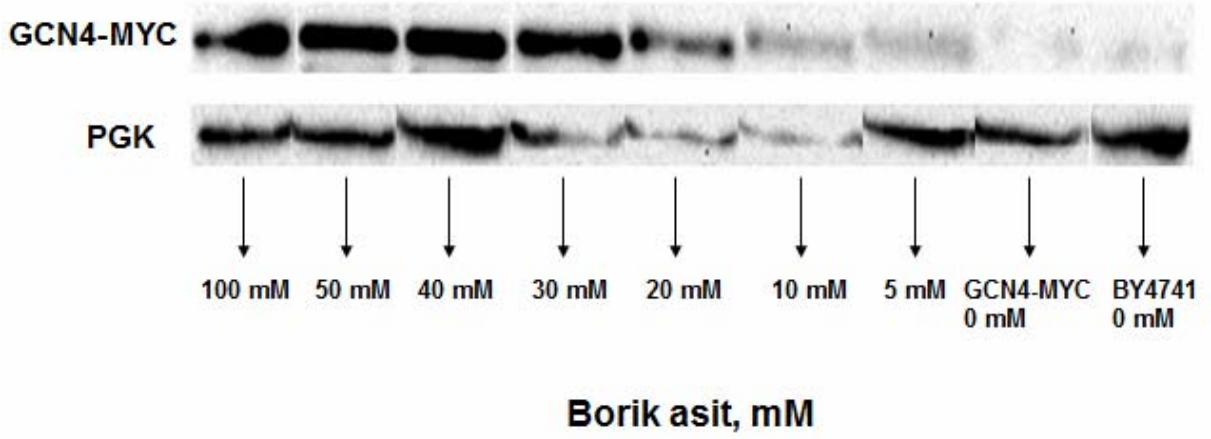


Şekil 40. Bor stresine maruz kalmış hücrelerde radyoaktif metiyoninin yeni sentezlenen proteinlere girmesi

Bir maya protein kinazı olan *GCN2*; amino asit açlığında transkripsiyonel aktivatör olan *GCN4*'ün translasyonunu eIF2 α 'yı fosfatlayarak stimüle etmektedir. Amino asit kısıtlaması olan koşullarda yüksüz tRNA'ların miktarı artmaktadır. *GCN2* kinazının aktivasyonu için ise bu yüksüz tRNA'ların *GCN2*'deki histidil tRNA sentetaz ilişkili domaine bağlanması gerekmektedir. Yine *GCN2*'deki serine 577 (S577) nin fosfatlanması *GCN2*'nin yüksüz tRNA'lara bağlanma afinitesini azaltmaktadır. S577, açlığın olmadığı durumlarda fosfatlanmaktadır ve *GCN2* kinazını inhibe etmektedir. Ancak S577'deki fosfatlanamayan alanin mutasyonu (S577A) amino asit kısıtlamasının olmadığı durumlarda *GCN2*'nin tRNA'ları bağlamasını arttırarak kısmi aktivasyonunu sağlamaktadır. Böylelikle *GCN4*'ün sentezi artmakta ve genel amino asit kontrol mekanizması tarafından kontrol edilen genlerin transkripsiyonu azalmaktadır (Garcio- Barrio, 2002; Cherkasova, 2003).

