

Demir Stresine Direnç Kazandırılmış *Saccharomyces cerevisiae* Mayasının Demir Taşınımı ile İlişkili Genlerinin Anlatım Düzeylerinin Gerçek Zamanlı, Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (q rt-PCR) ile Belirlenmesi

Berrak Gülçin BALABAN^{*,**}, Ülkü YILMAZ^{*,**}, Ceren ALKIM^{*,**}, Zeynep Petek ÇAKAR^{*,**}

^{*}İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

^{**}İstanbul Teknik Üniversitesi, Dr. Orhan Öcalgıray Moleküler Biyoloji-Biyoteknoloji ve Genetik Araştırmalar Merkezi (İTÜ-MOBGAM)

ÖZET

Amaç: Çalışmanın amacı, model organizma olarak demire dirençli *Saccharomyces cerevisiae* mayası kullanılarak, demir taşınımının taşınımından sorumlu genlerin demir direnç mekanizmasındaki rolünün deneysel olarak araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Önceki çalışmalarımızda, demir direnci kazandırılmış olan *S. cerevisiae* M8FE suşu, bu çalışmada *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D referans suşu ile birlikte kullanılmıştır. Referans suş ile karşılaştırmalı olarak, M8FE'nin demir taşınımıyla ilişkili olduğu bilinen AFT1, FET3, FET4, COT1, CCC1 ve ZRC1 genlerinin anlatım düzeyleri; kontrol, düşük (1 mM) ve yüksek (15 mM) demir stresi altında, gerçek zamanlı, kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (q rt-PCR) yöntemiyle belirlenmiştir.

Bulgular: İncelenen genler arasında, anlatım düzeyleri en çok farklılaşan gen FET3'tür. Demire dirençli M8FE suşunda, 1mM demir stresi varlığında bu genin anlatım düzeyi, kontrol koşullarındaki referans suşunun yaklaşık 16 katına, yüksek demir stresi (15 mM) varlığında yaklaşık üç katına çıkmıştır. CCC1 ve COT1 genlerinin anlatımında da genel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. AFT1 geninin anlatım düzeyleri, yüksek demir stresi varlığında azalırken, FET4 geninin ise düşük demir stresi varlığında artmıştır. ZRC1 geni ise, yalnızca yüksek (15 mM) demir stresi altındaki M8FE'de, kontrol koşullarındaki referans suşunun anlatım düzeyinin yaklaşık üç katına çıkmıştır. Yüksek demir stresi, M8FE'de ZRC1 gibi CCC1 ve COT1 genlerinin anlatımında da ciddi bir artışa neden olmuştur.

Sonuç: Gen anlatım düzeylerinin analizine dair bulgular, FET3 ve AFT1 genlerinin demir direnci ve ortamdaki demir iyonları düzeyiyle ilişkili olduğunu göstermektedir. Gen anlatım düzeyi verileri, vakuole demir taşınımından sorumlu CCC1 geninin ve çinko ile kobaltın vakuole taşınımından sorumlu ZRC1 ve COT1 genlerinin de yüksek demir stresi varlığında vakuole demir taşınımı ve demir direnci ile ilişkili olabileceğine işaret etmektedir.

Anahtar kelimeler: Demir direnci, q rt-PCR, *Saccharomyces cerevisiae*

SUMMARY

Determination of Iron-Transport-Related Gene Expression Levels in Acquired Iron Stress-Resistant *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Using Real-Time, Quantitative Polymerase Chain Reaction (q rt-PCR)

Objective: The aim of this study was to investigate experimentally the roles of iron transport-related genes involved in iron-resistance mechanism, using the iron-resistant yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism.

Materials and Methods: *S. cerevisiae* M8FE strain previously made resistant to iron ion in our previous studies was used with *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D reference strain. The expression levels of AFT1, FET3, FET4, COT1, CCC1 and ZRC1 genes known to be related to iron ion transport were comparatively determined under control, low (1 mM) and high (15 mM) iron-stress conditions, using real-time, quantitative polymerase chain reaction (q rt-PCR) method.

Results: Among the investigated genes, FET3 had the highest variation in expression levels. In the presence of 1 mM iron-stress, FET3 expression increased in iron stress-resistant M8FE strain up to about 16-fold of the reference strain under control conditions whereas it increased to about three-fold at high (15 mM) level of iron-stress. Generally significant increases were also observed in CCC1 and COT1 gene expression levels. AFT1 expression levels decreased under high iron-stress while those of FET4 gene increased under low iron stress. ZRC1 expression level increased up to three-fold of the reference strain under control conditions in M8FE grown only under high (15 mM) iron-stress. High iron-stress resulted in a significant increase in CCC1 and COT1 gene expression levels in M8FE, similar to ZRC1.

Conclusions: Gene expression analysis results showed that FET3 and AFT1 genes are related to iron resistance and environmental iron ion levels. Gene expression level data imply that CCC1, responsible for vacuolar iron-transport, ZRC1, for vacuolar zinc-transport, and COT1, for vacuolar cobalt transport which all may be associated with vacuolar iron transport under high levels of iron stress, and iron resistance.

Key words: Iron resistance, q rt-PCR, *Saccharomyces cerevisiae*

Alındığı tarih: 07.06.2016

Kabul tarihi: 13.07.2016

Yazışma adresi: Zeynep Petek Çakar, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Maslak, 34469, İstanbul **Tel:** (0212) 285 72 63 **Faks:** (0212) 285 63 86 **e-posta:** cakarp@itu.edu.tr

GİRİŞ

Pek çok metal, canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri için gereklidir. Bu nedenle canlılar metal iyonlarının hücre içine taşınımı için sistemler geliştirmişlerdir. Ancak canlıların metal iyonlarına yüksek konsantrasyonlarda maruz kalmaları ise toksisite ile sonuçlanır.

