

**APOPTOZ, OTOFAJİ VE RETROGRADE
TRANSKRİPSİYONUN *CYC1*, *SUC2* VE *GPD1*
GENLERİNİN EKSPRESYONLARINA ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Eren TANIK



T.C
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**APOPTOZ, OTOFAJİ VE RETROGRADE TRANSKRİPSİYONUN *CYC1*, *SUC2*
VE *GPD1* GENLERİNİN EKSPRESYONLARINA ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Eren TANIK
0000-0002-0320-4258

Prof. Dr. Sezai TÜRKEKEL
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA-2020
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

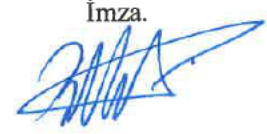
Eren Tanık tarafından hazırlanan “Apoptoz, Otofaji ve Retrograde Transkripsiyonun *CY1*, *SUC2* ve *GPD1* Genlerinin Ekspresyonlarına Etkilerinin İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/~~oy çokluğu~~ ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Başkan: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL
0000-0001-7128-6948
B.U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza.


Üye: Dr. Öğr. Üyesi Burcu ERBAYKENT TEPEDELEN
0000-0002-9565-6349
B.U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza.


Üye: Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ
0000-0002-6150-8372
İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza.


Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.


Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN .
Enstitü Müdürü

13 / 08 / 2020

Bilimsel Etik Bildirim Sayfası

B.U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

13 / 08 / 2020

Eren TANIK

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

APOPTOZ, OTOFAJİ VE RETROGRADE TRANSKRİPSİYONUN *CYCI*, *SUC2* VE *GPD1* GENLERİNİN EKSPRESYONLARINA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Eren TANIK

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Apoptoz hücrenin fizyolojik ve patolojik şartlarda kendini ortadan kaldırmasını sağlayan, bir programlanmış hücre ölüm mekanizmasıdır. Otofaji ise hücrede açlık durumlarında veya farklı uyarıların etkisi ile hasarlı organellerin ve bazı proteinlerin otofagosom denilen bir çift katlı membran yapısı içinde biriktirilerek geri dönüştürülmesidir. Retrograd kontrol ise mitokondriden nükleusa sinyal iletim mekanizması olup mitokondriyel hasarlar veya Krebs döngüsü bozuklukları ile aktive edilebilir. Bu sinyallere bağlı olarak aktive edilen transkripsiyon faktörleri nükleusa girerler ve hedef genleri ekspres ederek mitokondriyel hasarların onarılmasını sağlarlar. *S. cerevisiae*'da *GPD1*, *CYCI* ve *SUC2* genleri sırasıyla gliserol-3-fosfat dehidrojenaz enzimini, sitokrom-c, izoform-1 proteinini ve invertaz enzimini kodlarlar. Bu çalışmada *S. cerevisiae*'da apoptoz, otofaji ve retrograd kontrolün, *GPD1*, *CYCI* ve *SUC2* genlerinin transkripsiyonuna etkileri incelendi. Apoptoz koşullarının aktivasyonu ile *GPD1*, *CYCI* ve *SUC2* genleri transkripsiyonlarının baskılandığı görüldü. Otofaji koşullarında ise yaban tip maya suşunda *GPD1* geni transkripsiyonunda düşük seviyelerde azalma görülürken, *CYCI* geni transkripsiyonu etkilenmedi. *SUC2* geni ekspresyonunun ise 3-kat baskılandığı görüldü. Apoptoz ve otofaji koşullarında Hog1p ve Tor1p kinazlarının bu genlerin transkripsiyonlarına farklı etkileri olduğu görüldü. İvertaz aktivitesi ölçüldüğünde apoptozun invertaz sekresyonunu tamamen önlediği otofaji aktivasyonunun ise invertaz sekresyonuna önemli etkisi olmadığı bulundu. Retrograd kontrol mekanizmasının transkripsiyon faktörleri olan Rtg1/3p kompleksi retrograd hedef genlerinin promotorlarında R kutusu denilen sekansa bağlanmaktadır. *GPD1*, *CYCI* ve *SUC2* genlerinin promotorları R-kutusu sekansları için biyoinformatik araçlar ile analiz edildi. *GPD1*, *CYCI* ve *SUC2* genlerinin promotor bölgelerinde çok sayıda R-kutusu sekansı olduğu bulundu. Bu sonuçlar hücrede önemli metabolik işlevleri olan *GPD1*, *CYCI* ve *SUC2* genlerinin transkripsiyonlarının apoptoz, otofaji ve retrograd sinyal mekanizmalarına bağlı olarak belirli derecelerde kontrol edildiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Otofaji, Retrograd, *GPD1*, *CYCI*, *SUC2*, *S. cerevisiae*.
2020, XII + 62 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF APOPTOSIS, AUTOPHAGY AND RETROGRADE TRANSCRIPTION ON THE EXPRESSION OF *CYC1*, *SUC2* AND *GPD1* GENES

Eren TANIK

Bursa Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Apoptosis is a programmed cell death mechanism that allows the cell to eliminate itself in physiological and pathological conditions. Autophagy, which can be triggered by starvation or other stimuli, is the recycling of damaged organelles and misfolded proteins in a double membrane structure called an autophagosome. Retrograde control is the signaling pathway from the mitochondrion to the nucleus that is activated by mitochondrial damages and Krebs cycle disturbances. Upon activation by retrograde signaling, certain transcription factors enter the nucleus and activate the transcription of mitochondrial genes resulting in the repair of mitochondrial damages. In *S. cerevisiae*, *GPD1*, *CYC1*, and *SUC2* genes encode glycerol-3-phosphate dehydrogenase enzyme, cytochrome-c isoform-1 protein, and invertase enzyme, respectively. In this study, the effects of apoptosis, autophagy and retrograde control on the transcription of *GPD1*, *CYC1*, and *SUC2* genes were investigated. Activation of apoptosis conditions resulted in the transcriptional repression of *GPD1*, *CYC1*, and *SUC2* genes. In autophagy conditions, while *GPD1* gene transcription decreased at low levels in wild yeast strain, *CYC1* gene transcription was not affected. Transcription of *SUC2* repressed by 3-fold in autophagy induced conditions. It was observed that Hog1p and Tor1p kinases had different effects on the transcription of these genes under apoptosis and autophagy conditions. Our results also indicated that apoptosis conditions completely prevent invertase secretion. However, autophagy activation did not have severe effects on invertase secretion the yeast cells. The Rtg1/3p complex, which is the transcription factor of the retrograde control mechanism, binds to the sequence called R box in the promoters of the retrograde targeted genes. The promoter regions of the *GPD1*, *CYC1*, and *SUC2* genes were analyzed for R box sequences using bioinformatics tools, and multiple R-boxes were identified within the promoter regions of those genes. Altogether, these results indicate that transcription of *GPD1*, *CYC1*, and *SUC2* genes, which have significant metabolic functions in cells, are controlled at certain levels depending on autophagy, apoptosis, and retrograde signaling.

Keywords: Apoptosis, Autophagy, Retrograde, *GPD1*, *CYC1*, *SUC2*, *S. cerevisiae*.
2020, XII + 62 pages

TEŞEKKÜR

Üniversite hayatım boyunca, derslerimde, deneylerimde, tez çalışmamın her aşamasında yardım eden, desteğini hiç esirgemeyen, akademik bilgi birikimimin artmasında çok büyük katkısı olan, akademik konular dışında da her zaman bana yol gösteren sayın danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Sezai Türkel'e saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım. Her zaman yanımda olan, benden maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen, sürekli motive eden anneme ve babama minnetle teşekkür ederim.

Eren TANIK

13/ 08/ 2020

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLERİN DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nin Genom Yapısı ve Önemi	3
2.2. <i>S. cerevisiae</i> 'da Apoptozun ve Otofajinin Kontrol Mekanizmaları.....	4
2.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'de Otofajinin Genel Özellikleri	9
2.4. <i>S. cerevisiae</i> 'da Retrograd Sinyalin Kontrol Mekanizması ve Genel Özellikleri....	13
2.5. <i>GPD1</i> Geninin Yapısal Özellikleri ve Kontrol Mekanizması.....	19
2.6. <i>CYC1</i> Geninin Yapısal Özellikleri ve Kontrol Mekanizması	21
2.7. <i>SUC2</i> Geninin Yapısal Özellikleri ve Kontrol Mekanizması	23
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	26
3.1. Araştırmada Kullanılan Maya Suşları ve Üreme Koşulları	26
3.2. <i>GPD1</i> , <i>CYC1</i> , <i>SUC2</i> Ekspresyon Vektörlerinin Özellikleri ve Transformasyonu ..	27
3.3. Stres Şartlarının Maya Hücrelerine Uygulanması.....	30
3.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'de β -Galaktozidaz Aktivitesinin Ölçülmesi.....	31
3.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'de İnvertz Aktivitesinin Belirlenmesi	32
4. BULGULAR.....	34
4.1. Apoptoz Sinyali Aktivasyonunun <i>GPD1</i> Transkripsiyonlarına Etkisi	34
4.2. Apoptozun <i>CYC1</i> Geninin Transkripsiyonuna Etkisi	35
4.3. Apoptozun <i>SUC2</i> Geninin Transkripsiyonuna Etkisi	35
4.4. Otofajinin <i>GPD1</i> Geninin Transkripsiyonlarına Etkisi.....	36
4.5. Otofajinin <i>CYC1</i> Geninin Transkripsiyonlarına Etkisi	37
4.6. Otofajinin <i>SUC2</i> Geninin Transkripsiyonlarına Etkisi	38
4.7. Retrogradın <i>GPD1</i> , <i>CYC1</i> , <i>SUC2</i> Genlerinin Transkripsiyonlarına Etkisi.....	38
4.8. Farklı Suşlarda ve Koşullarda İnvertz Aktivitesi.....	41
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	42
KAYNAKLAR DİZİNİ	47
EKLER.....	58
Ek 1: Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması.....	59
Ek 2: β - Galaktozidaz Aktivitesi Hesaplanması	61
ÖZGEÇMİŞ	62

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta, delesyon
g	Gravity (santrifuj birimi)
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
Σ	Sigma
%	Yüzde

Kısaltmalar

Kısaltmalar	Açıklama
ATP	Adenosin tri fosfat
cDNA	Copy of their DNA
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DR	Glukoz baskısı altında olmayan, (Derepressed)
GRAS	Generally Recognized as Safe
HOG	High Osmolarity Glycerol response
Kbp	Kilo base pair
LacZ	Beta-Galactozidaz geni
Leu	Lösin
LTR	Long Terminal Repeats
M	Molar
MAT	Mating type, <i>S. cerevisiae</i> 'da eşleşme tipi
Mbç	Mega baz çifti
mg	Miligram
mm	Milimetre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
OD	Optical Density
ONPG	Orto Nitro Phenyl Galactoside
ORF	Open Reading Frame (Açık okuma Penceresi)
PEG	Polyetilen glikol
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PKA	Protein Kinaz A
PRF	Programmed Ribosomal Frameshift
R	Glukoz baskılaması (Repressed)
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Rotation per minute
SA	Salisilik asit

Kısaltmalar	Açıklama
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC- Ura	Urasil içermeyen sentetik tam üreme ortamı
Ser	Serin
SGD	Saccharomyces Genome Database
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOD	Süperoksit dismutaz
SNF	Sucrose non-fermenting
ssRNA	Single Strand RNA
TOR	Target of Rapamicin
tRNA	Taşıyıcı RNA
URA	Uracil
VLP	Virüs-like particles
yAP	Yeast Aktivatör Protein
YE _p	Yeast Epizomal plazmit
YPK	Yeast Protein Kinase
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast extract Pepton Dextrose

ŞEKİLLERİN DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. <i>S. cerevisiae</i> içsel ve dışsal ölüm etmenleri.....	6
Şekil 2.2. Maya apoptozunda rol oynayan proteinler ve yolaklar	7
Şekil 2.3. <i>S. cerevisiae</i> 'de otofaji süreci.....	10
Şekil 2.4. <i>S. cerevisiae</i> 'de otofaji ve otofagozom düzenlenmesi.....	12
Şekil 2.5. <i>S. cerevisiae</i> 'de RTG yolunun düzenlenmesi.....	14
Şekil 2.6. <i>S. cerevisiae</i> 'de RTG bağımlı retrograd yol.....	15
Şekil 2.7. <i>S. cerevisiae</i> 'de RTG bağımlı ve RTG bağımsız retrograd yollar.....	17
Şekil 2.8. <i>GPD1</i> geni transkripsiyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörleri...	21
Şekil 2.9. <i>CYC1</i> geni transkripsiyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörleri....	23
Şekil 2.10. <i>SUC2</i> geni transkripsiyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörleri...	25
Şekil 4.1. <i>GPD1</i> geni 1 Kbp promotor bölgesinde Rtg1/3p bağlanma sekanslarının incelenmesi.....	39
Şekil 4.2. <i>CYC1</i> geni 1 Kbp promotor bölgesinde Rtg1/3p bağlanma sekanslarının incelenmesi	39
Şekil 4.3. <i>SUC2</i> geni 1 Kbp promotor bölgesinde Rtg1/3p bağlanma sekanslarının incelenmesi	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. <i>S. cerevisiae</i> 'nin genom yapısı ve genom bileşenleri.....	4
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşları ve özellikleri.....	27
Çizelge 4.1. Apoptoz sinyali aktivasyonunun <i>GPD1</i> geninin ekspresyonuna etkisi.....	34
Çizelge 4.2. Apoptoz sinyali aktivasyonunun <i>CYC1</i> geninin ekspresyonuna etkisi	35
Çizelge 4.3. Apoptoz sinyali aktivasyonunun <i>SUC2</i> geninin ekspresyonuna etkisi.....	36
Çizelge 4.4. Otofaji aktivasyonunun <i>GPD1</i> geninin ekspresyonuna etkisi	37
Çizelge 4.5. Farklı suşlarda otofajinin <i>CYC1</i> geninin ekspresyonuna etkisi	37
Çizelge 4.6. Otofajinin <i>SUC2</i> geninin ekspresyonuna etkisi	38
Çizelge 4.7. Apoptoz ve otofaji sinyallerinin invertaz aktivitesine etkisi.....	41

1. GİRİŞ

GPD1 *S. cerevisiae*'de gliserol-3-fosfat dehidrojenazı kodlar. Gliserol-3-fosfat dehidrojenaz, sitoplazmada, daha sonra gliserol sentezinde kullanılacak olan, dihidroksiaseton fosfattan gliserol-3-fosfat sentezinde rol oynar. Mayanın yüksek ozmatik stres altında büyümesini sağlar ve redoks dengesini düzenler (Albertyn ve ark. 1994). *CYC1* mitokondri zarları arasında bulunan (Sherman ve ark. 1965, Dumont ve ark. 1991, Sherman 2005), apoptoz sırasında mitokondriden dışarı salınan sitokrom-c, izoform-1 enzimini kodlar. Sitokrom-c, izoform-1 elektron taşınmasında rol oynar (Sharonov ve ark. 2005). Mayada bulunan sitokrom-c, izoform-1, insanda bulunan sitokrom C'nin homologudur. *CYC1* glukoz baskılaması ile kontrol edilmektedir (Treitel ve Carlson 1995, Olesen ve ark. 1987). Glukoz baskılanması ile kontrol edilen bir diğer gen ise *SUC2*'dir (Carlson ve Botstein, 1982). Glukoz varlığında *SUC2* promotörü nükleozomlar ile kapalı haldedir. *SUC2* geninden sükroz ve rafinozu hidrolize eden invertaz enzimi kodlanır (Gascón, 1968. Taussig ve Carlson, 1983). İvertaz enzimi *S. cerevisiae*'de iki farklı formda kodlanır. Bir formu sitoplazmada bulunur ve çok az kodlanır. Diğer formu ise glikosillenip hücre dışına sentezlenen fonksiyonel olarak aktif olan ve hidrolizi gerçekleştiren formudur (Gascón, 1968, Trimble ve Maley, 1977).