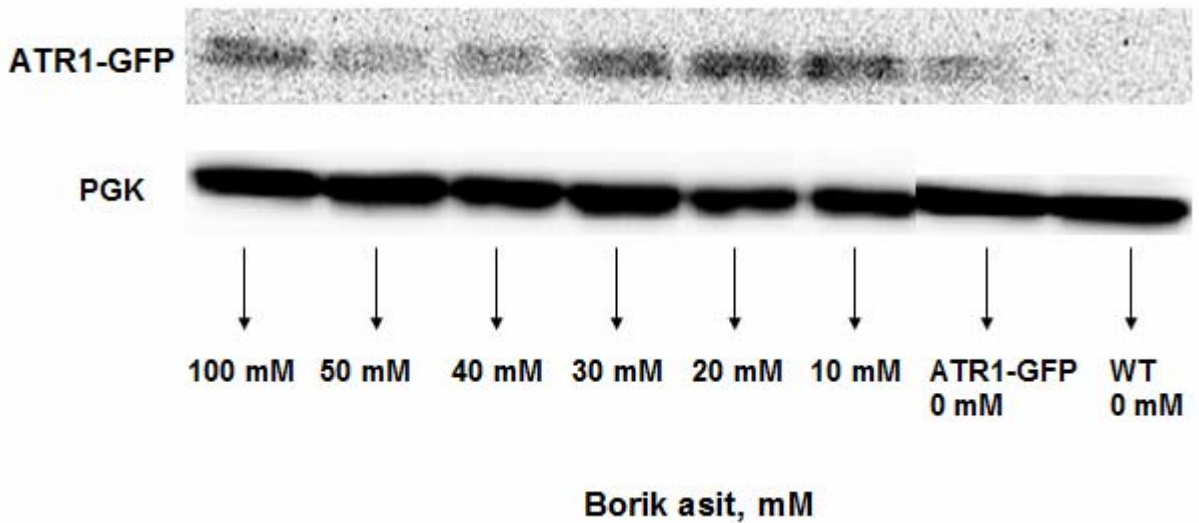
Bor muamelesinin de bu yolağı izleyerek benzer sonuçlara neden olduğunu düşünmekteyiz. Bu hipotezi doğrulamak için polizom profillemesi ve radyoaktif 35-S metabolik işaretlemelerinin yanı sıra western blot analizleri yapılmıştır. Bu amaçla ilk olarak *GCN4*

protein seviyelerinin bor muamelesiyle değişimi incelenmiştir. Kromozomal olarak Myc epitopu ile etiketlenmiş *GCN4* genini içeren hücreler zengin besiyerlerinde büyütölüp bir saat bor stresine maruz bırakıldıktan sonra toplanmıştır. SDS-PAGE'de proteinlerin ayrıştırılıp PVDF membrana transferinden sonra; membran ilgili antikolarla muamele edilmiş ve VersaDoc Imaging System ile görüntüler alınmıştır. Şekil 41'de Gcn4 proteininin bor muamelesiyle arttığı görülmektedir.



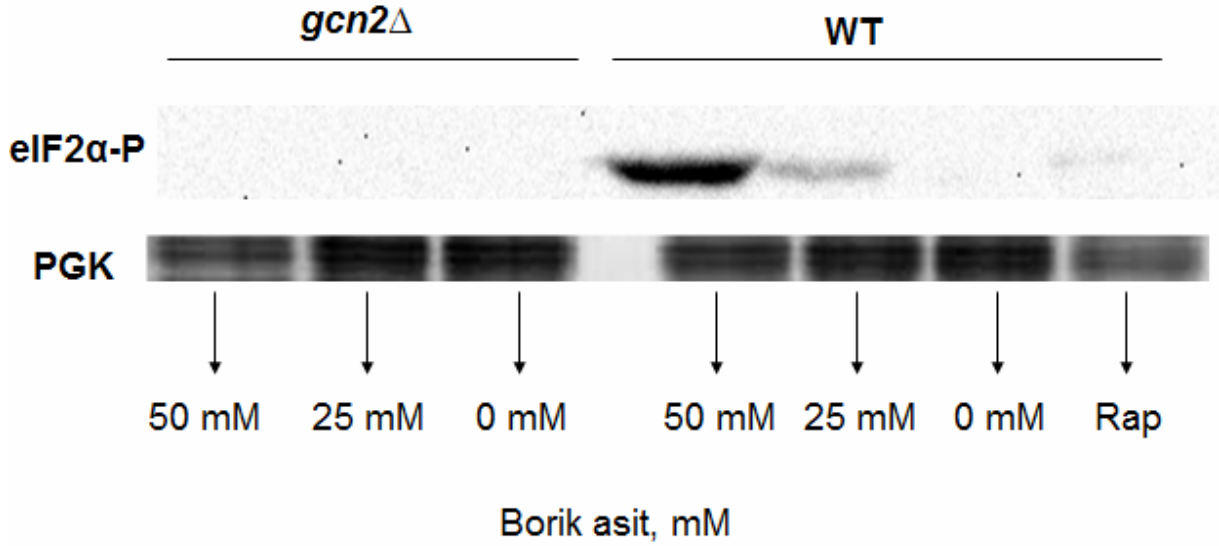
Şekil 41. GCN4-MYC western blot analizi

GCN4 aktivasyonunun amino asit biyosentez genlerini aktive ederken *ATR1* geninin de aktivasyonuna sebep olduğu fikrinden yola çıkılarak Kromozomal GFP etiketli *ATR1* protein seviyeleri western blot ile gözlenmiştir. Aynı şekilde *Atr1* protein seviyelerinin bor muamelesi ile arttığı Şekil 42' de görülmektedir.