Demir, hemen hemen tüm ökaryotik organizmalar için önemli bir yapısal elementtir. Ferrik (Fe^{3+}) ve Ferröz (Fe^{2+}) oksidasyon düzeyleri arasında geçiş yapabilmesi, demiri yükseltgenme-indirgenme reaksiyonları için önemli kılar. Yapısal demir bileşenleri; elektronların taşınımından sorumlu; ferrodoksinler, Fe/S proteinleri, heme proteinleri, süperoksit dismutaz (SOD) ve dioksigenazlarda bulunur⁽¹⁻³⁾.

Demir, reaktif radikallerle etkileşerek DNA hasarına, lipid peroksidasyonuna, protein sülfhidrillerinin azalmasına neden olabilir. Oksidatif hasara neden olan hidroksil radikallerinin ($\bullet OH$) oluşumunu, Fenton reaksiyonu ile sağlar⁽⁴⁾. Demir metabolizması insan sağlığı açısından da önemlidir. Kalıtsal hemokromatozis ve anemi, demire dayalı temel hastalıklardandır. Anahtar proteinlerin mutasyonları, hastalıklara neden olmaktadır. Demirin taşınması, algılanması, metabolize edilmesi ve kullanımı ile ilişkili anahtar proteinlerin mutasyonları sonucunda, demir eksikliği veya aşırı alımı ile ilişkili hastalıklar ortaya çıkmaktadır⁽⁵⁾. Hemokromatozis hastalığının ilerlemesi ile, organlarda aşırı miktarda demir birikimi gerçekleşir ve bunun sonucunda da şeker, hepatoma, siroz, kardiyomiopati ve artrit gibi hastalıklar gelişebilir⁽⁶⁾.

Basit bir ökaryotik organizma olan *Saccharomyces cerevisiae* mayası, endüstriyel öneminin yanı sıra, insan da dâhil olmak üzere, yüksek ökaryotlara dair karmaşık biyolojik süreçlerin ve bunlarla ilişkili hastalıkların moleküler mekanizmalarını aydınlatmada da bir model organiz-

ma olarak önem taşımaktadır. *S. cerevisiae*'nin genom dizisi tamamen aydınlatılmış olup, memeli genom dizisinin %1'inden daha kısadır^(2,7). *S. cerevisiae* genomu, insan genomundan 200 kat daha küçük ve *Escherichia coli* genomundan dört kat daha uzundur. Maya genomu oldukça kompakt bir yapıdadır, genomun %70'i Açık Okuma Çerçevesi'nden (ORF) oluşmaktadır ve yüksek ökaryot genomlarına kıyasla genler arası boşluk daha kısadır. Kodlanmayan DNA içermez ve genlerin yalnız %4'ü intron içerir^(8,9). Maya genomunun bu özellikleri ve genetik manipülasyon kolaylığı, genlerin fonksiyonlarını anlamak ve insan genomundaki homologlarını bulmak yönünden avantaj sağlar. Mayada bazı metal homeostaz genleri bulunmakta olup, bunların insan genomundaki homologları da mevcuttur. *FET3* maya geni, insan Hephaestin/Ceruloplasmin proteinlerini kodlayan genler ile homologtur ve demir homeostazındaki multi-bakır ferrosidaz fonksiyonundan sorumludur. Bu genlerdeki hasarlar, insanlarda metal ile ilişkili hastalıkların oluşmasına yol açar⁽⁹⁾.

Organizmalar, yüksek konsantrasyonlarda demire cevap olarak, taşıyıcı genlerin anlatımını baskılayarak, düşük kapasitede alım mekanizmasını çalıştırarak, metallerin hücre dışına taşınımı için tasarlanmış direnç sağlayıcıların anlatımını arttırarak metal toksisitesi ile mücadele ederler⁽¹⁰⁾. Bir diğer mücadele yönteminin ise vakuollerde depolama (sequestration) şeklinde olduğu bilinmektedir⁽¹¹⁾. Metal iyonlarının regülasyonunda ve toksik metallerin detoksifikasyonunda maya vakuolleri oldukça önemli rol oynar. Ramsay ve Gadd⁽¹²⁾ 1997'de; vakuolü zedelenmiş bir *S. cerevisiae* mutantının Zn, Mn, Co ve Ni'ye karşı hassasiyetinin arttığını ve metal biriktirme kapasitesinin düştüğünü göstermişlerdir.

Aft1 proteini, demir alımı ve homeostazı ile ilişkili genleri düzenleyen bir transkripsiyon faktö-

rüdür. Demir yoksunluğunda, Aft1p çekirdekte konuşlanıp, DNA'da düzenleyici bölgeye bağlanır ve demir alımı ile homeostazından sorumlu olan genlerin transkripsiyonunu indükler. Demirin yüksek konsantrasyonlarda mevcut olduğu tersi durumlarda ise, aft1p sitoplazmada konuşlanmaktadır⁽¹³⁾.

Düşük afinite, hücrel demir miktarına göre düzenlenme az iken, yüksek afinite demir taşıma sisteminde hücrel demir miktarı ile düzenlenme oldukça fazladır. Hücreler, demirin çok olduğu ortamlarda, demir alımı için düşük afinite taşıma sistemini kullanırlar. Fe²⁺ fizyolojik pH'da Fe³⁺'dan çok daha fazla çözünür. Bu nedenle, hücreler demiri elde etmek amacıyla ferröz demiri ferrik demire indirgerler. *S. cerevisiae* FRE1 ve FRE2 tarafından kodlanmış olan iki protein tarafından ferrik indirgeme sağlanır⁽⁵⁾.