Apoptoz, otofaji ve retrograd evrimsel olarak korunmuş hücresel sinyal yollarıdır. Apoptoz farklı etmenler ile aktive olan programlanmış hücre ölüm mekanizmasıdır. Çok hücreli organizmalarda gelişim sırasında ya da hasarlı hücrelerin organizmadan uzaklaştırılmasında, tek hücrelilerde ise kolonilerin yükünün azaltılmasında avantaj sağlayan bir yoldur. Apoptoz sinyallerinin alınmasından sonra mitokondriden sitokrom c salınımı gerçekleşir ve apoptoz başlamış olur (Ludovico ve ark. 2002). Bu mekanizmanın sonucunda DNA degradasyonu, kromatin yoğunlaşması ve mRNA bozulması gibi morfolojik değişiklikler olur ve hücreler ölürler. Hücre ölümü sonrasında hücreler apoptotik kesecikler halinde parçalanırlar ve geride hiçbir atık bırakılmayacak şekilde bu kesecikler fagositoz ile yok edilerler (Lipponen ve ark. 1994, Wyllie ve ark. 1980). Otofaji ise kafein, açlık veya istenmeyen bir şekilde protein birikmesi ile uyarılan hücresel bir yoldur (Mortimore ve ark. 1996, Vittorini ve ark. 1999). Otofaji, eğer sinyaller devam ederse hücre ölümüne sebep olur. Otofaji sinyalleri alındığında sitoplazmada, sitoplazmayı ve organelleri içine alan bir kompleks olan otofagosomlar oluşur (Baba ve ark. 1997, Scott

ve ark. 1997). Daha sonra bu otofagozomlar lizozom ya da vakuol ile birleşerek içlerindeki maddelerle birlikte geri dönüşürülürler (Klionsky ve Emr 2000). Otofaji de organizmalarda birçok aşamada ve hastalıkta rol oynayan bir mekanizmadır. Retrograd sinyal yolağı ise programlanmış bir hücre ölüm mekanizması değildir, mitokondrideki fonksiyon kayıplarına karşı cevap oluşturulmasını sağlayan bir yoldur. Mitokondride meydana gelen hasarlar sonucunda sitoplazmadaki Rtg2p proteini bu hasarları algılayarak sitoplazmada bulunan, transkripsiyon faktörü olan Rtg3p proteininin kısmi bir şekilde defosforilesyonunu sağlar. Bunun sonucunda ise Rtg3p, Rtg1p proteini ile kompleks oluştururlar ve nükleusa lokalize olup (Sekito ve ark. 2000), cevap için gerekli olan genlerin promotorlarındaki R kutularına bağlanarak transkripsiyonlarını gerçekleştirirler (Jia ve ark. 1997, Liao ve Butow 1993). Retrograd birçok sinyal yolu ile etkileşimde olan bir yoldur.

GPD1, *CYC1* ve *SUC2* genlerinin bu süreçlerde tam olarak nasıl kontrol edildiği bilinmemektedir. Bu tez çalışmasının amacı apoptoz, otofaji ve retrogradın *GPD1*, *CYC1* ve *SUC2* genlerinin transkripsiyonlarına etkisini incelemektir. Araştırmada iki yaban tip suş ve *HOG1* ve *TOR1* genlerinin mutantları olan suşlar kullanıldı. Apoptoz sinyalinin uyarılması için asetik asit, otofaji sinyallerinin uyarılması için kafein kullanıldı. *CYC1* ve *SUC2* genlerinin glukoz baskılanmasından etkilendiği bilindiği için farklı glukoz konsantrasyonları kullanılarak glukoz baskılamasının olduğu ve olmadığı ortamlar hazırlandı. Yaban tip maya suşu kullanılarak yapılan çalışmalarda baskılama yapmayan bir karbon kaynağı olarak da galaktoz kullanıldı. Protein sekresyonlarını belirlemek için de invertaz tayin metodu kullanılarak sonuçlar kayıt edildi.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Saccharomyces cerevisiae*'nin Genom Yapısı ve Önemi

S. cerevisiae mantar aleminin bir üyesi olan, tomurcuklanarak üreyen ve bir tek hücreli ökaryot olan maya türüdür. Üzerinde en çok çalışılan ve modellemelerde kullanılan, sıkça tercih edilen model organizmalardan biridir. Çünkü *S. cerevisiae* uygun koşullar altında, laboratuvarında hızlı ve kolay bir şekilde üretilebilir, diğer model organizmalara göre üretilmesi daha ucuzdur, genetik yapısında kolayca değişiklikler yapılabilir, haploid ve diploid hücre tipleri bulunabilir ve mutant izolasyonu kolaydır (Feldman 2012). *S. cerevisiae* üzerinde çalışmalar ökaryotik hücrelerin çalışma mekanizmalarını aydınlatmıştır. Memelilerdeki birçok mekanizmanın ve proteinin karşılıkları ilk önce mayada keşfedilmiştir. Araştırmalar sonucunda elde edilen veriler işlemsel biyolojide de önemli gelişmelere yol açmıştır (Duina ve ark. 2014). Gıda ve endüstriyel alanlar başta olmak üzere, ilaç sektörü gibi birçok alanda farklı amaçlarda kullanılmaktadır. Patojenik hiçbir özellik taşımaz, genellikle güvenli olarak kabul edilir (GRAS).

S. cerevisiae'nin genomu tam olarak sekanslanan ilk ökaryottur (Goffeau ve ark. 1996). *S. cerevisiae*'nin genomu 24 Nisan 1996'da sekanslanmıştır. Sekanslama birçok ülkede olmak üzere 100 laboratuvarında yapılmış ve bu çalışmaların sonunda *Saccharomyces Genome Database* (SGD) kurulmuştur. SGD'de sadece *S. cerevisiae*'nin değil, birçok maya genomlarının çeşitli özelliklerinin, makalelerin ve biyoinformatik programların bulunduğu bir veri bankasıdır (Cherry ve ark. 2012). *S. cerevisiae* genom özellikleri de aydınlatılmıştır (Çizelge 2.1)

S. cerevisiae, haploid ve diploid olmak üzere iki farklı yaşam döngüsüne sahiptir. Haploid ve diploid maya hücreleri mitoz bölünme ile çoğalırken, diploid maya hücreleri üreme koşulları yetersiz olduğunda ya da herhangi bir stres varlığında mayoz bölünme geçirerek, spor oluşturabilirler. Haploid maya hücrelerinde farklı feromonlara sahip olabilirler, bunlar a ve α feromonlarıdır. Karşılıklı olarak a ve α feromonlarını salgılayan haploid maya hücrelerinin reseptörleri ile bunları algılar, hücre döngüleri durur ve farklı feromona sahip haploid kromozom içeren hücreler birleşerek diploid hücre meydana getirirler.

Diploid hücreler, mayoz geçirerek farklı genoma sahip bireyler oluştururlar. Bu da evrimsel açıdan avantaj sağlar. Hem haploid hücreler hem de diploid hücreler, glikoz ve azot kaynaklarının sınırlı olduğu durumlarda lifli bir büyüme gösterebilir, biyofilm oluşturabilir veya durağan faza girebilir (Cullen ve Sprague 2012).

Çizelge 2.1. *S. cerevisiae*'nin genom yapısı ve genom bileşenleri (Olson 1991)

Genom Büyüklüğü	12.5 Mb + rDNA (rDNA genellikle 1-2 Mb, oldukça değişken)
Tek Kopya DNA	12.0 Mbç
Genetik Harita Uzunluğu	>4300 CM
Kromozom Sayısı	16
Mitokondriyal DNA	75 kb
Ekstrakromozomal Elementler	2- mikron plazmiti DNAsı, Çift zincirli RNA virüsleri

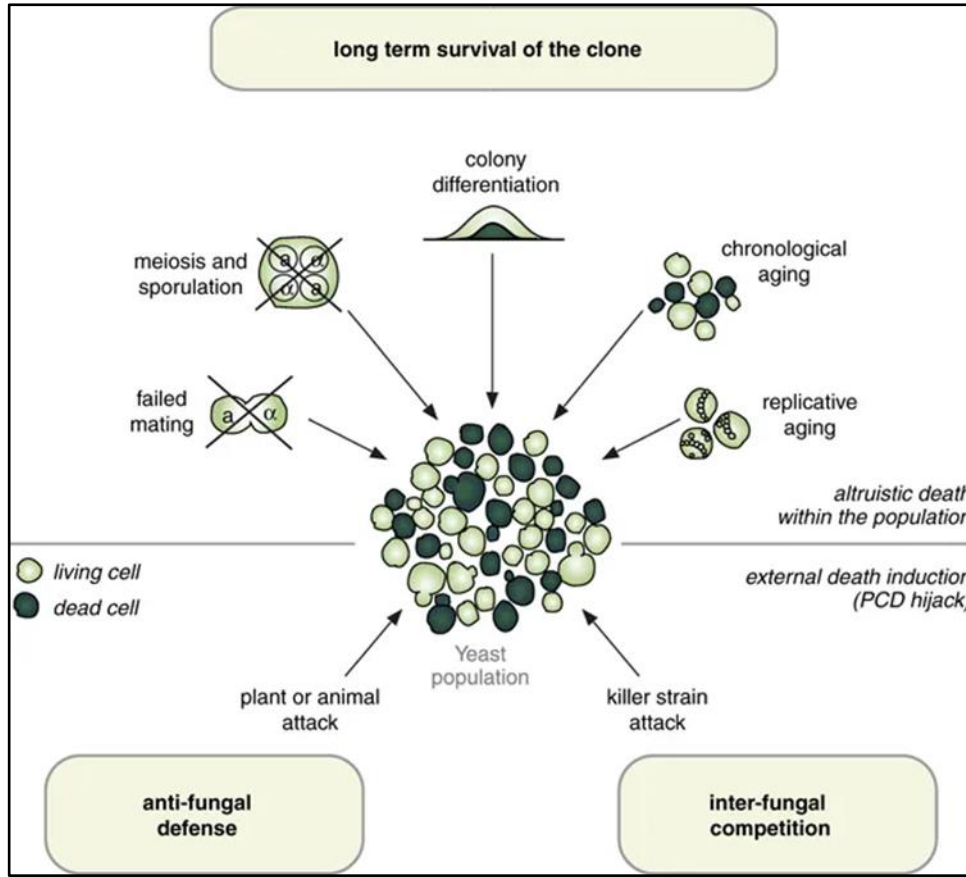
Üreme hızları hem suşlar hem de ortamlar arasında büyük farklılıklar gösterse de maya hücreleri genelde uygun üreme koşullarında 100 dakikada bir kere bölünürler. Bir maya hücresinin ortalama replikatif ömrü ise 26 hücre bölünmesi kadardır.

2.2. *Saccharomyces cerevisiae*'de Apoptozun ve Otofajinin Kontrol Mekanizmaları

Apoptoz organizmalarda meydana gelen bir programlı hücre ölümüdür. Belirli yolakların çalışmasıyla hücrelerde nükleer değredasyon, kromatin yoğunlaşması, kromozomal DNA parçalanması, mRNA bozulması gibi morfolojik değişiklik olur ve hücreler bunun sonucunda ölürler. Apoptoz, organizmaya yaşam döngüsü boyunca avantajlar sağlayan kontrollü bir süreçtir. Memeli embriyolarında parmakların ve ayak parmaklarının ayrılması, bu bölgelerdeki hücrelerin apoptoza uğraması ile gerçekleşir, bu fizyolojik apoptoza bir örnektir. Bir diğer amaç ise vücutta ihtiyaç duyulmayan, bozuk yapıdaki proteinler birikmiş olan, zarar görmüş onarılması zor olan (Örneğin DNA almış hücrelerin uzaklaştırılması) ve anormalleşmiş hücrelerin yok edilmesidir, bu tür apoptoza da patolojik apoptoz adı verilir. Apoptoz başlayan bir hücrede kromatinler ve sitoplazma yoğunlaşmaya başlar ve hücrenin boyutları küçülmeye başlar ama hücre membranı bozulmaz. Apoptoz sonrasında, apoptoza uğrayan hücrenin materyali hücre dışına dağılmaz, hücre apoptotik cisimler halinde parçalara ayrılır. Apoptotik cisimlerin

yüzeylerinde sinyal verici yapılar vardır. Bu sinyal verici yapılar ile yakınlardaki hücreler ile fagosite edilerek ortadan kaldırılırlar (Lipponen ve ark. 1994, Wyllie ve ark. 1980). Apoptoz sinyal yolağı evrimsel olarak korunmuş bir yoldur, insandan tek hücreli canlılara kadar organizmalarda bulunur. *Saccharomyces cerevisiae*'de apoptoz hakkında birçok çalışma yapılmıştır ve çok sayıda ekzojen ve endojen tetikleyicinin mayada apoptozu uyardığı bulunmuştur. Mayada apoptoz kaspazlar aracılığı ile ve kaspazdan bağımsız bir şekilde apoptozun yürütülmesine katkıda bulunan birkaç mitokondriyal ve nükleer protein tarafından gerçekleştirilir.