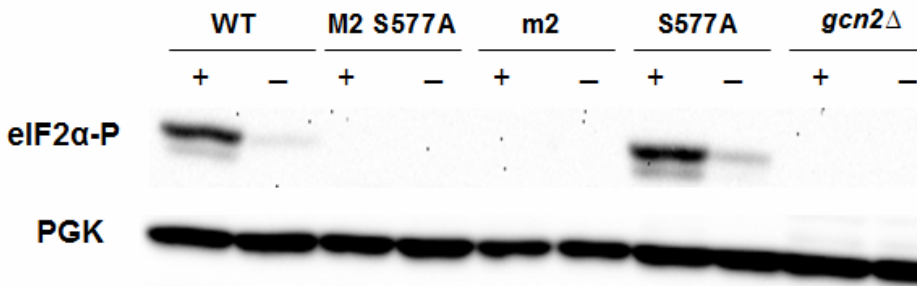
Şekil 42. ATR1-GFP western blot analizi

Bor muamelesi sonucunda eIF2 α 'nın fosfatlanmasının gerçekleşip gerçekleşmediğini ve eğer gerçekleşiyorsa söz konusu fosfatlanmanın GCN2 protein kinazı tarafından yapıldığını anlamak için ayrı bir western blot daha yapılmıştır. Bu denemeye göre de yabancı tip hücrelerde bor stresıyla birlikte eIF2 α fosfatlanması gözlenirken, *gcn2* Δ mutantında herhangi bir fosfatlanma gözlenmemiştir (Şekil 43).



Şekil 43. eIF2 α -P için western blot analizi, Rap; Rapamisin

Gcn2 kinaz normalde amino asit sıkıntısı durumunda yüksüz tRNA ların m2 domainine bağlanması sonucu aktif hale geçer ve eIF2 α yı fosfatlayarak protein sentezinin durmasına neden olur. Bor stresinde de benzer bir mekanizmanın var olup olmadığını anlamak için *gcn2* Δ mutantı hücreler m2 domaini çıkarılmış, S577A nokta mutasyonu içeren veya bunların kombinasyonunu içeren GCN2 plazmitleri ile transforme edildiler ve bir saat 50 mM bora maruz bırakıldılar. Sonuçlara göre m2 domaini olmayan Gcn2, eIF2 α nın fosfatlanmasını sağlamayamadı (Şekil 44). Buda bor stresinde hücre içinde yüksüz tRNA ların miktarının arttığını, bu tRNA ların GCN2 nin m2 domainine bağlanarak eIF2 α nın fosfatlanmasına ve protein sentezinin durmasına neden olduğunu göstermektedir.



Şekil 44. Borun eIF2 α fosforilasyonundaki etkisinin GCN2'nin tRNA bağlama aktivitesine bağlı olduğunun (m2 domainine) western blot analizi ile gösterilmesi