Yüksek afinite demir taşıma sistemi, demir miktarı tarafından düzenlenir. Çevresel demirin az olduğu durumlarda, yüksek afinite demir taşıma sistemi indüklenir. Bu yüksek afinite demir alım sistemi, maya hücrelerinin çoğunda ağırlıklı olarak kullanılır⁽⁵⁾. Bu mekanizma çoklu bakır oksidaz (multicopperoxidase)-Fet3 ile Fe²⁺'nın Fe³⁺'ya oksidasyonu ve Fe³⁺'nın Ftr1-permeaz ile hücre zarından geçirilmesi ile olur. Fet3p ve Ftr1p proteinlerini kodlayan FET3 ve FTR1 anlatımı, Aft1p tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedir⁽⁵⁾. ATP bağımlı olmayan transmembran taşıyıcı 'Fet4p' ise, düşük afinite demir alımı sisteminden sorumludur. Fet4p demir homeostazında yalnızca sınırlı bir rol oynar⁽⁵⁾.

Bu çalışmanın amacı, ökaryotik bir model organizma olan *S. cerevisiae* mayası kullanılarak canlılarda demir iyonlarına olan tepki ve direncin moleküler mekanizmasını aydınlatmaya yönelik; demir iyonunun taşınımı ile ilgili genlerin anlatım düzeylerinin, demire direnç kazandı-

rılmış ve kontrol (referans) maya suşlarında karşılaştırmalı olarak belirlenmesidir. *S. cerevisiae* mayasında demirin hücreye alımı ve taşınımı ile ilişkili oldukları literatürde yer alan genler Şekil 1'de şematik olarak gösterilmiştir. Bu genlerin (AFT1, COT1, CCC1, ZRC1, FET3 ve FET4) anlatım düzeylerindeki artış veya azalmalar; demirin hücre içi taşınımı ve özellikle de kazanılmış demir direnci hakkında moleküler düzeyde önemli bilgiler sağlayabileceğinden ötürü, bu genlerin anlatım düzeyleri, kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (q-PCR) kullanılarak belirlenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Yazılımlar ve Web adresleri

Bu çalışmada, aşağıdaki yazılımlar ve web adreslerinden yararlanılmıştır:

- Primer3Plus: Primer tasarımı için kullanılmıştır. (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>)
- *Saccharomyces cerevisiae* veribankası: *S. cerevisiae*'nin ilgili gen verileri için bu veritabanından yararlanılmıştır. (<http://www.yeastgenome.org/>)
- LightCycler® 480 Software: q-PCR cihazının yazılımıdır. Software Version 1.2.

Maya Suşu, Besiyeri, Kültür Koşulları

Saccharomyces cerevisiae CEN.PK113-7D (MATA, MAL2-8c, SUC2) suşu Dr. L. Benbadis (Toulouse Üniversitesi, Fransa) tarafından sağlanmış ve bu çalışmada referans suşu (905) olarak adlandırılmıştır. M8FE adlı 35mM demir stresine dirençli *S. cerevisiae* suşu ise; tersine metabolik mühendislik yaklaşımıyla, referans suşunu sürekli olarak artan demir iyonları varlığında kültüre ederek, araştırma grubumuz tarafından daha önceki çalışmalarımızda elde edilmiştir⁽¹⁴⁾. Maya kültürlerinin gelişmesi için; %2 dekstroz, %0.5 amonyum sülfat, %0.17

maya azot bazı (amino asitsiz) ve katı besiyeri için %2 agar içeren Maya Minimal Besiyeri (YMM) kullanılmıştır. Maya kültürleri, 100 ml YMM içeren 500 ml'lik Erlenmeyer şişelerinde, 30°C sıcaklık ve 150 devir/dak karıştırma hızında (Certomat® SII Sartorius, Almanya) üretilmiştir. Kültürlerin gelişimi, spektrofotometrik (Shimadzu UV-1700, Japonya) olarak, 600 nm dalga boyunda yapılan düzenli optik yoğunluk (OD_{600}) ölçümleriyle izlenmiştir. Maya kültürleri, hacmen %30 oranında gliserol içerisinde, -80°C'de (Sanyo, Japonya) uzun süreli olarak saklanmıştır.

Primer Tasarımı

Çalışmada incelenen genlerin anlatım düzeylerinin analizi için, her bir gene özgü primer tasarımı "Primer3 Plus Software" ve "Amplify3 - 3.1.4 versiyonu - MacOS X" yazılımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu genlere ait primer dizileri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Total-RNA İzolasyonu, Konsantrasyon ve Saflık Tayinleri

Referans suşu 905 ve demire dirençli mutant suşu M8FE'nin -80°C'deki stok kültürleri maya minimal besiyerinde 24 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün bu önkültürler, 100 ml'lik Erlenmeyer şişelerindeki 0 mM (kontrol), 1 mM ve 15 mM $NH_3Fe_2SO_4$ içeren 20 ml maya minimal besiyerlerine, kültürlerin başlangıç OD_{600} değerleri sıfır tam yüzde yirmi beş olacak şekilde ekilerek 30°C, 150 dev/dakikada inkübe edilmiştir.

Tablo 1. Primer dizileri.

Gen adı	İleri primer dizisi (5'→3')	Geri primer dizisi (5'→3')
ACT1(kontrol)	cttcaacgttccagccttc	tcaccggaatccaaaacaat
AFT1	atgcatctaaaaggccatgc	ggcagtggaagatttcatt
COT1	gcatggtgtgtttcttcacg	ggaagccttgacgatagag
CCC1	actaagaacgcagtggtga	tcatgccttgaactattgct
FET3	acggtgtgaattacgccttc	ttgaaagcgtgaccatgta
FET4	aactgcctgtgaaaattgg	ttctccggtgtaagggtggag
ZRC1	aagaaattcaaaaccaagg	catgatcgtggaacaaaaat

Kültürlerin OD_{600} değerleri üçe ulaştığında, "High Pure RNA Isolation Kit" (Roche, İsviçre) kullanılarak RNA izolasyonu yapılmış ve elde edilen total-RNA'lar -80°C'de saklanmıştır. Referans suşu 905 ve demire dirençli mutant M8FE'nin kontrol ve demir (1 ve 15 mM $NH_3Fe_2SO_4$) stresi koşullarında üretilmiş kültürlerinden izole edilen total-RNA'ların konsantrasyonları ve saflık dereceleri spektrofotometrik olarak (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, ABD) ölçülmüştür.