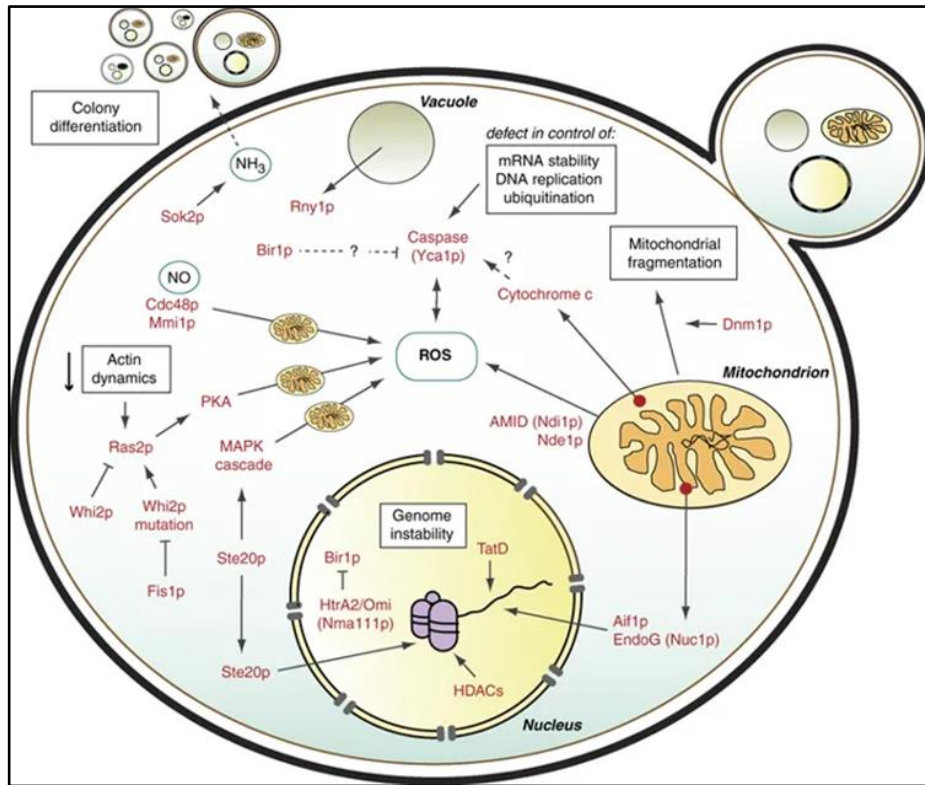
Çok hücreli organizmalarda apoptoz, bozulmuş, organizmanın bütünlüğü için zararlı hücreleri ortadan kaldırdığı için yararlı bir mekanizmadır. Maya gibi tek hücreli organizmalarda ise maya hücreleri diğer maya hücreleri ile etkileşim halinde olan çok sayıda hücrenin bulunduğu bir topluluğun üyesidir. Yaşlı ve hasar görmüş tek hücreli organizmaların ölümü, ortamdaki kaynakları korur ve ölen hücreler daha genç ve sağlıklı hücreler için besinleri, farklılaşma moleküllerini ve diğer hayatta kalma moleküllerini serbest bırakır (Vachova ve ark. 2005, Fabrizio ve ark. 2004, Herker ve ark. 2004, Laun ve ark. 2001). Hücre ölümüne eşlik eden artan ROS üretimi, populasyonun geri kalanı için somatik mutasyon olasılığını ve sürekli değişen koşullara uyum sağlayabilen genetik varyantları artırır. Daha iyi adapte olan mutantların kısmen süperoksit seviyelerine bağlı olduğu gösterilmiştir (Fabrizio ve ark. 2004). Ayrıca başarısız çiftleşme gibi durumlarda, çiftleşme tipi feromonlar kültürü üreme sistemi veya başka şekilde zarar görmüş haploid hücrelerden apoptozu tetikleyerek temizler ve diploid durumdaki mayalardan mayoz ile meydana gelecek haploid mayaları daha adaptif kılar (Severin ve ark. 2002, Ahn ve ark. 2005). Yani tek bir hücrenin ölümü tüm populasyon için faydalı olabilir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *S. cerevisiae*'de içsel ve dışsal ölüm etmenleri (Carmona-Gutierrez ve ark. 2010)

Maya apoptozu, kimyasal veya fiziksel stres şeklinde veya ölümcül sinyal iletim yollarının bir parçası olarak proapoptotik proteinlerin heterojen ekspresyonu gibi çok sayıda uyarın ile indüklenebilir. Hidrojen peroksit ile muamele edilen maya hücrelerinde, ROS'un apoptozda merkezi rol oynadığı görülmüştür. Bu süreçte, maya kaspaz YCA1 ve apoptozu indükleyen faktör-1 (AIF1) gibi çeşitli faktörler yer alır (Madeo ve ark. 2002, Wissing ve ark. 2004). Maya apoptozunu indükleyen başka bir bileşik ise asetik asittir (Ludovico ve ark. 2001, Fannjiang ve ark. 2004). Maya hücreleri asetik asit ile muamele edilirse mitokondriyal sitokrom c salınımı gerçekleşir. Etanol, hipkloröz asit (HOCl), yüksek tuz (NaCl), UV ve ısı gibi diğer ek ajanlar; glikoz, sorbitol, bakır, manganez ve demir gibi bileşikler toksik konsantrasyonlarda uygulandığında apoptozu tetikleyebilir (Carmona-Gutierrez ve ark. 2009). Doğada organizmalar kendilerini patojenik organizmalardan korumak için de bu organizmalarda apoptozu indükleyecek, ricin,

ozmotin gibi toksinler üretirler. Katil maya suşları ise aynı üreme ortamında bulunan ve kaynaklar için rekabet eden diğer tek hücreli organizmalarda Yca1p aracılı apoptozu indükleyen bileşikler eksprese ederler (Reiter ve ark. 2005). Antibiyotikler, farmakolojik ajanlar, antifungal ilaçlar maya apoptozunu indükleyebilir (Almeida ve ark. 2008). Haploid maya hücreleri için de feromonlar, özellikle başarısız çiftleşme veya uygun çiftleşme partnerleri olmadığında apoptoza neden olur. Feromonun reseptör ile etkileşimi, Map kinaz-sinyalleme kaskadının (Ste20p) aktivasyonuna neden olur ve daha sonra hücre içi Ca²⁺ artması ve sitokrom c salınımı ile apoptoz gerçekleşir (Severin ve ark. 2002, Pozniakovsky ve ark. 2005). Oksijen metabolizmasının ve ROS üretiminin neden olduğu DNA hasarı, replikasyon başarısızlığı gibi durumlar ve kromatid kohezyonu, mRNA ubikuitinasyonu ve stabilitesi (Carmona-Gutierrez ve ark. 2009, Hauptmann ve ark. 2006, Mazzoni ve ark. 2005) de apoptozu indükleyebilirler (Şekil 2.2) (Weinberger ve ark. 2005).



Şekil 2.2. Maya apoptozunda rol oynayan proteinleri ve yolları göstermektedir (Carmona-Gutierrez ve ark. 2010).

Mayadan apoptoz sürecinin düzenlenmesi, çekirdek, mitokondri, lizozom gibi birçok organel, proteinler, küçük moleküller ve yollar arasında etkileşimi gerektirir.

ROS, mayada ve diğer organizmalarda bilinen apoptotik yolların birçoğu ile bağlantılı önemli hücre ölümü düzenleyicilerinden biridir. Mitokondriyal solunum zinciri ve endoplazmik retikulum hücredeki ROS kaynakları arasındadır. Bir diğer apoptoz uyarıcı madde de amonyaktır. Maya kolonilerinde dışarıda salgılanan amonyak koloninin ortasında birikerek yaşlı hücrelerde apoptozu tetikler (Vachova ve ark. 2005).

Maya en az bir memeli kaspazının ortoloğu olan, metakaspaz Yca1p'ye sahiptir. Hücre ölümü senaryolarının çoğu Yca1p'ye bağlıdır (Madeo ve ark. 2002). YCA1 hasar görürse, hücre ölümü ve apoptozda azalmalar görülür. Yca1p'i ubiquitinasyon kontrolünde, mRNA stabilitesinde ve DNA replikasyonunun hatalı başlamasını takiben apoptozun başlatılmasında rol oynar (Carmona-Gutierrez ve ark. 2009, Mazzoni ve ark. 2005, Weinberger ve ark. 2005). Nma111p (apoptozun nükleer aracısı), maya apoptozunda rol oynayan başka bir proteazdır. NMA111'in silinmesi hücrede apoptotik belirteçleri azaltırken fazla sentezlenmesi de hücreyi apoptoza götürür. Nma111p, çekirdekte bulunur ve hücreleri serin proteaz aktivitesi ile öldürür (Fahrenkrog ve ark. 2004). Nma111p, sitoplazmaya ve nükleusa lokalize olan apoptoz inhibitör proteini olan Bir1p'yi parçalar ve bu da apoptoz oranını artırır (Walter ve ark. 2006). Eğer hücrede Bir1p çok eksprese edilirse apoptoz baskılanır. Bir diğer nükleer faktör de dsDNA endo/eksonükleaz Tat-D'dir. Tat-D aşırı eksprese edilirse hücre apoptoza gider (Qiu ve ark. 2005). Memelilerde kaspazdan bağımsız, NADH oksidaz aktivitesine sahip bir flavoprotein olan ve mitokondri intermembran boşluğunda bulunun apoptoz indükleyen faktör (AIF) bulunur. Maya hücrelerinde de bir AIF homoloğu bulunur. AIF delesyonu, hücrede hidrojen peroksite ve asetata maruz kalma durumunda ve yaşlanma sırasında hücrelerin daha uzun süre sağ kalmasını sağlar (Wissing ve ark. 2004). Mitokondrideki NADH'nin oksidasyonunu kataliz eden ve mitokondrinin iç zarına lokalize olan NADH dehidrojenaz Ndi1p, mayayı apoptoza sürükleyen başka bir proteindir. Ndi1p'yi kodlayan NDI1'in silinmesi ROS üretimini azaltır ve yaşam süresini uzatır (Li ve ark. 2006). Solunum zincirinde önemli yeri olan mitokondriyal protein sitokrom c, memelilerde, apoptozda

kaspaz-9'un aktivasyonunda rol oynar (Ludovico ve ark. 2002). Nuc1p, apoptozu indükleyen ve mitokondride bulunan başka bir faktördür. Apoptoz sinyali üzerine çekirdeğe taşınır (Buttner ve ark. 2007). Mitokondriyel parçalanma apoptoz indüksiyonunda bir nedendir ve memelilerde bu olay dinamime bağlı protein-1 (Drp1) tarafından kontrol edilir. Mitokondriyal parçalanma maya hücreleri için de önemlidir ve Drp1'nin mayadaki homoloğu Dnm1p'dir. Dnm1p, mitokondriyal parçalanmadan önce apoptozu teşvik eder (Fannjiang ve ark. 2004).

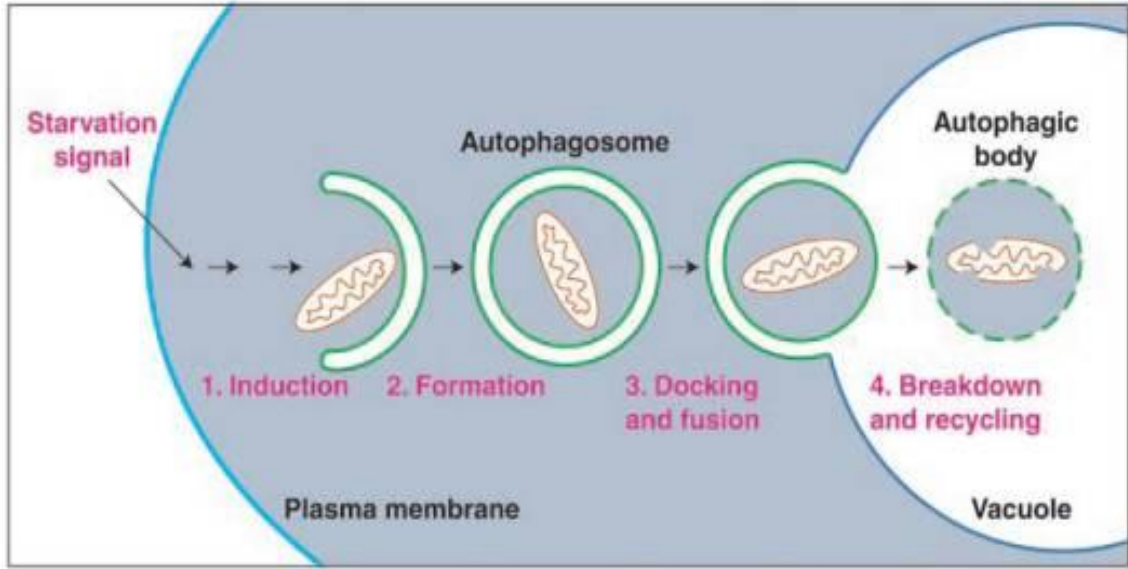
2.3 *Saccharomyces cerevisiae*'de Otofajinin Genel Özellikleri

Otofaji tüm ökaryotik hücrelerde gerçekleşen, hücre içinde biriken maddelerin ya da organellerin geri dönüştürülmek üzere lizozoma veya vakuole iletiildiği, bu süreçte hücrenin içinde zarların yeniden düzenlendiği ve birçok kinazla, fosfotazla, guanozin trifosfatazla düzenlenen bir hücrenel mekanizmadır. Ökaryotik canlıların gelişim aşamalarında, yaşlanmada, hücrenel ölümdede, hastalıklarda, protein birikmelerinde ve besin yokluğunda rol alan bir hücrenel yanıttır (Mortimore ve ark. 1996, Vittorini ve ark. 1999). Açlık koşullarında ya da hücrenin normal fizyolojik koşullarında gereksiz protein veya organeller, vakuole veya önemli bozunma organeli olan, hücre içi bileşenleri parçalayabilen hidrolazlar içeren lizozoma taşınır ve sitosolde tekrar kullanılmak üzere geri dönüştürülür (Dunn ve Trends 1994, Kim ve ark. 2000).

Otofajide hücre içi membranlar morfolojik değışikliklere uğrar (Kim ve ark. 2000, Klionsky ve ark. 1999). Bu morfolojik değışiklikler sonucunda ortadan kaldırılacak proteinler veya organeller, mayada otofagosomlar içine, memeli organizmaların hücrelerinde ise otofajik vakuoller içinde biriktirilir ve parçalanır. Otofagosomlar da otofajik vakuoller de çift membranlı veziküllerdir (Şekil 2.3). Otofaji açlık koşulları altında indüklenir ama besin açısından zengin koşullar altında da çalıştığı gösterilmiştir (Baba ve ark. 1997, Scott ve ark. 1997).

Tor kontrolünde gerçekleşen bir sinyal ile gerçekleşen otofajiyi gösteren şematik model:
1) Otofajinin indüksiyonu. 2) Çift membranlı olan otofagosom oluşumu ve sitosol ile birlikte organellerin (bu şemada mitokondri tasvir ediliyor) otofagosomun içinde

biriktirilmesi. 3) Otofagosom oluşumu tamamlandığında cisim lizozom veya vakuol ile kenetlenir (bu şemada vakuol ile kenetlenmesi tasvir ediliyor). Otofagosomun dış zarının vakuol ile füzyonu gerçekleşir, iç zarı vakuol içine salınır. 4) İç zarın oluşturduğu yapıya otofajik vücut denir. Vakuol içinde otofajik cisim hidrolize edilir ve geri dönüştürülür (Şekil 2.3) (Klionsky ve Emr 2000).