4. TARTIŞMA/SONUÇ/ ÖNERİLER

Proje kapsamında, bor toleransında gerekli genlerin bulunması için *Saccharomyces cerevisiae*'nin delesyon mutantlarından oluşan setler kullanılarak bütün genom taranmıştır. Bu analizler ile delesyonu bor dirençliliği sağlayan 6 gen ve delesyonu hücreleri bora duyarlı hale getiren 21 gen bulunmuştur. Buna ilaveten bir maya genomik DNA kütüphanesi borik asitin yüksek konsantrasyonlarında maya hücrelerinin büyümelerini destekleyen genler yönünden taranmış ve *ATR1* mayada önemli bir bor dirençlilik geni olarak bulunmuştur. İki *ATR1* paraloğu olan YMR279c ve YOR378w bor detoksifikasyonu ile ilişkili bulunamamıştır. *ATR1*'in aşırı ifadelmesi yabancı tip hücrelere bor dirençliliği sağlarken, delesyonu bu dirençliliği azaltmıştır. Ayrıca bor içeren besiyerlerinde büyütülen *atr1Δ* mutantlarındaki hücre içi bor konsantrasyonu yabancı tip hücrelerden daha fazla bulunmuştur. Ancak *ATR1*'in ifade edilmesiyle hücre içi bor seviyeleri düşmüştür. Tüm bunlardan *Atr1*'in borun hücre dışına atılmasında görev aldığını ve hücre içi bor seviyelerini toksik seviyenin altında tutarak hücrelere yardımcı olduğu sonucuna varmaktayız. Daha önce bulunmuş olan ve bor dirençliliği ile ilişkilendirilen bor taşıyıcıları arasında, sadece *Atr1* en geniş filogenetik yayılımı göstermektedir. Bor taşıyıcılarının farklı oluşumu birbiriyle ilişkili olmayan protein sekanslarıyla belirlenmiştir. Bu da bor transporterlarının bor detoksifikasyonundaki rollerinin birbirinden bağımsız olarak evrimleştiği fikrini doğrulamaktadır. Mikroarray sonuçlarımıza göre bor transporterları arasında ifadelmesi en çok artan *ATR1* olmuştur. *atr1Δ*, *bor1Δ*, *fps1Δ*, ve *dur3Δ* mutantlarının bor varlığında büyüme profillerini karşılaştırdığımızda sadece *ATR1* geninin delesyonu hücreleri aşırı duyarlı hale getirmiştir. Bu da borun elimine edilmesinde *ATR1*'in kritik bir önemi olduğunu öne sürmektedir. *atr1Δ* mutantları bora aşırı duyarlılık gösterirken, *ATR1*'in ifadelendiği hücreler 225 mM borik asit varlığında yaşayabilmişlerdir. Bu konsantrasyon bir ökaryotik canlı tarafından tolere edilebilen bugüne kadar gösterilmiş en yüksek bor miktarıdır. *ATR1* ekspresyonunun bor muamelesiyle ciddi bir şekilde artması da, *ATR1*'in mayada bor toleransı ile fizyolojik olarak alakalı bir gen olduğunu göstermiştir. Hücre içi bor miktarının *atr1Δ* mutantında yüksek olması ve *ATR1* ifade edilen hücrelerde düşük bulunması, *Atr1*'in bor trafiğini tek yönlü (hücre dışına doğru) kontrol ettiğini göstermiştir. *ATR1* prokaryot ve düşük ökaryotlardaki bir stres tolerans geni olarak görülebilir, ancak bor dışındaki substrat spektrumu henüz bulunamamıştır. Bu konuda yaptığımız çalışma ile *ATR1*'in ifadelmesi tuz stresine tolerans kazandırırken, oksidatif, ağır metal ve asetik asit streslerinde böyle bir durum gözlenmemiştir. Böylece *ATR1*'in genel bir stres tolerans geni olmayabileceği ancak en az bir substratın detoksifikasyonundan sorumlu olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

ATR1'in transkripsiyonel kontrolünün ayrıntıları bilinmemektedir, ancak *Gcn4* ve *Yap1* transkripsiyon faktörlerinin *ATR1* indüksiyonunda rol oynadıkları bilinmektedir (Coleman,

1997). Yap1 oksidatif strese cevaben ifadelenen genlerin kontrolünden sorumlu bir transkripsiyon faktörüdür. Gcn4 çoğunluğu amino asit biyosentez geni olan 500'den fazla genin ekspresyonunu kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür. Gcn2 ise bir protein kinazdır ve stres koşulları altında *eIF2 α* 'yı fosfatlamaktadır. *eIF2 α* 'nın fosfatlanması da genel olarak çoğu proteinin translasyonunu inhibe ederken, stresle kontrol edilen proteinlerin translasyonunu aktive etmektedir. Borun maya hücreleri üzerinde stres yarattığı çalışmalarımızla gösterilmiştir. Borun bir şekilde *GCN2* ile etkileşip *eIF2 α* 'nın fosfatlanmasını sağladığı, bu fosfatlanmanın da genel translasyonu baskılayıp *GCN4* translasyonunu aktive ettiği, sonrasında ise *GCN4*'ün *ATR1* ve aminoasit biyosentez genlerinin aktivasyonunu sağladığı denemelerimizde gösterilmiştir. Sonuç olarak bor hücrelerde protein sentezini inhibe etmektedir ve bu borun yüksek konsantrasyonlarda toksik olmasının nedeni olabilir.