RT-PCR ile cDNA Sentezi

Reverse transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu ile her bir kültüre ve koşula ait total-RNA'lardan cDNA sentezi "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit" (Roche, İsviçre) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Daha önce ölçülmüş olan total-RNA konsantrasyon değerleri kullanılarak, cDNA sentezi öncesinde her bir örneğin RNA konsantrasyonu $1 \mu g/\mu L$ 'ye eşitlenmiş ve bunu takiben reverse transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonda $50 \text{ pmol}/\mu L$ anchored-oligo(dT)₁₈ primerler kullanılmıştır.

Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (q-PCR) ile Genlerin Anlatım Düzeylerinin Analizi

Çalışmada incelenen genlerin anlatım düzeyleri, LightCycler® 480 (Roche, İsviçre) cihazı ile "LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche, İsviçre) kiti kullanılarak belirlenmiştir. Kontrol geni (housekeeping gene) olarak, maya çalışmalarında sıklıkla tercih edilen, beta-aktin (β -actin, *ACT1*) geni kullanılmıştır. Her bir hedef gen ve kontrol geni için uygun amplifikasyon sıcaklıkları optimize edildikten sonra, standart eğri (standard curve) grafiği oluşturulmuştur. Standart eğri grafikleri oluşturulurken verimliliğin (efficiency) iki civarında, hatanın (error) sıfır tam onda ikinin altında ve eğimin [-3,2] -

[-3,4] (slope) değer aralığında olmasına özen gösterilmiştir⁽¹⁵⁾. Relatif gen anlatımlarının analizi, karşılaştırmalı C_T metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir⁽¹⁶⁾. Üç biyolojik yinelemeden elde edilen C_T değerlerinden hesaplanan ortalama $2^{-\Delta CT}$ değerleri kullanılmış, standart sapmalar hesaplanmıştır. Relatif ekspresyon düzeyleri, her $2^{-\Delta CT}$ değerinin referans suşu 905'in kontrol koşullarındaki $2^{-\Delta CT}$ değerine bölünmesiyle elde edilmiştir. Reaksiyon spesifitesini belirlemek için her deneme sonrası erime eğrisi analizi (melting curve analysis) yapılmıştır. Kullanılan q-PCR programı her bir gene spesifik primer dizileri için ayrı ayrı optimize edilmiş olmakla birlikte, genel hatlarıyla Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Gen anlatım analizlerinde kullanılan q-PCR programı.

	Sıcaklık (°C)	Süre	Tekrar sayısı
Ön-inkübasyon	95	10 dk.	1
Amplifikasyon			
Denaturasyon	95	10 s	45
Bağlanma	56	18 s	
Polimerizasyon	72	20 s	
Erime	95	5 s	1
	65	1 dk.	
	97	-	
Soğuma	40	10 s	1

BULGULAR

DeneySEL çalışmaların öncesinde, *S. cerevisiae*'de demir taşınımı ve direncine ilişkin kapsamlı bir literatür taraması yapılmış ve demir alım mekanizması ile ilişkili olan genler (*AFT1*, *FET3*, *FET4*, *COT1*, *CCC1* ve *ZRC1*) tespit edilmiştir. Daha sonra q-PCR yöntemi ile bu genlerin anlatım düzeyleri; referans suş ve demire dirençli suşta, gerek kontrol gerekse demir stresi koşullarında karşılaştırılmalı olarak belirlenmiştir.

Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real time-PCR) ile Genlerin Anlatım Düzeylerinin Analizi