Şekil 2.3. *S. cerevisiae*'de otofaji süreci (Klionsky ve Emr 2000).

Spesifik olmayan otofaji, besin açısından zengin olmayan durumlarda aktive edilir yani asıl nedeni açlıktır. Otofaji hem gelişimsel hem de beslenme açısından düzenlenebilir. Memeli hücrelerinde, Ribozomal protein S6'nın mTOR kinaz ile fosforilasyonu gerçekleştirilip aktive edilmesiyle makrotofaji inhibe edilir. Rapamisin mTOR'u inaktive eder. Rapamisin ile mTOR'un inaktive edilmesi, Ribozomal protein S6'nin fosforilasyonunun inhibisyonudur. Böylece besin açısından zengin olan koşullarda bile otofaji indüklenebilir (Blommaert ve ark. 1995, Thomas ve ark. 1997, Brown 1995). Otofaji mayada da TOR2'nin rapamisin ile inhibe edilmesi ile indüklenebilir (Noda ve Ohsumi 1998). Mayada ve memelilerde protein fosfat 2A otofajiyi aktive eder. TOR2, Tap42'nin protein fosfat 2A (PP2A) ile etkileşime girmesine neden olur. Böylece PP2A'nın aktivitesinde azalma gerçekleşir (Beck ve Hall, 1999). TOR2'nin inhibe edilmesi, PP2A'nın aktivasyonuna ve otofajinin de indüklenmesine sebep olur. PP2A ile beraber diğer fosfatlar da otofajinin düzenlenmesinde rol oynar (Kamada ve ark. 2000).

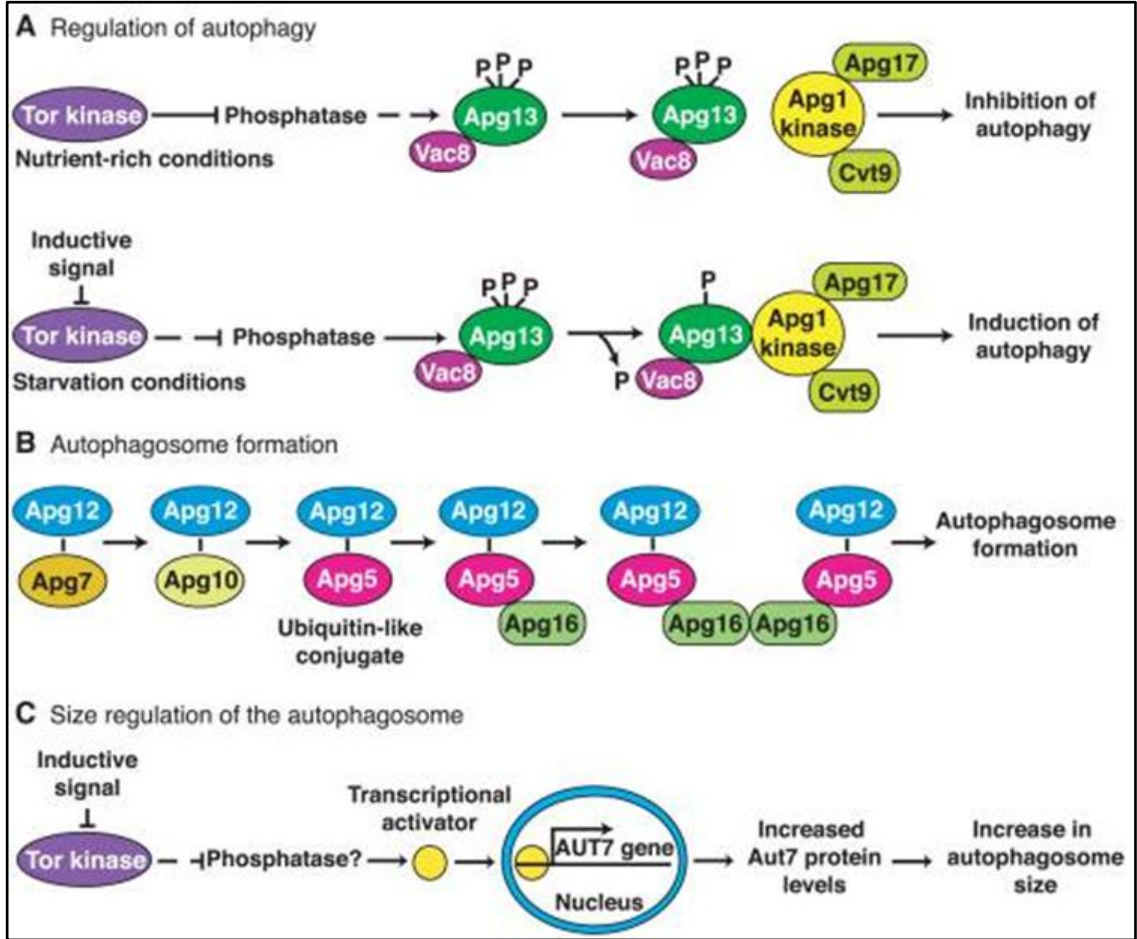
Otofaji uyarıldıktan sonra, sitosolde, hücrenin sitoplazma bileşenlerini biriktirecek çift zarlı bir vezikül oluşmaya başlar. Memeli hücrelerinde bu zarın kökeni endoplazmik retikulum olduğu düşünülmektedir ama kökeni tam olarak bilinmemektedir (Dunn 1990). Vezikül içinde biriktirme (sekestrasyon) GTPazlar, fosfatidilinositol kinazlar ve birçok farklı fosfatazlar ile yoğun bir şekilde düzenlenir.

Vakuol ile otofagosom füzyonu için birçok protein gereklidir. Bunlar vakuolar sintaksin homolog Vam3p ve SNAP-25 homolog Vam7p başta olmak üzere füzyon bileşenleridir (Darsow ve ark. 1997, Sato ve ark. 1998). Düzenleyici GTPaz, Ypt7 (Kim ve ark. 1999) ve C sınıfı Vps protein kompleksi (Scott ve ark. 1997, Rieder ve ark. 1997, Seals ve ark. 2000) otofagosomun vakuol ile etkili füzyonu için gereklidir.

Otofajinin iki türü vardır. Birincisi spesifik olmayan, otofagosomun içinde sitoplazma ile organel ya da proteinlerin rastgele bir şekilde biriktiği seçici olmayan yoldur. İkincisi ise spesifik bir organelin, seçici olmayan otofajiye göre nispeten daha az sitoplazma ile otofagosom içine alındığı seçici otofajidir. Bu otofagosomların şekilleri içlerinde biriken organellere benzer. Organellerin tanınmasının temeli belirsizdir ama spesifik kofaktörler tanınmıştır. Cvt yolu, mitofaji ve retükulofaji bu seçici otofaji türlerinden bazılarıdır. Seçici otofaji türleri için Atg11 gereklidir (Şekil 2.4).

Cvt yolu (cytoplazma-vakuol targeting) en iyi karakterize edilen seçici otofaji türüdür. İki hidrolazın doğrudan sitoplazmadan olgun formlarına enzimatik olarak işlendikleri vakuole taşınmasından sorumlu olan, biyosentetik bir yoldur ve besin açısından zengin koşullar altında çalışır (Scott ve ark. 1997). Cvt kompleksinin ana bileşeni olan preApe1 sentezlenir ve kompleksin çekirdek yapısını oluşturmak için oligomerize edilip birleştirilir (Baba ve ark. 1997, Oda ve ark. 1996). Cvt kompleksi Ape1'in yanında, Ty1 virüsü benzeri yapılar ve vakuolar mannozidaz içerir (Shintani ve ark. 2002, Suzuki ve ark. 2002). Mayada Ty1 virüslerinin ürettiği Ty1 VLP'ler, Ape1 kompleksinin etrafında birikirler (Suzuki ve ark. 2011). CVT kompleksinin organizasyonu için Atg19 ve Atg34 reseptörleri gereklidir (Watanabe ve ark. 2010). Atg19, Ape1 kompleksi ve Ty1 VLP'lerinin birbiri ile etkileşmesi için gereklidir. Açlık sırasında, Atg19 veya Atg34, vakuolar mannozidazın Cvt kompleksine hedefler (Suzuki ve ark. 2010). Cvt kompleksi

de böylece kargo adı verilen prApe1, Ams1 ve Ty1 VLP'den ve reseptör olan Atg19 ve Atg34'den oluşur. Daha sonra kompleks vakuole taşınır.



Şekil 2.4. *S. cerevisiae*'de otofaji ve otofagosom düzenlenmesi. A) Otofajinin Düzenlenmesi, B) Otofagosomun Oluşturulması, C) Otofagosomun Boyutunun Düzenlenmesi (Klionsky ve Emr 2000).

Mitofaji, hasar görmüş mitokondrilerin ortadan kaldırılması olan, mitokondriye özgü otofaji türüdür. Mitofaji, aerobik koşullarda büyütülen hücrelerin azot açlığı olan ortama aktarıldıklarında ortaya çıkar. Mitofaji için spesifik olarak Atg11 ve Atg32 proteinleri gereklidir (Kanki ve ark. 2008). Atg32, mitokondrinin dış membranına bağlanır ve Atg8 ve Atg11 ile etkileşime girerek mitokondriyal sekestraasyon için seçicilik sağlar (Okamoto ve ark. 2009, Kanki ve ark. 2009). Mitofaji uyarıldığında Atg32, Hog1 ve Pbs2 tarafından fosforile edilir ve Atg32'nin fosforile edilmiş hali Atg11 ile bağlanır (Aoki ve ark. 2011). Daha sonra otofagosom ile vakuole iletilir.

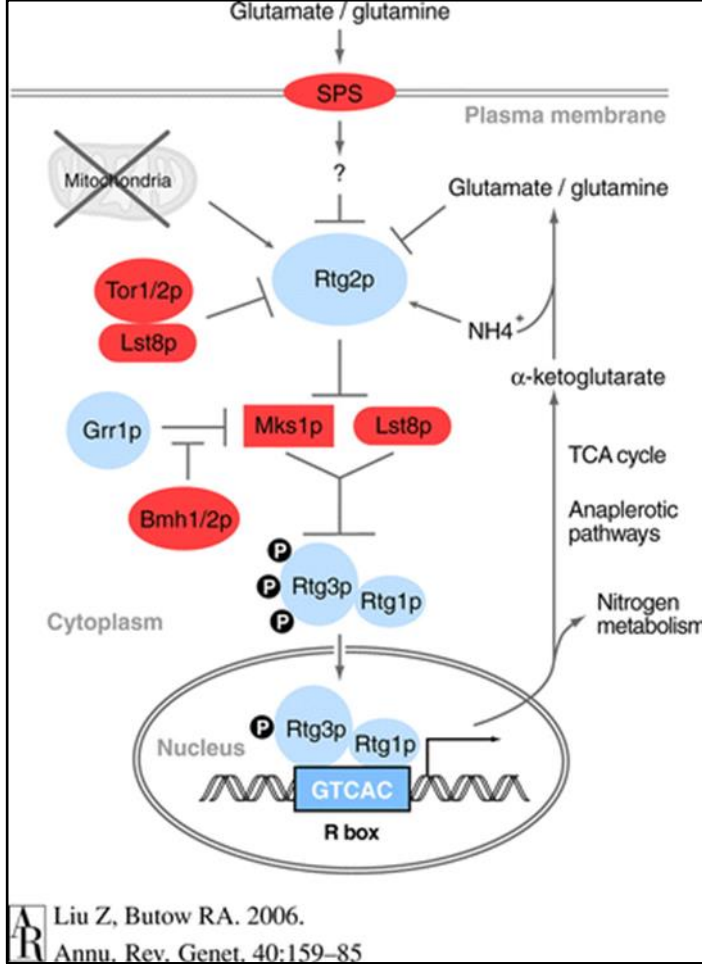
Retikulofaji, endoplazmik retikuluma (ER) özgü seçici otofajidir. Açlık üzerine veya ER stresi üzerine indüklenen iki türü vardır. Açlık ile indüklenmiş otofajide otofagosomlarda sadece ER fragmanları gözlenirken, ER stresi ile indüklenmiş otofajide, çift membranlı veziküller içlerinde çok katmanlı yapılar gösterdiği için, ER'nin en azından bu tip otofajide otofagosomların kaynağı olduğu düşünülüyor (Bernales ve ark. 2006, Bernales ve ark. 2007). İki retikulofaji tipinde farklı Atg proteinleri rol oynar: Açlık ile indüklenmiş retikulofaji Atg16'ya bağlıdır (Hamasaki ve ark. 2005) ama Atg5 ve Atg12'yi gerektirmez (Mijaljica ve ark. 2006). ER stresi ile indüklenmiş retikulofaji ise Atg8 (Bernales ve ark. 2006), Atg5 (Ogata ve ark. 2006), Atg1 ve Atg12 (Yorimitsu ve ark. 2006) ve muhtemelen Atg19 ve Atg20'ye bağlıdır (Bernales ve ark. 2006).

2.4. *Saccharomyces Cerevisiae*'da Retrograd Sinyalin Kontrol Mekanizması ve Genel Özellikleri

Retrograd Sinyali, normal ve patofizyolojik koşullarda mitokondriden çekirdeğe doğru olan bir sinyal yoludur. Bu sinyal yolu, memelilerde ve *Saccharomyces cerevisiae*'de çalışılmıştır. En iyi aydınlatılan yok mayadaki retrograd sinyal yoludur. Mitokondri kendi genomuna sahip olsa da kendisi için gerekli olan faktörlerin çoğunu kendisi sağlayamaz ve bu faktörler çekirdek tarafından kodlanırlar. Mitokondride olan kusurlar sonucunda, bu kusurları algılayan ve algılayan birçok faktör, sinyali nükleusa iletir. Hücreler organelin fonksiyonundaki değişikliklere çekirdekteki gen ekspresyon seviyelerini değişmesi ile tepki verirler ve bu tepki mitokondrideki bu kusurların onarılması ile sonuçlanır. Retrograd düzenlemesi, besin algılamada, metabolik ve organel homeostazında, büyüme kontrolü ve yaşlanmada rol oynayan çok yönlü bir sinyal yoludur. Retrograd sinyal yolu, sinyal iletimini gerçekleştiren moleküler mekanizmalar bakımından değişiklik gösterse de evrimsel olarak korunmuş bir yoldur.