Borun bütün canlılar tarafından kullanılıyor olması sebebiyle bor metabolizmasında rol oynayan genlerin filogenetik seviyede benzerlik göstermesi söz konusudur. Bu anlamda, bir canlı türünde bor metabolizması ile ilgili genlerin tespit edilmesi diğer canlılardaki benzer biyokimyasal basamakların tespiti açısından büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızın sağladığı sonuçların ve bilgilerin bitkiler ve hayvanlar alanında kullanılması hem sağlık hem de zirai açıdan kazançlı olacaktır. Mesela, Türkiye'nin bazı bölgelerinde topraktaki bor oranının yüksek olması nedeniyle zirai ürünler yetiştirilememektedir. Böylesi alanların değerlendirilmesi için yüksek miktarda bor içeren topraklarda yaşayabilecek transgenik bitkilerin üretilmesi söz konusu olabilir. Hayvanlar ve insanda ise sağlık alanında borun etkili olduğu üreme, hormonal regulasyon, kanser oluşumu ve barsaklardan bazı minerallerin emilmesi gibi hususlarda yeni ufuklar açılabilir. Ayrıca bor transportunun ve fizyolojisinin moleküler mekanizmaları konusunda ayrıntılı bir bilgi yoktur. *ATR1*'in regülasyonu ile ilgili yaptığımız çalışmalar da diğer transporter ve metal tolerans metabolizmalarının aydınlatılmasına ışık tutacaktır.

REFERANSLAR

1. Bennett, A., Rowe, R. I., Soch, N. and Eckhert, C. D., "Boron stimulates yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) growth" *J. Nutr.* 129:2236–2238, (1999).
2. Brown PH, Shelp BJ, Boron mobility in plants. *Plant Soil* 193: 85–101, (1997).
3. Bolanos, L., Lukaszewski, K., Bonilla, I., Blevins, D., "Why Boron", *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol.42, pp.907–912, (2004).
4. Cherkasova, V., Hinnebush A. Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2 α kinase GCN2. *Genes & Development*. 17:859–872, (2003).
5. Coleman, S. T., E. Tseng, W. S. Moye-Rowley, . *Saccharomyces cerevisiae* basic region-leucine zipper protein regulatory networks converge at the *ATR1* structural gene. *J. Biol. Chem.* 272:23224–23230, (1997).
6. Cui Y. Winton M.I., Zhang, Z.F, Rainey C., Marshall J., deKernion J. B., Eckhert, C.D. "Dietary boron intake and prostate cancer risk". *Oncol Rep.*,11(4):887-92.(2004)
7. Devirian TA, Volpe SL, The physiological effects of dietary boron. *Crit Rev Food Sci Nutr* 43:219–231, (2003).
8. Environmental Protection Agency, *Toxicological Review of Boron and Compounds* 7440:42–8, (2004).
9. Garcio-Barrio,M., Dong, J., Cherkasova, V., Zhang, X., Zhang F., Ufano, S., Lai, R., Qin, J., and Hinnebush A. Serine-577 is phosphorylated and inhibits the tRNA binding and eIF2 alpha kinase activities of GCN2. *J. Biol. Chem.* 227: 30675-30683, (2002).
10. Gbelska, Y., J. J. Krijger, and K. D. Breunig. Evolution of gene families: the multidrug resistance transporter genes in five related yeast species. *FEMS Yeast Res.* 6:345–355, (2006).
11. Goffeau, A., J. Park, I. T. Paulsen, J. L. Jonniaux, T. Dinh, P. Mordant, and M. H. Saier, Jr. Multidrug-resistant transport proteins in yeast: complete inventory and phylogenetic characterization of yeast open reading frames with the major facilitator superfamily. *Yeast* 13:43–54, (1997).
12. Hu, H. and Brown, P. H.. Absorption of Boron by Plant Roots. *Plant and Soil.* 193:49-58 (1997).
13. Hunt, C.D. Dietary Boron: Evidence for Essentiality and Homeostatic Control in Humans and Animals. *U.S. Dept. Agriculture, Agricultural Research Service, Grand Forks Human Nutrition Research Center*, (2007).
14. Juan J. C., Jes´us R. and Agust´in G., "Boron in Plants: Deficiency and Toxicity", *Journal of Integrative Plant Biology*, 50 (10): 1247–1255, (2008)