Demir alım mekanizması ile ilişkili olan genle-

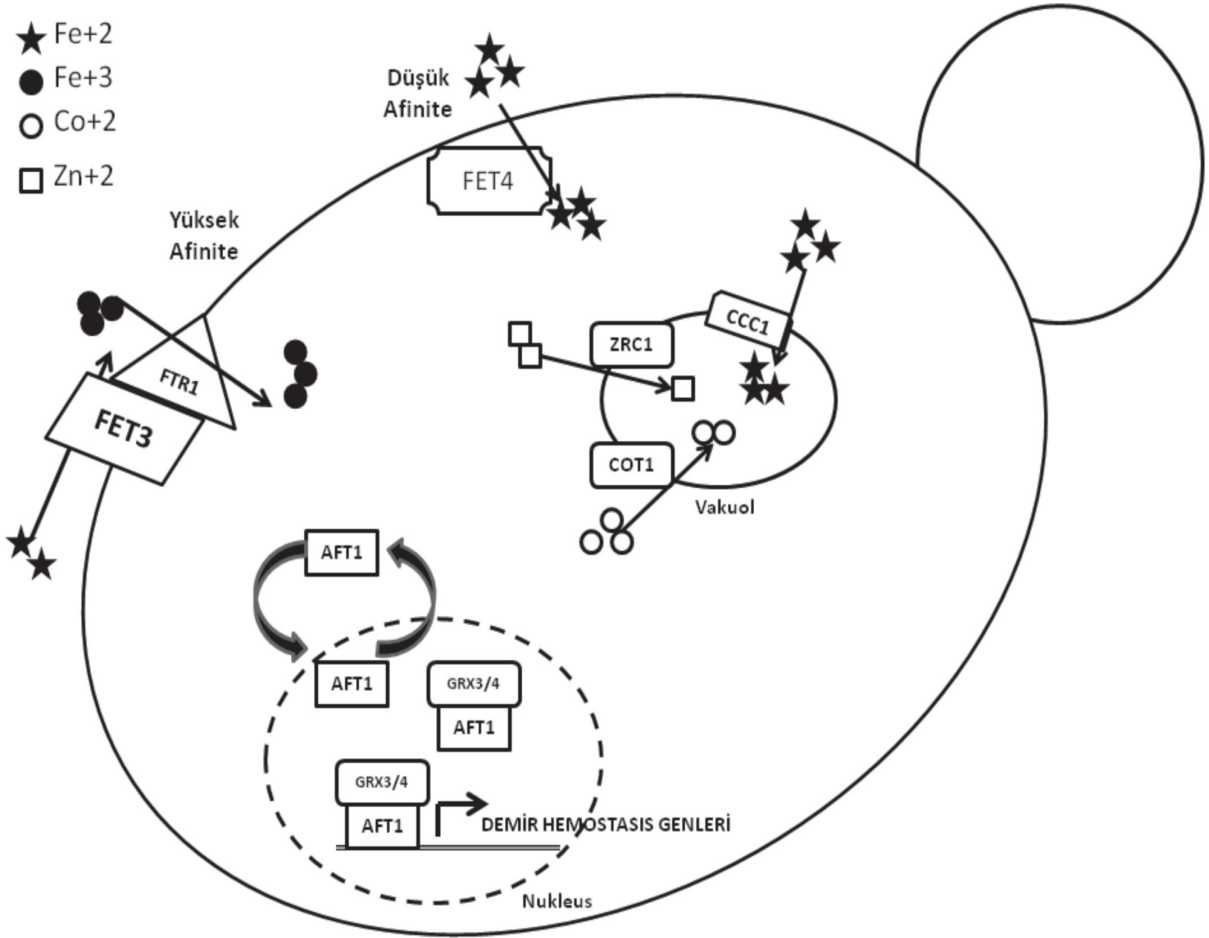
rin anlatım düzeylerinin analizi için bu genlere özgü primerler tasarlanmıştır. Referans suşu 905 ve demire dirençli *M8FE* suşu, demir stresi içermeyen (kontrol) koşullarda ve 1 mM ile 15 mM demir stresi içeren koşullarda kültüre edilerek, total RNA izolasyonları gerçekleştirilmiş ve spektrofotometrik olarak ölçülen total-RNA konsantrasyonları kullanılarak cDNA'lar elde edilmiştir. cDNA sentezi öncesinde her bir örneğin RNA miktarları eşitlenerek rt-PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm C_T değerleri, kontrol geni olan beta aktine (*ACT1*) ait C_T değerlerine göre normalize edilmiştir. Tablo 3'te genlerin $2^{-\Delta CT}$ değerleri gösterilmektedir. Her deney koşulu için gen anlatım düzeyleri, referans suşun kontrol koşullarındaki gen anlatım düzeyine göre normalize edilmiş ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ olarak Şekil 2 ve Şekil 3'de grafiksel biçimde ifade edilmiştir.

Tablo 3. Anlatım analizi yapılan genlerin $2^{-\Delta CT}$ ortalama değerleri.

	905 Kontrol	M8FE Kontrol	905 1mM Demir stresi	M8FE 1 mM Demir stresi	905 15 mM Demir stresi	M8FE 15 mM Demir stresi
AFT1	0.0861	0.1162	0.0912	0.0782	0.0355	0.0469
FET3	0.0330	0.0561	0.1350	0.5395	0.0715	0.0939
FET4	0.0519	0.0401	0.0675	0.0904	0.0395	0.0514
COT1	0.0230	0.0284	0.0597	0.0419	0.0199	0.0801
CCC1	0.0127	0.0159	0.0360	0.0195	0.0165	0.0792
ZRC1	0.0256	0.0214	0.0329	0.0195	0.0166	0.0701

İncelenen genler arasında anlatım düzeyi en çok farklılaşan gen *FET3*'tür. Düşük demir stresi (1 mM) varlığında *FET3* geninin anlatım düzeyi, kontrol koşullarındaki referans suşunun anlatım düzeyinin, referans suşta yaklaşık dört katına, *M8FE* suşunda ise yaklaşık 16 katına çıkmıştır. Yüksek demir stresi (15 mM) varlığında ise *FET3*'ün anlatım düzeyi; kontrol koşullarındaki referans suşunun anlatım düzeyinin, referans suşta yaklaşık iki, *M8FE* suşunda ise yaklaşık üç katına çıkmıştır (Şekil 2).

Anlatım düzeyleri en çok farklılaşan ikinci gen ise *CCC1* genidir. Düşük demir stresi (1 mM) varlığında bu genin anlatım düzeyi; kontrol