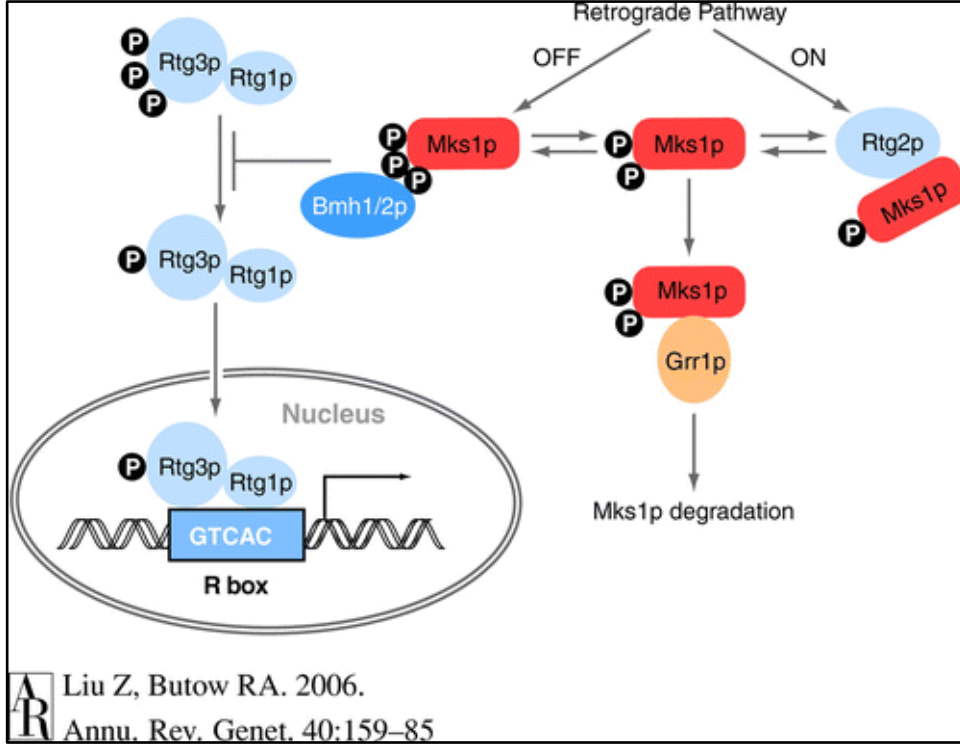
Retrograd yolağının ilk bulunan hedefi, sitrat sentazın peroksizomal izoformunu kodlayan *CIT2*'dir (Liao ve ark. 1991). Mitokondriyal DNA'sı (mtDNA) olmayan hücrelerde (ρ^0 petite) veya mitokondriyal fonksiyonları bozulmuş hücrelerde *CIT2* ekspresyonu 30 kat artar (Liao ve ark. 1991). *CIT2*'nin düzenlenmesinde birden fazla

pozitif ve negatif regülatör vardır (Şekil 2.5) (Jia ve ark. 1997, Liao ve Butow 1993, Liu ve ark. 2001, Liu ve ark. 2005, Sekito ve ark. 2002)



Şekil 2.5. *S. cerevisiae*'de RTG yolunun düzenlenmesi (Liu ve Butow 2006).

Retrograd cevap yolunun pozitif düzenleyicileri mavi, negatif düzenleyicileri kırmızı olarak gösterilmiştir. RTG yolunun aktivasyonu, mitokondriyel hasarları onarır, glutamat seviyesinde artışa sebep olabilir. Glutamat seviyelerindeki artış RTG sinyalinin baskılanmasına sebep olur. Glutamat ve glutamin SPS amino asit algılama reseptörü tarafından algılanır ve Rtg2p inhibe edilir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. *S. cerevisiae*'de RTG bağımlı retrograd yol (Liu ve Butow 2006).

RTG yolunun bilinen dört tane pozitif regülatörü vardır. Bunlar Rtg1p, Rtg3p, Rtg2p ve Grr1p'dir. RTG1 ve RTG3 genlerinden kodlanan bu proteinler heterodimer oluştururlar. Bu heterodimer Rtg1/3p kompleksi hedef genlerin promotorlarına bağlanır ve genlerin ekspresyonunu indüklerler. Kompleksin transkripsiyonel aktivasyon alanı Rtg3p'nin içerisinde bulunur (Rothermel ve ark. 1997). E kutusu (Massari ve Murre 2000) denilen CANNTG selansına bağlanan çoğu bHLH tipi transkripsiyon faktörünün aksine, Rtg1/3p kompleksi, R kutusu (Jia ve ark. 1997, Liao ve Butow 1993) denilen, GTCAC sekansına bağlanır ve hedef genler aktive edilir. Rtg3p bir fosfoproteindir, oysa Rtg1p fosfoprotein değildir. Rtg3p'nin aktivasyonu, kısmi defosforilasyonu ve Rtg1p ile nükleer translokasyonu ile ilişkilidir (Sekito ve ark. 2000). Rtg2p, N- terminal ATP bağlama alanına sahip olan, sitoplazmada bulunan bir proteindir (Bork ve ark. 1992, Koonin 1994). Rtg2p'nin ATP bağlanma bölgesi, işlevi için gereklidir. Rtg1/3p'nin nükleer traslokasyonu için Rtg2p gereklidir (Liu ve ark. 2003). Rtg2p mitokondri hasarlarını, membran potansiyalindeki azalmaları algılayıp Rtg1/3p kompleksini aktive eder. Grr1p, negatif bir düzenletici olan Mks1p'ye ubiquitin konjugasyonunda ve böylece inhibisyonunda rol oynar (Liu ve ark. 2005). Hücrede geniş Mks1p havuzu, Mks1p-

Bmh1/2p ve Mks1p-Rtg2p kompleksleri arasındaki geçişin verimliliğini azaltır. Grr1p, bu Mks1p havuzunu daraltarak retrogradı pozitif olarak düzenler.

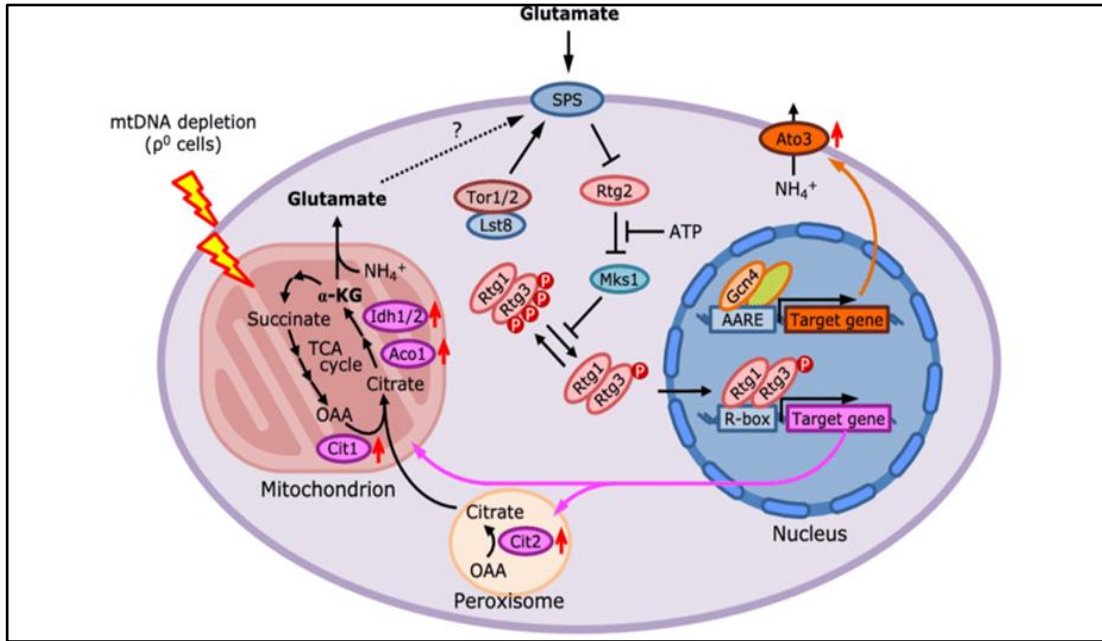
RTG yolunun bilinen üç tane negatif regülatörü vardır. Bunlar Mks1p, Lst8p ve 14-3-3 Proteinlerdir. Rtg3p, defosforilasyonu sonucu aktifleşir. Mks1p'nin görevi Rtg3p'nin fosforilasyonunu teşvik etmek ve böylece Rtg1/3p'nin nükleer transkripsiyonunu inhibe ederek, RTG yolunu negatif olarak düzenlemektir (Dilova ve ark. 2004, Sekito ve ark. 2002). Mks1p, Rtg2p tarafından da inhibe edilmektedir. Lst8p, TORC1 ve TORC2'nin ayrılmaz bir bileşenidir (Loewith ve ark. 2002, Reinke ve ark. 2004, Wedeman ve ark. 2003). Mks1p ile Rtg1/3p'yi inhibe ederek RTG yolunu negatif olarak düzenler. Rtg2p tarafında inhibe edilebilir (Chen ve Kaiser 2003, Liu ve ark. 2001). 14-3-3 Proteinler, Bmh1p ve Bmh2p proteinleridir. Mks1p'nin Grr1p tarafından ubiquitinlenmesini engellerler (Liu ve ark. 2003, Liu ve ark. 2005). BMH1 ve BMH2 tarafından kodlanırlar. Bmh1p, hücrede Bmh2p'ye göre daha fazla bulunur (Gelperin ve ark. 1995). Bmh1/2p, Rtg3p'ye bağlanarak onu inhibe halde tuttuğu düşünülmektedir (Van Heusden ve Steensma 2001).

İki grup retrograd hedef genleri vardır. Bunlar sağlam bir retrograd cevap oluşturan *CIT2*, *DLD3* genleri ve belirgin bir cevap oluşturmayan birkaç krebs döngüsü genleridir (Chelstowska ve ark. 1999, Liao ve Butow 1993, Liao ve ark. 1991, Liu ve Butow 1999). Rtg1p ve Rtg3p *CIT2*'nin promotor bölgesindeki R kutusuna bağlanmak için heterodimer oluştururlar (Jia ve ark. 1997, Massari ve Murre 2000). *CIT2* glikosilat döngüsünde, sitrat sentazın peroksizomal izoformunu kodlar. Sitrat sentaz maya hücrelerinde tek karbon kaynağı olarak asetat ve etanol gibi iki karbon bileşiğini kullanmasını sağlar. Diğer glikosilat döngüsü genleri retrograd yanıt ile düzenlenmezler. *DLD3*'ün retrograd ile kodlanması için fizyolojik fonksiyonu bilinmemektedir.

Krebs döngüsünde görev yapan RTG hedef genlerinin, yani *CIT1*'in (sitrat sentazın mitokondriyel izoformu), *ACO1*'in (Akonitazı kodlar) ve *IDH1/2*'nin (NAD⁺ bağımlı izositrat dehidrojenazı kodlar) seviyeleri p⁰ hücrelerinde yükselmez (Liu ve Butow 1999). Mitokondri disfonksiyonu olan hücrelerde bu genlerin kontrolü Rtg1/3p'ye geçer. Bu düzeltme ile TCA döngüsünün iki önemli işlevi olan ATP sağlanır ve anabolik biyosentez

için metabolik ara ürün üretilir. Mitokondriyel DNA'sı olmayan hücrelerde, krebs döngüsündeki suksinattan oksaloasetik asite kadar olan aşama çalışmaz ama krebs döngüsünün geri kalanında biyosentez için metabolik ara maddeler üretilmeye devam eder. Buradaki metabolik ara maddelerin üretimi Rtg1/3p'nin kontrolü altındadır ve glutamat, lizin gibi ürünlerin biyosentezi devam ettirilir.

Mitokondrilerinde fonksiyon kaybı olan hücrelerde, asetil-CoA ve sitrat sağlayacak (anaplerotik) yollarda yer alan genlerin yüksek ekspresyonu olur (Epstein ve ark. 2001). Retrograd yanıt, krebs döngüsündeki enzimleri kodlayan genlerdeki kusurlarla da indüklenebilir (Chelstowska ve Butow 1995). Peroksizom seviyelerinde artış gerçekleşir ve dolayısıyla yağ asidi oksidasyonu ve asetil-CoA üretimi artar. Sitosolik piruvat karboksilazı yüksek düzeyde kodlanması ile piruvattan oksaloasetat (OAA) üretimi artar. *CIT2*'nin artan ekspresyonu, asetil-Coa ve oksaloasetattan sitrat üretimini artırır. RTG yolu, RTG hedef geni *ACO1*'in düzenlenmesi yoluyla mtDNA bakımını etkiler, böylece retrograd cevap ile mitokondriyal biyogenez başlar (Şekil 2.7) (Chen ve ark. 2005).



Şekil 2.7. *S. cerevisiae*'de RTG bağımlı ve RTG bağımsız retrograd yollar (Kasai ve ark. 2019)

Mitokondriyal disfonksiyonun sonuçlarının transkripsiyonel profili, retrograd-duyarlı genlerin tümünün RTG genleri tarafından düzenlenmediğini ortaya koydu. Bu sınıf

arasında, plazma zarına lokalize edilmiş varsayılan bir dış amonyum taşıyıcıyı kodlayan *ATO3* bulunmaktadır.