15. Kanazawa, S., Driscoll M., Struhl K., *ATR1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a transmembrane protein required for aminotriazole resistance. *Mol. Cell. Biol.* **8**:664–673, (1988).
16. Kanik-Ennulat, C., and Neff N., Vanadate-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* show alterations in protein phosphorylation and growth control. *Mol. Cell. Biol.* **10**:898–909, (1990).
17. Kaya A., Karakaya C.H., Fomenko E.D., Gladyshev N.V., Koc A., Identification of a novel system for boron transport: Atr1 is a main boron exporter in yeast, *Molecular and Cellular Biology*, **29**, 13, 3665-3674, (2009)
18. Mack, M., P. Gompel-Klein, E. Haase, J. Hietkamp, A. Ruhland, and M. Brendel, Genetic characterization of hyperresistance to formaldehyde and 4-nitroquinoline-*N*-oxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **211**:260–265, (1988).
19. Miwa K., Takano J., Omori H., Seki M., Shinozaki K., Fujiwara T., Plants Tolerant of High Boron Levels, *Science*, Vol 318, (2007).
20. Moseman R., Chemical Disposition of Boron in Animals and Humans, *Environ Health Perspect* **102** (Suppl 7):113–117, (1994).
21. Nielsen, F.H., Dietary supplementation of physiological amounts of boron increases plasma and urinary boron of perimenopausal women. *Professional Communication. Proc North Dakota Acad Sci* **50**:52, (1996).
22. Nielsen, F.H., The nutritional importance and pharmacological potential of boron for higher animals and humans. In *Boron in plant and animal nutrition* (H.E. Goldbach, B. Rerkasem, M.A. Wimmer, P.H. Brown, M. Thellier, and R.W. Bell, eds.) *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, New York, pgs. 37–49, (2002).
23. Nozawa, A., Takano J., Kobayashi M., von Wiren N., and Fujiwara T., Roles of BOR1, DUR3, and FPS1 in boron transport and tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **262**:216–222, (2006) .
24. NRC., Mineral Tolerance of Animals. 2nd ed. *National Academy Press*, Washington, D.C, (2005).
25. O'Neill, M. A., Ishii T., Albersheim P., Darvill A. G., Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **55**:109–139, (2004).
26. Rowe RI, Bouzan C, Nabili S, Eckhert CD. 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, (1998).
27. Rowe, R. I., Boron is required for zebrafish embryogenesis, *J. Exp. Biol.* **202**:1649–1654, (1999).