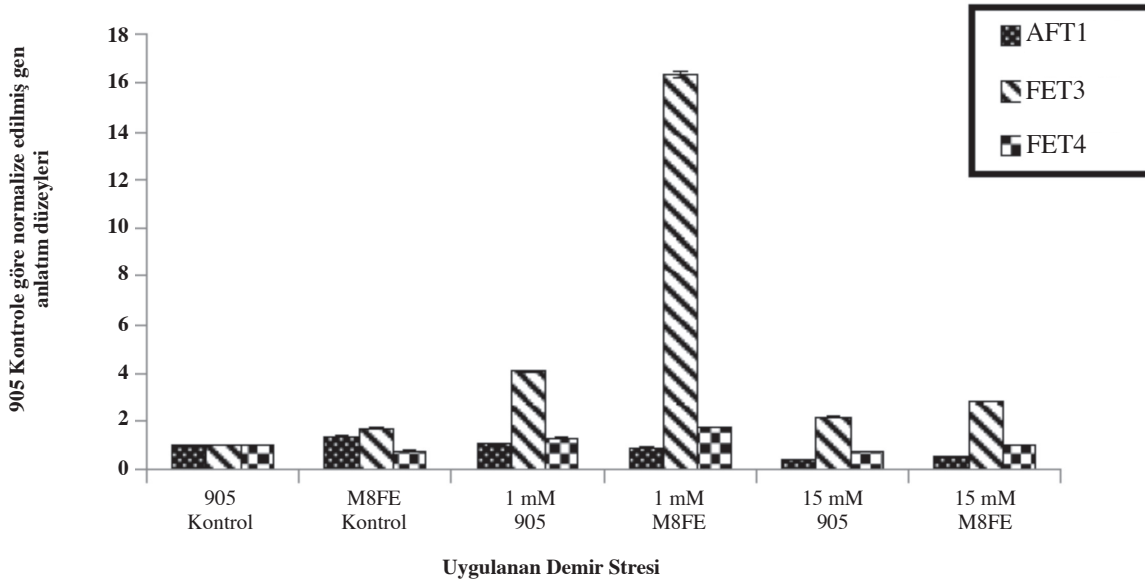
Şekil 1. *Saccharomyces cerevisiae* hücre içi demir taşınımı ile ilişkili genlerin şematik gösterimi.

koşullarındaki referans suşun anlatım düzeyinin, referans sušta yaklaşık üç katına, *M8FE*'de ise yalnızca yaklaşık 1.5 katına çıkmıştır. Ancak yüksek demir stresi (15 mM) varlığında *CCC1* anlatım düzeyi; kontrol koşullarındaki referans suşun anlatım düzeyinin, *M8FE*'de yaklaşık altı katına çıkarken, referans sušta ise önemli bir farklılaşma görülmemiştir (Şekil 3).

Anlatım düzeyleri en çok farklılaşan üçüncü gen, *COT1* genidir. Düşük demir stresi (1 mM) varlığında *COT1* anlatım düzeyi; kontrol koşullarındaki referans suşun anlatım düzeyinin, referans sušta yaklaşık üç katına, *M8FE*'de ise yaklaşık iki katına çıkmıştır. Yüksek demir stresi (15 mM) varlığında ise, *COT1* anlatım düzeyi;

kontrol koşullarındaki referans suşun anlatım düzeyinin *M8FE*'de yaklaşık üç buçuk katına çıkarken, referans sušta ise önemli bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 3).

AFT1, *FET4* ve *ZRC1* genlerinin anlatım düzeylerinde önemli bir farklılaşma gözlenmemiştir. *AFT1* geninin anlatım düzeylerinin yüksek demir stresi (15 mM) varlığında, gerek referans sušta gerekse *M8FE*'de genel olarak azaldığı görülmüştür. *FET4* geninin anlatımı ise, düşük demir stresi varlığında artmıştır. *ZRC1* geninin anlatım düzeyi ise, yalnızca 15 mM demir stresi altındaki *M8FE*'de, kontrol koşullarındaki referans suşunun anlatım düzeyinin yaklaşık üç katına çıkmış, bunun dışında ise belirgin bir farklılaşma göstermemiştir.



Şekil 2. *AFT1*, *FET3*, *FET4* genlerinin kontrol koşullarındaki referans suş (905) göre normalize edilmiş $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.

TARTIŞMA

Mikroorganizmalar metal toksisitesine karşı direnci, metalleri hücre içine almayarak (sakınma, avoidance), metallerin hücre dışına pompalanmasını artırarak, hücre dışında kompleksler oluşturarak, bu metal iyonların hücre içinde şelatlanması veya bu iyonların vakuollerde biriktirilmesi ile sağlar (sequestration)⁽¹¹⁾.

S. cerevisiae hücrelerinde demir alım mekanizması, DNA'ya bağlanan bir protein olan Aft1p ile sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Ortamda demir kısıtlı iken, Aft1 demir alımından sorumlu bir grup geni aktive eder. Bunun yanı sıra demir varlığında *AFT1* geni demir tarafından inhibe edilir ve Aft1p üretimi durduğu için kontrol ettiği elemanlara bağlanamaz. Bu bilgilerin ışığında, yüksek konsantrasyonlardaki demir varlığında (15 mM demir stresi), *AFT1* geninin anlatım düzeyinin referans suş ve hatta demire dirençli mutant suş için azalması beklenebilir⁽¹³⁾. Şekil 2'deki q-PCR sonuçlarında da görüldüğü üzere, demir stresi düzeyi yüksek olduğunda (15 mM) *AFT1* geninin anlatım düzeyi özellikle demire dirençli *M8FE* suşunda kontrol koşullarına göre önemli ölçüde daha düşüktür.

AFT1 geninin kontrolü altında olan ve ortamdaki demir konsantrasyonu ile sıkıca ilişkili olan, yüksek afinite demir alım mekanizmasından sorumlu *FET3* geninin anlatım düzeyi, ortamda 1 mM demir stresi bulunduğu *M8FE*'de referans suş 905'inkinin dört katıdır (Şekil 2). Mikroorganizma, doğası gereği ortamda bulunan az miktarda demiri alma eğilimi gösterdiği için, yüksek afinite demir taşınımından sorumlu olan *FET3* geninin anlatım düzeyinin yüksek olması beklenen bir sonuçtur. Buna göre demir stresine dirençli suş *M8FE*, *FET3* genini 905'e göre daha fazla ifade ederek demir gereksinimini olasılıkla daha yüksek düzeyde karşılayabilmektedir. Ancak, ortamda yüksek düzeyde (15 mM) demir varken *FET3*'ün anlatımı, *M8FE*'de kontrol koşullarına göre önemli ölçüde değişmemiştir. Bu durum, yüksek afinite demir taşınımından sorumlu olan *FET3* geninin anlatımının artan demir konsantrasyonu ile inhibe olması ile açıklanabilir⁽¹⁷⁾.