RTG sinyalleşmesinin negatif bir düzenleyicisi olarak tanımlanan Lst8p, mayada TOR kinaz komplekslerinde tespit edilmiştir (Wullschleger ve ark. 2006). Mayada rapamisine duyarlı TORC1 kompleksi ve rapamisine duyarsız TORC2 olmak üzere, iki farklı TOR kinaz kompleksi vardır (Loewith ve ark. 2002, Reinke ve ark. 2004, Wedeman ve ark. 2003). Rapamisin ile muamele edilen hücrelerde RTG hedefli genlerin ekspresyonlarında artış gözlenmesi TOR sinyallerinin RTG yolağına dahil olduğunu gösterir (Komeili ve ark. 2000, Shamji ve ark. 2000). TORC1, Rtg2p'yi inhibe edip, Mks1p-Bmh1/2p kompleksini uyardığı için retrogradı negatif olarak düzenler. Rapamisin tedavisi TOR'u bloke ederek Rtg2p'nin aktifleşmesine ve retrogradın pozitif olarak düzenlenmesine sebep olabilir (Komeili ve ark. 2000, Liu ve ark. 2001). Ayrıca TOR, azot algılaması olmak üzere besin algılaması ile ilgili olduğundan, Glutamin varlığının TOR tarafından algılanması ile Rtg1/3p'nin inhibe edildiği düşünülmektedir. Ayrıca hücre dışındaki glutamat ve glutamin de plazma zarındaki SPS amino asit algılama reseptörü tarafından algılanır ve Rtg2p inhibe edilir. TORC1 Rtg2p negatif olarak düzenlerken, Mks1p'yi pozitif olarak düzenler (Jazwinski 2013). Glutamat, galutamin ile birlikte, biyosentetik reaksiyonlarda kullanılan tüm azotu sağlar (Magasanik ve Kaiser 2002). Bu nedenle hücrede glutamat belirli bir seviyede tutulmalıdır. Bu sebeple RTG yolunun ana işlevlerinden bir tanesi, biyosentetik reaksiyonlar için azot kaynağı talebini karşılamak üzere glutamat sentezi için yeterli a-ketoglutamat seviyesinin yapılmasını sağlamaktır. Retrogradın yaşlanma ile de ilişkisi vardır. MtDNA'sını kaybetmiş maya hücrelerinde retrograd yol çalışmaya başlayarak mayanın yaşam süresini uzatır (Kirchman ve ark. 1999). Hasarlı da olsa mtDNA varlığında solunum zincirindeki yetersizlikler mitokondri membran potansiyelinde azalmaya yol açar. Bu mitokondri membran potansiyeli Rtg2p tarafından algılanır ve RTG yolu aktive olur. Serbest Rtg2p proteinleri kromozom dışı ribozomal DNA çemberi (ERC) birikimini baskılar. ERC'nin baskılanması ile retrograd yanıt mayanın replikatif yaşam süresinde artışa sebep olur. MtDNA kaybı ERC seviyesini arttırır (Conrad-Webb ve Butow 1995) ve mtDNA'larını kaybetmiş maya hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli çok düşüktür. Bu sebeple hücredeki neredeyse tüm Rtg2p proteinleri retrograd sinyalleşmeye dahil olur ve ERC bastırmak için hücrede yeterli

protein bulunmaz. Ama ERC'lerin birikmesi replikatif yaşam süresini kısaltamaz çünkü mevcut Rtg2p havuzunun retrograd sinyallemeye dahil olması zararlı etkileri daha çok telafi eder ve replikatif yaşam süresini uzatır (Jazwinski 2013).

2.5. *GPD1* Geninin Yapısal Özellikleri ve Kontrol Mekanizması

GPD1, ozmotik stres altında büyüme için gerekli olan gliserol sentezinin enzimi olan NAD'a bağlı gliserol-3-fosfat dehidrojenaz'ı kodlar; yüksek ozmolariteye karşı gliserol sentezi yolu ile ekspresyonu gerçekleştirilir. *GPD1* ekspresyonu HOG yolu ve alternatif yollarla tarafından kontrol edilir. Hem NaCl hem de sükröz *GPD1* mRNA seviyelerinde keskin bir artışa neden olur (Albertyn ve ark. 1994). *GPD1*, protein kinazlar olan Ypk1p ve Ypk2p tarafından fosforlanır, fosforilasyon sonrasında inaktif olur, defosforilasyonundan sonra genin katalitik aktivitesi artar.

Yüksek osmolarite stresine yanıt olarak hücre içi gliserol birikiminde rol oynayan NAD bağımlı gliserol-3-fosfat dehidrojenaz enzimi, sitoplazma ve peroksizomlarda lokalize olur. *GPD1* esansiyel değildir. *GPD1*'i çıkartılmış mutantlarda etanol birikiminde artış, gliserol birikiminde ise azalma görülür. *GPD1*'in aşırı ekspresyonu hücre içinde gliserol, bütan-2,3-diol, asetat, asetoin seviyelerinin artmasına sebep olur.

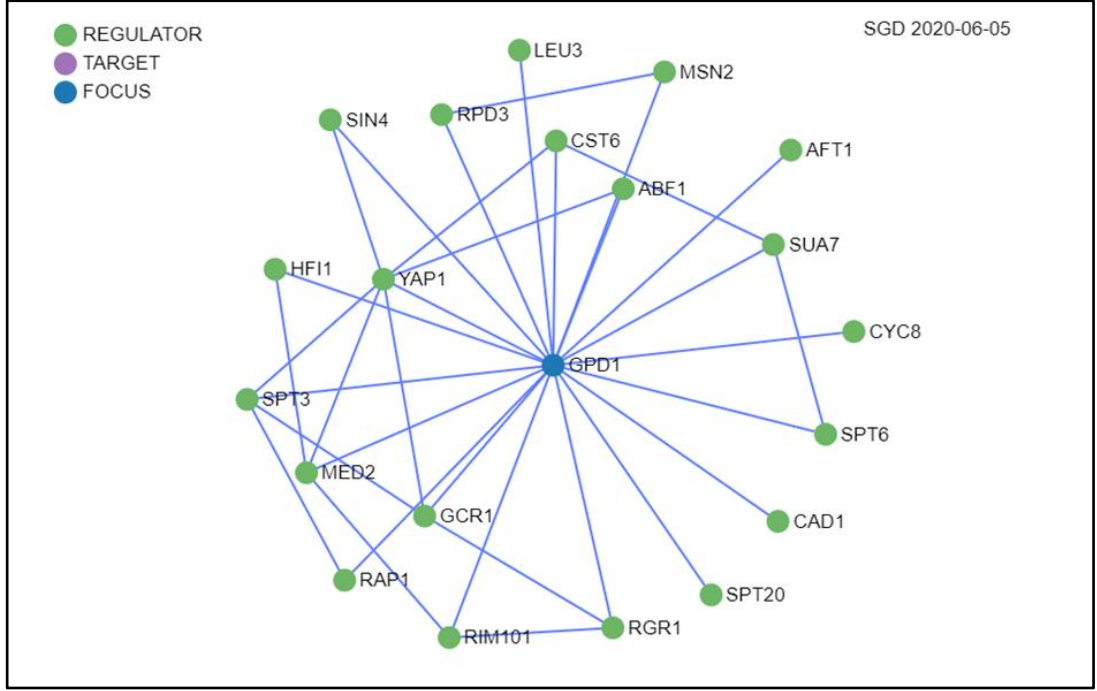
Saccharomyces cerevisiae, bir redoksneutral işlemi olarak, şekeri etanole fermente eder ve bu sırada bir yan ürün olan gliserol oluşur. Gliserol üretilirken NADH tüketilir. Gliserol oluşumunun rolü, anaerobik koşullar altında sitoplazmadaki redoks dengesini korumaktır. Gliserolün bir diğer görevi maya hücrelerinde osmoregülasyondur, çözünen olarak rol oynar. Hücre dışında su konsantrasyonunun azalması sırasında *S.cerevisiae*, gliserol sentezini büyük ölçekte arttırır. *GPD1* osmoregülasyon sırasında gliserol birikimi için önemlidir. *GPD1*'in ozmotik indüksiyonu, spesifik bir sinyal yolu ile transkripsiyonel seviyede gerçekleşir (Nevoigt ve Stahl 1996).

Maya ve çok hücreli ökaryotlarda, düzenlemeleri ve efektörleri farklı, iki ayrı kompleks olan TORC1 ve TORC2'de TOR kinazlar bulunur (Loewith ve ark. 2011). *GPD1*, TORC2'ye bağlı olan Ypk1p ve Ypk2p kinazlarının hedefidir. Ypk1p, *GPD1*'i

fosforlayarak inaktif eder. Ypk1'in yüksek NaCl konsantrasyonlarında TORC2'ye bağı fosforilasyonu durur. Ypk1'in inaktif olması, *GPD1*'in defosforilasyonuna ve aktivasyonuna sebep olur. Bu da gliserol sentezinin artmasını ve iyileşmeyi hızlandırır (Lee ve ark. 2012). Ypk1p mutasyonu *GPD1* fosforilasyonunu önlemez. Ypk1 ve Ypk2 kinazları birbirleri ile yakından ilişkili olduğundan Ypk1'de mutasyon olsa da Ypk2 *GPD1* fosforilasyonuna katkıda bulunur.

Sitoplazmadaki gliserol-3-fosfat dehidrojenazların, dihidroksiaseton fosfatın NADH'ye bağı olarak gliserol-3-fosfata indirgenmesi reaksiyonu ökaryotlarda korunan yüksek ozmolariteye uyum için gliserol üretimi yolağının ilk adımıdır ve bu yol hücre büyümesi için önemlidir. GPD üstsel büyüme sırasında, glikoliz sonucu süretilen NADH'yi yeniden oksitleyerek hücrel redoks dengesini korur (Ansell ve ark. 1997, Björkqvist ve ark. 1997). Bu yol tarafından üretilen gliserol yüksek ozmolaritede hücre içinde birikir.

GPD1 ayrıca kalori kısıtlamasının sebep olduğu yaşam ömrünü uzatabilecek mitokondriyel NADH yoluna katılabilir (Easlon ve ark. 2008.) ve toksik metabolik yan ürün metilglükoksal birikimini azaltmada da görev yapar (Aguilera ve ark, 2004). *GPD2*, *GPD1*'in paraloğudur. *GPD2* hem sitosol hem de mitokondriye lokalize olurken *GPD1* hem sitozol hem de peroksizomlarda bulunur (Jung ve ark, 2010, Valadi ve ark, 2004). *GPD1*'in *S.cerevisiae*'deki sistematik adı YDL022W'dir. Dördüncü kromozomun 411825 ve 413000 nükleotitleri arasında kalan bölgedir. *GPD1*'den kodlanan enzim olan gliserol-3-fosfat dehidrojenaz'ın yarı ömrü 24,5 saattir (Cristiano ve ark. 2014). *GPD1* transkripsiyonunu kontrol eden faktörler de büyük çoğunlukla belirlenmiştir (Şekil 2.8)



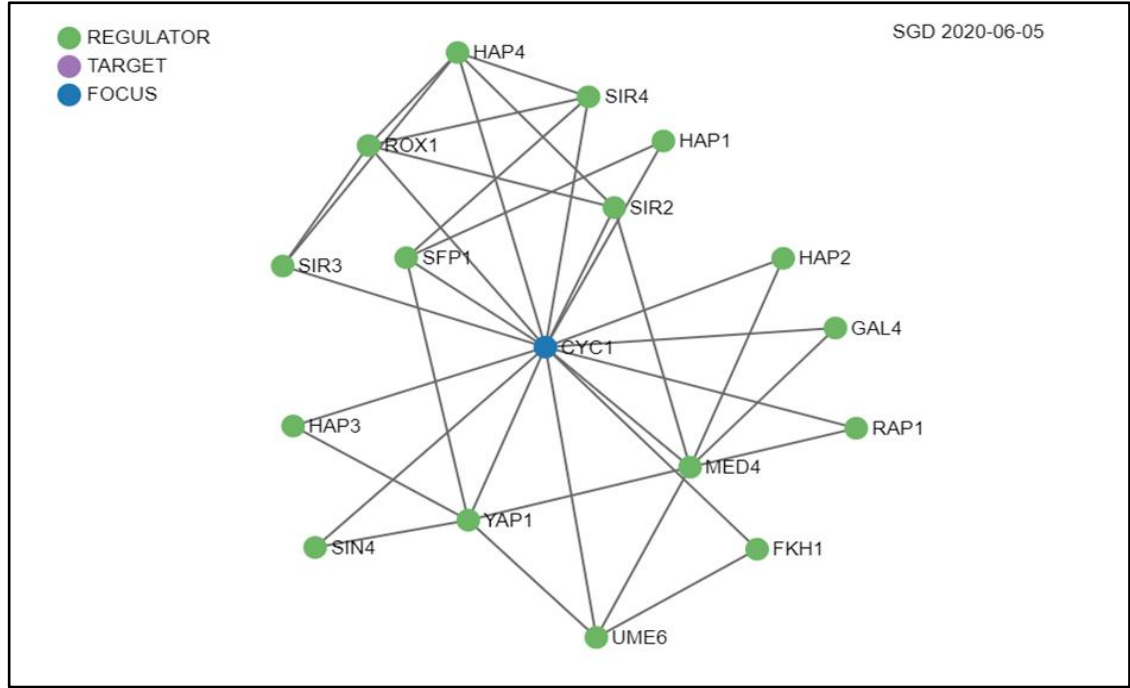
Şekil 2.8. *GPD1* geni transkripsiyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörleri (SGD).

2.6. *CYC1* Geninin Yapısal Özellikleri ve Kontrol Mekanizması

S. cerevisiae'de ilk tanımlanan gen *CYC1* genidir ve aynı zamanda bu gen ökaryotik organizmalarda ilk tanımlanan gendir (Sherman ve ark. 1965). *CYC1* geni *S. cerevisiae*'de J kromozomu olarak adlandırılan 10. Kromozomda ve 526335 ve 526664 nükleotitleri arasında yer alır. *CYC1* geninde intron bulunmamaktadır. *CYC7*, *CYC1*'in paraloğudur. Genin uzunluğu 330 baz çiftidir. *S. cerevisiae* *CYC1* geni insan *CYC1* ile homologdur ve hiperglisemiyi incelemek için kullanılmıştır. *CYC1*'in *S. cerevisiae*'daki sistematik adı YJR048w'dir. *CYC1* esansiyel değildir. Bu gen olmayan mayalar 3-klorolaktik asite direnç gösterir ve fermente edilemeyen karbon kaynakları üzerinde büyüyemez (Sherman ve ark. 1965, Sherman ve ark. 1974), prolin, amonyum, glutamin gibi azot kaynaklarını ise mutant olmayan mayalara göre daha az kullanır, büyüme ortamında rekabetleri azalmıştır.