28. Servos, J., Haase, E., and Brendel, M. Gene SNQ2 of *Saccharomyces cerevisiae*, which confers resistance to 4-nitroquinoline-N-oxide and other chemicals, encodes a 169kDa protein homologous to ATP-dependant permeases. *Mol. Gen. Genet.* 236: 214–218 (1993).
29. Stolz, J., and Munro S., The components of the *Saccharomyces cerevisiae* mannosyltransferase complex M-Pol I have distinct functions in manan synthesis. *J. Biol. Chem.* 277:44801–44808, (2002).
30. Takano, J., Arabidopsis boron transporter for xylem loading. *Nature* 420(6913):337-40, (2002).
31. Takano, J., Miwa K., Yuan L., von Wiren N., and Fujiwara T., Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of *Arabidopsis thaliana*, regulated by boron availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:12276– 12281, (2005).
32. Takano J., Wada M., Ludewig U., Schaaf G., Wiren N., Fujiwara T., 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, (2006).
33. Tanaka M. and Fujiwara T., Physiological Roles and Transport Mechanisms of Boron: Perspectives from Plants, *Eur J Physiol*, 456:671–677, (2008).
34. Warrington, K., The effects of boric acid and borax on the bread bean and certain other plants. *Ann Bot* 37:629–672, (1923).
35. Winzeler EA et al, Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis, *Science*, 285(5429):901-6, (1999).
36. Woods, W.G., An introduction to boron: History, sources, uses, and chemistry. *Environmental Health Perspective* 102:5–11, (1994).
37. Yazbeck C., Kloppmann W., Cottier R., Sahuquillo J., Debotte G., Huel G., Health impact evaluation of boron in drinking water: a geographical risk assessment in northern France. *Environ Geochem Health* 27: 419–427, (2005).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 104T213
Proje Başlığı: Borun biyolojik etki mekanizması; Bor metabolizmasında rol oynayan genlerin bulunması
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Doç. Dr. Ahmet Koç Araştırmacılar: Yard. 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: 01.04.2005 – 01.04.2010
Öz (en çok 70 kelime) Bu projede bor transportu ve fonksiyonunu anlamak amacıyla yapılan genetik çalışmalarla mayada bor dirençliliği ve duyarlılığında rol oynayan genler bulunmuştur. Ayrıca maya genomik DNA kütüphanesi taraması sonucunda, <i>ATR1</i> geni, borun hücre dışına atılmasını sağlayarak hücrelerin yüksek bor konsantrasyonlarında büyümesini sağlayan önemli bir bor dirençlilik geni olarak bulunmuştur. Ayrıca yapılan biyokimyasal analizlerde borun protein sentezini inhibe ettiği bulunmuştur.
Anahtar Kelimeler: Borik asit, <i>ATR1</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , bor dirençliliği, <i>GCN4</i> , translasyonel regülasyon, genomik,
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:

- 1-Irem Uluişik, Alaattin Kaya, Dmitri Fomenko, Çağlar Karakaya ve Ahmet Koç. Transcriptional regulation of boron exporter *Atr1* and mechanism of boron toxicity. (Makale, hazırlanmakta)
- 2-Genome-Wide Identification of Genes That Play Role in Boron Stress Response in Yeast. Uluisik I, Kaya A, Unlu ES, Avsar K, Karakaya HC, Yalcin T, Koc A. 21 Nisan 2010'da "Genomics" dergisine gönderilmiştir. (Makale)
- 3-Identification of a novel system for boron transport: *Atr1* is a main boron exporter in yeast. Kaya A, Karakaya HC, Fomenko DE, Gladyshev VN, Koc A. Mol Cell Biol. 2009 Jul;29(13):3665–74. (Makale)
- 4- *Atr1* role in boron transport in yeast, Alaattin Kaya, Caglar Karakaya, Dimitri Fomenko, Vadim N Gladyshev, Ahmet Koc, Department of Molecular Biology & Genetics, Izmir Institute of Technology, 35430 Urla, Izmir, Turkey, Small Meeting for Yeast Transporters 2009, Blankenberge, Belçika, 4–8 Eylül 2009. (Sözlü Sunum)
- 5- Alaattin KAYA, Çağlar Karakaya ve Ahmet Koç. "Mayada Bor Dirençlilik Mekanizması". Bildiri No: S-01-A. I.Ulusal Maya Moleküler Biyolojisi ve Biyoteknolojisi Sempozyumu Bursa, Türkiye, 30–31 Mayıs 2008. (Sözlü Sunum)
- 6-Mechanism of boron resistance and toxicity. İrem Uluişik and Ahmet Koç, Izmir Institute of Technology, Department of Molecular Biology and Genetics, Urla, Izmir. Türkiye Bilimler Akademisi Yıllık değerlendirme toplantısı 2009, ZKU, Zonguldak, 25–28 Eylül 2009. (Sözlü Sunum)
- 7-Bir bor transporterı olarak *ATRI* geninin identifikasyonu ve mayada bor stresine karşı *ATRI*'in regülasyonunun moleküler mekanizmalarının aydınlatılması. İrem ULUIŞIK, Alaattin KAYA, Çağlar KARAKAYA, Ahmet KOÇ. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21–25 Haziran 2010, Pamukkale Üniversitesi/ DENİZLİ. (Poster Sunumu)