Düşük afinite demir alımından sorumlu *FET4* geninin anlatımının 1 mM ve 15 mM demir stres düzeylerinde kontrol koşullarına göre daha yüksek olması beklenen bir durumdur, ancak yüksek demir konsantrasyonunda (15 mM) bu gen

daha yüksek bir anlatım göstermemiştir (Şekil 2). Bunun nedeninin ortamda yüksek düzeyde bulunan demir iyonları ile inhibe olan *AFT1* geninin anlatımının azalması olduğu düşünülmektedir⁽¹⁸⁾.

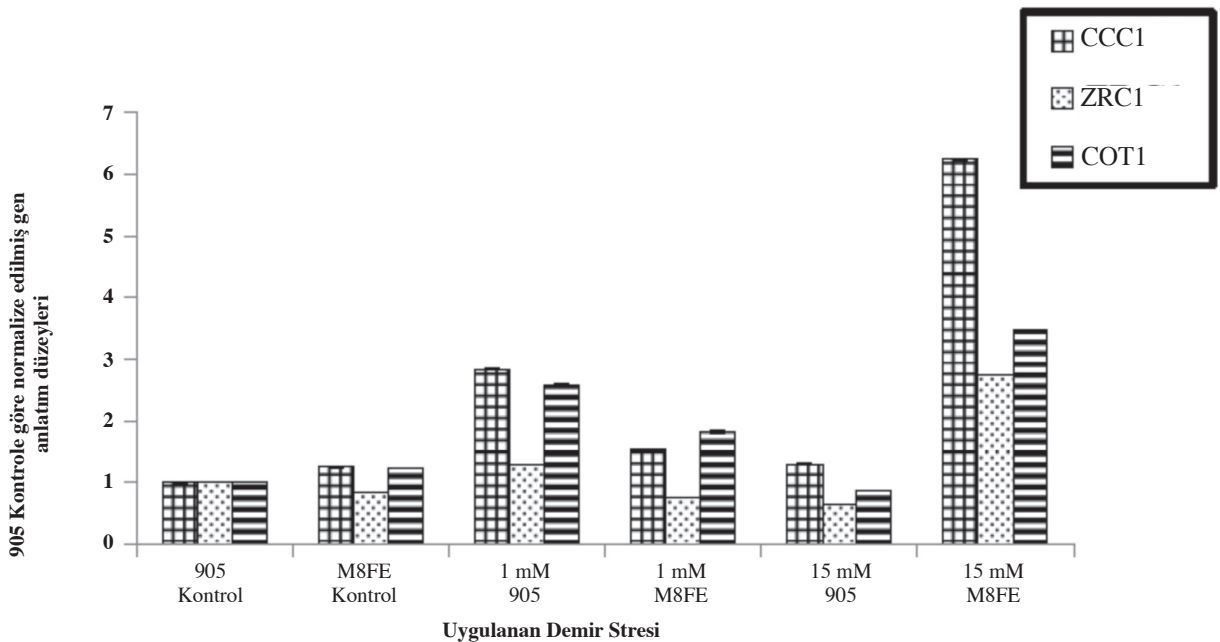
Demir stresi ile başa çıkabilme yollarından biri olan, demir iyonlarını hücre içi vakuollerde depolama davranışının, mutant birey *M8FE*'deki varlığını incelemek amacıyla, *COT1*, *CCCI* ve *ZRC1* genlerinin anlatım düzeyleri, q-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir.

Stadler ve Schweyen'in⁽¹⁹⁾ 2002'de belirttikleri üzere, ortamdaki kobalt stresi *S. cerevisiae*'de *Aft1* birikimine ve dolaylı olarak da demir alım mekanizması ile ilişkili genlerin aktive olmasına yol açar. Aynı zamanda *AFT1* geni silinmiş *S. cerevisiae*'nin kobalta karşı hassasiyet gösterdiği, *AFT1* gen anlatımı artırılmış mutantların ise kobalta karşı direnç gösterdikleri görülmüştür⁽¹⁹⁾. *AFT1* geninin demir alım mekanizması ile ilişkili olmasının yanı sıra kobalt stres tepkisi ve direnci ile de ilişkili olduğu, grubumuzca da gösterilmiştir⁽²⁰⁾.

Bu bilgiler ışığında, *S. cerevisiae*'de kobaltın vakuol membran taşınımından sorumlu olan *COT1* gen bölgesinin, aynı zamanda demirin vakuol taşınımından da sorumlu olabileceği düşünülmüş ve bu nedenle *COT1* geninin anlatım düzeyleri de incelenmiştir: Şekil 3'te görüldüğü üzere, yüksek demir stresi düzeyinde *M8FE*'in *COT1* anlatım düzeyi önemli ölçüde artmıştır. Ortamda kobalt stresi olmamasına rağmen, 15 mM demir stresi içeren ortamda *COT1* geninin anlatımının *M8FE*'de belirgin düzeyde artması dikkat çekmiştir.

Demirin vakuole taşınımından sorumlu olan *CCCI* geninin anlatım düzeyi, 15 mM demir stresi koşullarında *M8FE* suşunda belirgin bir artış gösterirken, 1 mM demir stresi koşullarında ise kontrole göre daha az bir artış göstermiştir (Şekil 3). Bu durumda, artan demir stresi varlığında, *M8FE*'nin demiri vakuollerde biriktirmeye devam ettiği, ancak referans suşun demir biriktirme eğiliminden vazgeçtiği sonucuna varılabilir⁽²¹⁾.