CYC1 geninin transkripsiyonu aerobik şartlar, demir iyonları ve glukoz baskılaması ile düzenlenir. *CYC1* transkripsiyonu oksijen, demir ve laktat ile indüklenirken, glikoz

tarafından baskılanır (Hörtner ve ark. 1982, Guarente ve Mason 1983, Boss ve ark. 1980, Guarente ve ark. 1984). Genin promotor bölgesindeki transkripsiyonel kontrol bölgelerini belirlemek için yapılan delesyon analizleri sonucu, UAS1 (Upstream Activation Sequence-1) ve UAS2 olarak adlandırılan, iki farklı kontrol sekansı belirlenmiştir (Guarente ve ark. 1984). UAS2 bölgesine demir ve oksijen varlığında *CYCI* transkripsiyonunu aktive eden, Hap2p/Hap3p adı verilen transkripsiyon faktörleri kompleksi bağlanır (Forsburg ve Guarente 1989). *CYCI* transkripsiyonu dolaylı olarak glukoz ile baskılanabilir. Glukoz varlığında *CYCI* transkripsiyonunda aktivatör olarak görev yapan HAP4, Mig1p tarafından baskılanır ve bu sebeple *CYCI* geninin transkripsiyonu baskılanır (Treitel ve Carlson 1995, Olesen ve ark. 1987). *CYCI*, Cytochrome C, isoform 1 veya iso-1-cytochrome c olarak da adlandırılır (Sherman ve ark. 1966). *CYCI* proteini olan Cyc1p'in yarı ömrü 6.6 saattir (Cristiano ve ark. 2014). Protein 109 amino asit uzunluğunda, 12190.2 Da ağırlığındadır ve izoelektrik noktası 9.96'dır. Cyc1p mitokondrinin membranları arasındaki boşluklarda ve mitokondrinin kristalarında yoğun bir şekilde bulunur, membranlara ya da kristalara bağlı değildir, bu bölgelerde hareket eder (Sherman ve ark. 1965, Dumont ve ark. 1991, Sherman 2005). Cyc1p elektron taşıma sisteminde ubikinon-sitokrom c oksidoredüktazdan sitokrom c oksidaza elektron taşır. Cyc1p'in bir diğer görevi apoptoz için sinyal aldığı mitokondriden salınır ve prokaspazların aktivasyonunu sağlar (Sharonov ve ark. 2005). *CYCI* transkripsiyonunu kontrol eden faktörler de belirlenmiştir ve SGD veritabanında verilmiştir (Şekil 2.9)



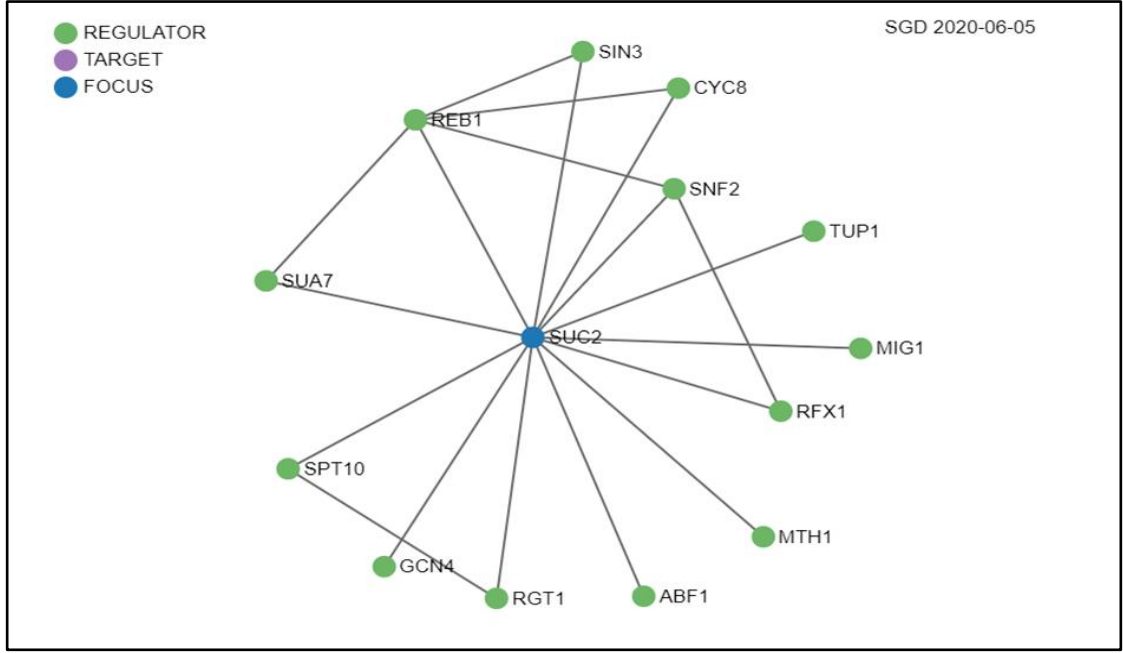
Şekil 2.9. *CYC1* geni transkripsiyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörleri (SGD).

2.7. *SUC2* Geninin Yapısal Özellikleri ve Kontrol Mekanizması

SUC2 geni, hem disakkarit olan sükrözü glikoz ve fruktoza, hem de bir trisakkarit olan rafinozu fruktoz ve melibiyozu hidrolize eden “beta-fruktofuranosidaz”, “beta-fruktosidaz”, “sükraz” olarak da bilinen invertaz enzimini kodlar, enzim karbonhidrat metabolizmasında önemli role sahiptir (Gascón 1968, Taussig ve Carlson 1983.). İvertaz, sitoplazmaya lokalize olan ve hücre dışına salgılanan iki farklı formda salgılanır. Hücre dışına salgılanan invertaz yüksek glikosile edilmiş bir homodimerdir. Periplazmik alanda sükröz hidrolizi gerçekleştirildikten sonra glikoz ve frukoz hücre içine taşınır. İç invertaz da homodimer oluşturur, glikosile değildir ve herhangi bir biyolojik işlemde bilinen bir fonksiyonu yoktur (Gascón 1968, Trimble ve Maley 1977). İvertazın iki formu da 5’ uçlarında farklılık gösteren ve farklı şekilde düzenlenen mRNA’dan kodlanır. Hücre dışına salgılanan invertaz formu 1.9 kb mRNA’ kodlanır ve enzim, onu hücre dışına yönlendiren bir sinyal peptidi içerir. Sitoplazmaya lokalize olan invertaz formu 1.8 kb mRNA’dan kodlanır ve bu formda sinyal peptidi yoktur (Carlson ve Botstein 1982, Carlson 1983). *SUC2* geni glikoz baskılaması ile düzenlenir.

Sitoplazmada kalan form çok az seviyelerde ve yapısal olarak sentezlenirken hücre dışına salgılanan form glikoz baskılaması ile kontrol edilir (Carlson ve Botstein 1982). Bu gen esansiyel değildir. Genin olmadığı mutantlar sükroz, rafinoz ve inulin gibi karbon kaynaklarını kullanamaz ve bu mutantların üreme oranları düşüktür. *S.cerevisiae* genomunda *SUC2* gibi invertaz kodlayan yedi lokusa sahiptir. Bunlar *SUC1*, *SUC2*, *SUC3*, *SUC4*, *SUC5*, *SUC7* ve *SUC8* (Carlson ve Botstein 1983, Naumov ve Naumova 2010). *SUC2* hariç diğer invertaz genleri telomer bölgelerinin içinde yer alır (Carlson 1985). Farklı suşlar genellikle tek bir aktif SUC genine sahiptir. SUC lokuslarından en aktif olarak karakterize edilen *SUC2*'dir.

SUC2 gene glikoz baskılanmasında glikoz seviyelerinin algılanmasında rol oynayan HXK2 tarafından kodlanan HXK2p, glikoz ile baskılanan birçok geni düzenleyen SNF1 tarafından kodlanan protein kinazlar ve *SUC2*'ye ve diğer glikoz ile baskılanan genlere bağlanan MIG1 proteinin gereklidir. Grr1p, Reg1p, Gcr1p ve Glc7p gibi birçok faktör *SUC2*'nin baskılanmasında rol oynar. MIG1 ile glikoz baskılaması CYC8 ve TUP1 proteinlerinin etkinliğini gerektirir. Glikoz baskılayıcı şartların olduğu durumlarda Mig1p-Cyc8p-Tup1p kompleksi bir nükleozom dizisine paketlenmiş *SUC2* promotoruna doğrudan bağlanır (Trumbly 1992). *SUC2* geni transkripsiyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörleri çeşitli teknikler tayin edilmiştir ve SGD veritabanından derlenerek Şekil 2.10'da verilmiştir.



Şekil 2.10. *SUC2* geni transkripsiyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörleri (SGD).

Apoptoz ve otofaji süreçleri ökaryotik hücrelerde birçok metabolik olayı etkilemektedir. Bu tez araştırmasında amaç bu süreçlerin metabolizma için önemli hücresel işlevleri olan *GPD1*, *CYC1* ve *SUC2* genleri ifadesine bu süreçlerin etkisini incelemektir. Diğer taraftan, retrograde düzenleme ökaryotlarda organel işlevleri ile nükleusta gen ifadesinin koordinasyonunu sağlayan bir işlemdir. Retrograde düzenlemenin de özellikle *CYC1* de gen ifadesine etkileri inceleyecektir. *CYC1* nükleusta bulunan ve gen olmasına rağmen Cyc1p proteini mitokondride membranlara arası boşlukta bulunur. *CYC1* apoptozda işlevi olan faktördür. *SUC2* geni ise invertaz kodlamaktadır. İvertaz enzimi ER ve golgi kompleksinde modfiye edildikten sonra periplazmik alana salgılanan enzimdir. Tez araştırmamızın diğer amacı da otofaji sürecinin protein sekresyonuna etkisini invertaz enzimini model olarak kullanarak incelemektir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Araştırmada Kullanılan Maya Suşları ve Üreme Koşulları

Araştırmalarda kullanılan *S. cerevisiae* suşlarının bir bölümü Frankfurt Üniversitesi Mikrobiyoloji Enstitüsü'ndeki EUROSCARF *S. cerevisiae* koleksiyonundan sağlandı. Bu kültür koleksiyonundan YPD katı besiyerinde gönderilen maya suşları tekrar üremeleri için standart koşullarda (30 °C`de etüvde, 48 saat) YPD petrilerinde çizgi ekimi yapılarak üretildi. KanMx geni içeren maya suşları ilgili delesyonların doğrulanması için genetisin içeren YPD petrilerinde üretildi. Maya suşlarınınuzun süreli depolanması için YPD petrilerinde üretilen maya suşlarından steril kürdanla bir miktar alınarak steril %20 gliserol içeren vida kapaklı 2 ml`lik mikrofij tüplerinde suspanse edilerek -80 °C`de derin dondurucuda depolandı. Rutin amaçlar için kullanılmak üzere maya petrileri +4 C`de buz bolabında bekletildi. Araştırmada kullanılan maya suşları ve genotipleri çizelge 3.1`de verildi. Araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşları genomu tamamen sekanslanan BY4741 suşundan elde edilmiştir. Bu maya suşunda genotipde verilen mutasyonların dışında başka mutasyon veya delesyon olmadığı bilinmektedir (Brachmann ve ark. 1998). *S. cerevisiae* FY2 suşu ise Prof.Dr. P.J Farabaugh (University of Maryland) tarafından sağlandı. FY2 suşu *URA3* delesyonu dışından herhangi bir mutasyon içermediği için amino asit açlığında yaban tip maya suşu olarak kullanıldı.

Maya suşlarının üretilmesinde normal veya zengin ortam olarak YPD (yeast Extract, pepton, dekstroz) üreme ortamı kullanıldı. Transformant mayaların üretilmesinde ise urasil içermeyen sentetik tam besiyeri Sc-Ura, %2 dekstroz (Synthetic complete minus uracil) kulanıldı. *S. cerevisiae* suşlarının üretilmesinde kullanılan katı (petri ortamı) veya sıvı besi ortamları Rose ve ark. (1990) tarafından açıklandığı şekilde hazırlandı. Besiyerleri ve araştırmada kullanılan diğer çözeltilerin hazırlanması tezin Ek`ler bölümünde verildi. Apoptoz ve otofaji koşullarının aktivasyonu için sıvı kültürlerde logaritmik aşamada verilen konsantrasyonlarda asetik asit ve kafein üreme ortamına eklendi ve apoptoz otofaji sinyalleri kimyasal ajanlarla aktive edilen mayalar standart üreme koşullarında (150 devir/dk çalkalamalı inkübatörde, 30 C° de) 5 saat inkübe edilerek ürmeye bırakıldı.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşları ve özellikleri

Euroscarf Kodu	ST Lab Kodu	Genotipi ve İlgili Mutasyonlar
Y00000	YST124	MATa, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0. (yaban tipi)
Y02724	YST240	MATa, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0, YLR113w::kanMX4 (Δ hog1 mutanı)
Y06864	YST155	MATa, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0, YJR066w::kanMX4 (Dtor1 mutanı)

Mayaların üretilmesinde ilk önce seçici olmayan tam besiyeri olan YPD (Yeast Extract, Peptone, Dextrose) besiyeri kullanıldı (Guthrie ve Fink 1991). Daha sonra YST249 suşu hariç, *S. cerevisiae* suşlarına *GPD1*, *CYC1*, *SUC2* ekspresyon vektörlerinin transformasyonu ve transformantların seçilmesi ve üretilmesi için seçici besiyeri olarak urasil içermeyen minimal tam besiyeri (Sc-Ura+%2 glukoz) kullanıldı (Rose ve ark. 1990). *S. cerevisiae* FY2 suşu ise herhangi bir amino asit için okzotrof olmadığı için bu suşun transformantları YNB+%2 glukoz minimal üreme ortamında üretildi.

Bu araştırmada incelenen *GPD1*, *CYC1* ve *SUC2* genleri glukoz baskılaması ile de kontrol edildiğinden maya transformantlarını glukoz baskılamasının olmadığı derepres koşullarda üretmek için maya transformantları aynı besiyerlerinde fakat %0.1 glukoz içeren ortamlarda üretildi.

3.2. *GPD1*, *CYC1*, *SUC2* Ekspresyon Vektörlerinin Özellikleri ve Transformasyonu

Bu araştırma *GPD1*, *CYC1* ve *SUC2* genlerinin ekspresyon seviyelerini tayin etmek için bu genlerin maya plazmit vektörü olan YE_p vektörü üzerine klonlanmış lacZ raportör gen füzyonları kullanıldı. Araştırmada kullanılan YE_p vektörü mekik tipi plazmit olup E. colide replikasyon ve seleksiyon için ColE1 replikasyon orijini ve β -laktamaz (bla veya ampisilin direnç geni), *S. cerevisiae* da replikasyon ve seleksiyon için ise 2 mikron plazmiti replikasyon orijini ve *URA3* geni içermektedir. YE_p plazmitlerinin transform edildikleri maya suşlarında selektif üreme ortamlarında kopya sayılarında değişiklik

olmadan buldukları bilinmektedir (Farabaugh ve ark. 1989). Bu gen füzyonlarının moleküler özellikleri ve elde edildiği kaynaklar kısaca aşağıda özetlenmiştir.

GPD1-lacZ gen füzyonu vektörü Prof.Dr. S. Hohmann (University of Gothenburg) tarafından laboratuvarımızdaki araştırmalar için daha önceden sağlanmıştır. Bu raportör gen füzyonunda *GPD1* geninin bütün kontrol elementlerini içeren 516 bç uzunluğundaki promotor bölgesi (translasyon başlama bölgesine göre -693'den -177 bç aralığındaki bölge) *lacZ* gen füzyonu olarak YE_p vektörü üzerine klonlanmıştır (Rep ve ark. 1999). *GPD1-lacZ* gen füzyonundan yapılan ekspresyonun *S. cerevisiae* da genomik *GPD1* geninden yapılan transkripsiyonla doğru orantılı olarak bulunduğu da daha önce (Rep ve ark. 1999) tarafından gösterilmiştir.