Lin ve ark.'nın⁽²²⁾ 2009'da yaptığı çalışmada, gösterdiği üzere; *ZRC1p* adlı çinko vakuol taşı-



Şekil 3. *CCCI*, *ZRC1*, *COT1* genlerinin kontrol koşullarındaki referans suşa (905) göre normalize edilmiş $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.

yıcısındaki tek bir amino asit mutasyonu, demir substratına afinite sağlamıştır. Bu durum göz önüne alındığında, *ZRC1* geninde gerçekleşebilecek birtakım mutasyonların, daha önce elde edilmiş olan demir stresine dirençli mutant birey *M8FE*'de mevcut olabileceği veya bazı regülör proteinler ile anlatımının, gerektiği durumlarda referans suşa göre daha fazla gerçekleşebileceği olasılığı göz önüne alınmış ve anlatım düzeyleri incelenmiştir. *ZRC1* gen anlatımı düzeyi 1 mM demir stresi koşulunda, kontrol koşullarına göre *M8FE*'de daha az iken, 15 mM demir stres düzeyinde ise yaklaşık üç kat daha fazladır (Şekil 3).

Bu sonuçlar göz önüne alındığında, demirin vakuole taşınımında rol aldığı düşünülen *COT1*, *CCCI* ve *ZRC1* genlerinin 15 mM demir stresi düzeyinde, kontrol ve 1 mM demir stres düzeyine kıyasla yaklaşık üç ila dört kat daha yüksek olan anlatımı, yüksek demir stresi koşulları altında *M8FE* mutantının; (sakınma) sequestration mekanizmasını kullanıp, fazla demiri vakuollerde depolayarak hayatta kaldığına işaret etmektedir. Yapılacak detaylı fizyolojik, transkriptomik ve proteomik analizler, demir stresine dirençli maya mutantı *M8FE*'nin direnç mekanizmasının moleküler altyapısının aydınlatılması yolunda önemli veriler sağlayabilecektir.

Teşekkür

Bu çalışma COST Aksiyonları CM0902 kapsamında Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) (Proje no: 109T638) ve İstanbul Teknik Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, Doktora Tezlerini Destekleme Programı Projeleri (Proje no: 36389) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. **Silver J.** Chemistry of Iron. 1st ed. New Delhi: Chapman & Hall; 1993.
<http://dx.doi.org/10.1007/978-94-011-2140-8>
2. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** Molecular Biology of the Cell. 4th ed. New York: Garland Science, 2002.
3. **Kendrick MJ, May MT, Plishka MJ, Robinson KD.** Metals in biological systems. New York: Ellis Horwood Ltd, 1992.
4. **Valko M, Morris H, Cronin MTD.** Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005; 12:1161-208.
<http://dx.doi.org/10.2174/0929867053764635>
5. **Tamás MJ, Labarre J, Toledano MB, Wysocki R.** Mechanisms of toxic metal tolerance in yeast. *Top Curr Genet* 2005; 14:395-454.
http://dx.doi.org/10.1007/4735_105
6. **Nelson N.** Metal ion transporters and homeostasis. *EMBO J* 1999; 18:4361-71.
<http://dx.doi.org/10.1093/emboj/18.16.4361>
7. **Lodish H, Berk A, Zipursky S.** Molecular cell biology. 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2004.
8. **Dujon B.** The yeast genome project: what did we learn? *Trends Genet* 1996; 7:263-70.
[http://dx.doi.org/10.1016/0168-9525\(96\)10027-5](http://dx.doi.org/10.1016/0168-9525(96)10027-5)
9. **Bleackley MR, Macgillivray RTA.** Transition metal homeostasis: from yeast to human disease. *Biometals* 2011; 24:785-809.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10534-011-9451-4>
10. **Eitinger T, Mandrand-Berthelot MA.** Nickel transport systems in microorganisms. *Arch Microbiol* 2000; 173:1-9.
<http://dx.doi.org/10.1007/s002030050001>
11. **Jennings.** Stress tolerance of fungi. 10th ed. New York: Marcel Dekker, 1993.
12. **Ramsay LM, Gadd GM.** Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function confirm a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 152:293-8.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10442.x>
13. **Yamaguchi-Iwai Y, Ueta R, Fukunaka A, Sasaki R.** Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2002; 277:18914-8.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M200949200>
14. **Balaban BG.** Evolutionary engineering of iron-resistant *Saccharomyces cerevisiae* for biomimetics [yüksek lisans]. İstanbul: İstanbul Teknik Üniversitesi, 2010.
15. **Dorak MT.** Real-time PCR. Oxford: Taylor & Francis, 2006.
16. **Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25:402-8.
<http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
17. **Askwith CC, Silva D de, Kaplan J.** Molecular biology of iron acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 1996; 20:27-34.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02485.x>
18. **Dix D, Bridgham J, Broderius M, Eide D.** Characterization of the FET4 protein of yeast. *J Biol Chem* 1997; 272:11770-7.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.18.11770>
19. **Stadler JA, Schweyen RJ.** The yeast iron regulon is induced upon cobalt stress and crucial for cobalt tolerance. *J Biol Chem* 2002; 277:39649-54.

<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M203924200>

- 20. Alkim C, Benbadis L, Yılmaz U, Cakar ZP, François JM.** Mechanisms other than activation of the iron regulon account for the hyper-resistance to cobalt of a *Saccharomyces cerevisiae* strain obtained by evolutionary engineering. *Metallomics* 2013; 5:1043-60.
<http://dx.doi.org/10.1039/c3mt00107e>

- 21. Li L, Chen OS, Ward DM, Kaplan J.** CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J Biol Chem* 2001; 276:29515-9.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M103944200>
- 22. Lin H, Burton D, Li L, et al.** Gain-of-function mutations identify amino acids within transmembrane domains of the yeast vacuolar transporter Zrc1 that determine metal specificity. *Biochem J* 2009; 422:273-83.
<http://dx.doi.org/10.1042/BJ20090853>