CYCI-lacZ gen füzyonu da YE_p vektörü üzerinde daha önceden klonlanmış ekspresyon vektörüdür. Bu ekspresyon vektörü laboratuvarımıza Prof.Dr. P.J. Farabaugh (Univ. Maryland-Baltimore County) tarafından sağlanmıştır. YE_p vektörü üzerinde *CYCI-lacZ* gen füzyonunda *CYCI* geninin translasyon başlama kodonuna göre upstream bölgesinde yer alan 312 bç lik bölge yer almaktadır. Ekspresyon vektörünün hazırlanması ve moleküler özellikleri daha önce açıklanmıştır (Guarente ve ark. 1984). Bu vektör üzerinde yer alan *CYCI* promotorundan yapılan ekspresyonun kromozomal *CYCI* geninde olduğu gibi bu genin transkripsiyonel regülasyonu için yeterli olduğu da gösterilmiştir (Guarente ve ark. 1984).

SUC2-lacZ ekspresyon vektörü de daha önce laboratuvarımıza sağlanmıştır. Bu ekspresyon vektöründe *SUC2* geninin translasyon başlama kodonuna göre -140 bçden -667 bçya kadar olan promotor bölgesi bulunmaktadır (Türkel ve ark. 2003). YE_p vektörü üzerinde *SUC2-lacZ* promotor füzyonu olarak bulunan bu genden de kromozomal *SUC2* geninde olduğu gibi transkripsiyonun glukoz sinyali ile kontrol edildiği daha önce yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (Türkel ve ark. 2003).

GPDI, *CYCI* ve *SUC2* gen füzyonlarını içeren plazmitler maya suşlarına lityum asetat-poli etilen glikol (PEG) yöntemi kullanılarak ayrı ayrı transforme edildi (Ito ve ark. 1983, Rose ve ark. 1990). Transformasyon için +4 °C'de saklanan stok *S. cerevisiae* suşlarından steril kurdan ile alınarak 5 ml YPD ortamlarına ekim yapıldı ve çalkalamalı inkübatörde 30°C'de ve 140 devir/dakika hızda bir gece boyunca üretildi. Sonra sıvı kültürde büyüyen maya suşlarından 1 ml kadar alınarak 25 ml YPD üreme ortamına eklendi ve aynı koşullarda logaritmik aşamaya kadar (OD600=0.8-1.0) kadar aynı koşullarda üretildi. Üretilen mayalar logaritmik faza geldiklerinde santrifüjde 3000 g'de 5 dakika olmak üzere çöktürüldü. Çöken maya hücrelerinin süpernatant kısmı atıldıktan sonra üzerlerine 25 ml steril saf su eklendi ve vortekslendi. Daha sonra tekrar santrifüjde 3000 g'de 5 dakika çöktürüldü. Çöktürme işleminden sonra süpernatant kısım atıldı ve *S. cerevisiae* hücreleri, mikrofüj tüplerinde, taze hazırlanmış steril 1 ml 0.1 M lityum asetat çözeltisinde çözüldü. Mikrofüj tüplerinde süspanse edilmiş maya hücreleri 10 saniye boyunca mikrosantrifüj cihazı kullanılarak en yüksek hızda çöktürüldü. Çöktürmeden sonra süpernatant kısmındaki lityum asetat maya süspanسیونundan pipet ile alınarak uzaklaştırıldı ve 450 µl 0.1 M lityum asetat eklenerek *S. cerevisiae* hücreleri ile tekrar bir süspanse edildi. Daha sonra bu süspanسیونdan 50 µl alınıp steril mikrofüj tüplerini koyuldu. Tekrar mikrosantrifüj cihazında en yüksek hızda 10 saniye boyunca çöktürüldü ve lityum asetat yani süpernatant kısım pipet ile alınıp uzaklaştırıldı. Mikrosantrifüj tüplerindeki çöken maya hücrelerinin üzerine daha sonra 5-6 µg denatüre edilmiş herring sperm DNA'sı, 4-5 µg plazmid DNA'sı, 36 µl 1 M lityum asetat, 240 µl PEG ve 60 µl steril saf su ilave edildi (Rose ve ark. 1990). Sonra bu plazmit ve maya hücresi karışımları 30 °C'de etüvde 30 dakika bekletildi ve daha sonra etüvden alınan maya-plazmit karışımı 42 °C'de su banyosunda 30 dakika bekletildi ve böylece ısı şokuna maruz bırakılmış oldu. Maya ve plazmit karışımı su banyosundan alındıktan sonra mikrosantrifüde 8000 rpm'de 15sn boyunca çöktürüldü ve transformasyon karışımı mikropipet ile uzaklaştırıldı. Çöken maya hücreleri 400-500 µl steril saf suda süspanse edildi. Daha sonra hücre süspanسیونundan 75-100 µl alınıp YST249 suşları YNB (Yeast Nitrogen Base) %2 glukoz besiyeri ile hazırlanmış üreme petrilere, YST124 ve diğer mutant suşlar ise urasil içermeyen sentetik tam minimal üreme ortamı (SC-Ura + %2 glukoz) petrilere eklendi ve transformantlar belirgin koloniler oluşturana kadar, 30°C'deki etüvde, 3-4 gün bekletildi. Sonra ise *S. cerevisiae* transformantlarını içeren petrilere +4 °C'de

buzdolabında saklandı. Transformatlar koloniler belirgin bir büyüklüğe ulaştığında steril kürdan ile alındı ve YST249 suşları YNB (Yeast Nitrogen Base) + %2 glukoz besiyeri ile hazırlanmış üreme petrilere, YST124 ve diğer mutant suşlar ise Sc-ura + %2 glukoz petrilere yayma ekimi ile pasajlandı. Sonra petrilere 30 °C'de etüvde, 3-4 gün bekletilerek üremeleri sağlandı. Bu şekilde üretilen transformantlar sıvı kültürlerin hazırlanmasında kullanıldı

3.3. Stres Şartlarının Maya Hücrelerine Uygulanması

S. cerevisiae'da stresleri uyaran faktörler daha önceki çalışmalarda belirlenmiştir. Bu tez araştırmasında apoptozu uyarıcı maddeler olarak asetik asit (Ludovico ve ark. 2001, Fannjiang ve ark. 2004) ve menadion (Todorova ve ark. 2009, Redza-Dutordoir ve Averill-Bates 2016), otofajiyi uyaran maddeler olarak da kafein (Rallis ve ark. 2013) kullanıldı. Bölüm 3.2'de açıklanan şekilde hazırlanan olan transformatlar önce transformat petrilere steril kürdan ile alınıp YST249 suşları 5 ml'lik YNB ve %2 glukoz içeren (repress şartlar), YST124 ve diğer mutans suşlar ise 5 ml'lik Sc-Ura ve %2 glukoz içeren (repress şartlar) steril 25 ml'lik erlenlere sıvı besiyerleri olarak ekim yapıldı ve *S. cerevisiae* kültürleri standart koşullar altında (28-30 °C'de, 140 dönüş/dakika hızında) bir gece üretilerek (yaklaşık 18-20 saat) durağan faz ön kültürleri elde edildi. Sabah bu ön kültürler kullanılarak 5 ml'lik taze besi yerlerine, bir gece büyümeye bırakıldıkları besiyerleriyle aynı besiyeri olacak şekilde, başlangıç OD₆₀₀ değerleri 0,1 olarak ekim yapıldı ve standart şartlarda çalkalamalı inkübatörde logaritmik aşamaya (OD₆₀₀: 0,8-1) kadar üretildi. Bu aşamadan sonra üreme ortamlarına apoptozu uyarmak için son konsantrasyonu 60 mM olacak şekilde asetik asit (pH: 3) ilave edildi. Otofaji stresi oluşturmak için ise distile suda hazırlanmış steril kafein çözeltisinden son konsantrasyonu 8 mM olacak şekilde kafein ilave edildi. Apoptoz veya otofaji sinyali aktive edilmiş maya kültürleri standart üreme ortamında 5 saat daha üremeye bırakıldı.

Üreme süreleri sonunda *S. cerevisiae* kültürleri 1.5x12 cm'lik santrifüj tüplerinde aktarıldı, masaüstü santrifüj cihazında 1600 rpm'de 4 dakika çöktürüldü ve sıvı faz atıldı. Çöken maya peletlerine 1 ml'lik steril saf su ilave edildi ve vorteks cihazı ile karıştırılıp süspanse olması sağlandı. Daha sonra maya süspanسیونları mikrosantrifüj tüplerine

aktarıldı ve mikrosantrifüj cihazında 12500 rpm’de 1 dk boyunca çöktürüldü ve sıvı faz atıldı. Çöken maya pelletlerine 200 µl break buffer tampon çözeltisi eklenerek süspansiyon edildi. Bu süreçten sonra β galaktozidaz aktivitesini daha sonra ölçmek için maya süspansiyonları -20 veya -80 °C’ de depo edildi.

3.4. *Sacharomyces cerevisiae*’de β-Galaktozidaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Maya transformantlarından beta galaktozidaz aktivitelerinin tayin edilmesinde daha önce açıklanan metod uygulandı (Rose ve ark. 1990). 200 µl break buffer çözeltisinde çözülen *S. cerevisiae* hücrelerini permeabilize etmek için 20 µl 0,1M SDS ve 20 µl kloroform eklenerek vortekstendi. Hangi mekanizma bakılıyorsa her gen için 2 mikrofüj tüpü ve mikrofüj tüplerinden alınan hücre lizatların koyulacağı 6 deney tüpü hazırlandı. Deney tüplerine 980 µl Z buffer koyuldu. İçerisinde Z buffer bulunan tüplere hücre lizatlarından 12,5-20 µl eklendi. Deney tüpleri 30 °C su banyolarında 3 dk bekletilerek ön inkübasyon yapıldı. Sonra deney tüplerine 20 µl ONPG eklenerek post-it sarısı renk oluşana kadar bekletilip, renk alma süreleri kaydedildi. Renk oluşumu süresinin sonunda 500 µl 1 M sodyum karbonat ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Daha sonra çözeltiler parçalanmış maya materyalinden ayrılması için 1600 rpm’de 4 dakika santrifüj edildi ve sonra spektrometre kuvvetlerine alınarak spektrometrede absorbanları 420 nm’de belirlendi (Rose ve ark. 1990).

β-galaktozidaz aktivitesinin hesabı için hücre süspansiyonlarındaki protein konsantrasyonlarının da bilinmesi gerekmektedir. Bu da Lowry metodu kullanılarak belirlendi (Lowry ve ark. 1951). Lowry metodu kullanılırken her gen füzyonu için 2 tane deney tüpü hazırlandı ve tüplere 180 µl steril saf su koyuldu. Steril saf su üzerine daha önce permeabilize edilen hücre lizatlarından 20 µl eklendi. Daha sonra deney tüplerine 24,5 ml Lowry A, 250 µl Lowry B1 ve 250 µl Lowry B2 ile beherde hazırlanan Lowry C çözeltisinden 1 ml koyularak 1 dakika boyunca oda sıcaklığında beklendi. Bekleme süresi sırasında 1ml su, 1 ml folin (2 N stoktan) eklenerek folin çözeltisi hazırlandı. 10 dakikanın sonunda deney tüplerine 100 µl folin eklenerek vorteks cihazı ile karıştırıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında beklendi. 30 dakikanın sonunda çözeltilerdeki parçalanmış maya materyallerinin ayrılması için 1600 rpm’de 4 dakika santrifüj edildi ve sonra çözeltiler

spektrometre kuvvetlerine aktarılarak absorbanları spektrometrede 750 nm'de ölçüldü. Bulunan değerler bilgisayara girilerek β -galaktozidaz aktiviteleri lizatlardaki toplam çözümlü protein miktarına göre normalize edilerek hesaplandı. β -galaktozidaz aktiviteleri parçalanmış nmol ONPG/dakika/mg protein olarak verildi. Maya transformantları her gen için iki tekrarlı olarak (yukarıda belirtildiği gibi iki mikrofüj tüpünde) hazırlandı. β -galaktozidaz aktiviteleri her tüp için üç tane olacak şekilde her gen için altı tekrarlı olarak yapıldı. Sonuçlar bölümündeki aktivite değerleri en az altı bağımsız değerlerin ortalamasıdır. Aktivitelerin hesapları eklerde verilen Excell tabloları hazırlanarak yapıldı. Beta galaktozidaz aktivitelerinde standart sapmaların %10'dan düşük değerlerde olduğu görüldü.

3.5. *Sacharomyces cerevisiae*'da İnvertz Aktivitesinin Belirlenmesi

Maya suşlarının hücre dışındaki invertz aktiviteleri daha önce tanımlandığı şekilde hesaplandı (Rothe ve Lehle 1998, Goldstein ve Lampen 1975). *S. cerevisiae* suşları 10 ml YPD üreme ortamında 1 gece standart şartlarda üretildi ve durağan faz kültürleri elde edildi. Bu stok kültürler kullanılarak taze 25 ml YPD ortamına başlangıç OD 600 değerleri 0.2 olacak şekilde ekim yapıldı ve standart şartlarda logaritmik aşamaya kadar üretildi. Logaritmik aşamada maya kültürlerinin 10 ml lik kısmı alınarak çöktürüldü ve streil su ile yıkandı. Tekrar çöktürülen maya suşları derepres şartlar için 5 ml YP %0.1 glukoz içeren ortamda süspanse edildi. Derepres edilen maya suşlarının bir bölümüne otofaji sinyalini aktive etmek için daha önce açıklandığı şekilde kafein ilave edildi ve bu koşullarda maya kültürleri 2 saat daha üremeye bırakıldı. Üreme süreleri sonunda maya kültürleri santrifüjde çöktürülerek invertz aktiviteleri aşağıda verildiği gibi tayin edildi.

Repres, derepres veya otofaji uyarılmış koşullarda üretilen maya kültürleri santrifüjde çöktürüldü. Çökeltinin süpernatant kısmı atıldı ve çöken maya hücrelerine 5 ml sodyum asetat (50 mM, pH: 5.2) eklenip vorteks cihazında karıştırıldı. Sonra santrifüj cihazında tekrar 3000 g'de 4 dakika çöktürüldü ve süpernatant kısmı atıldı. Daha sonra çöken *S. cerevisiae* hücrelerine 200 μ l sodyum asetat (50 mM, pH: 5.2 +2mM PMSF) eklenerek süspanse edildi ve invertz aktivitesi tayininde kullanılacak stok hazırlandı.

İnvertaz aktivitesini ölçmek için mikrofüj tüplerine konsantrasyonu 200 mM olan sukroz çözeltisinden 200 mikrolitre alındı. Bu sukroz çözeltilerine stok maya hücrelerinden 50 µl alınarak vorteks cihazı ile karıştırıldı. Sonra mikrofüj tüpleri reaksiyon için, su banyosunda 30°C’de 15 dakika bekletildi. Bekleme süresinin sonunda invertaz reaksiyonunun durdurmak için 50 µl TRIS çözeltisi (1 M stok, pH:8,8) mikrofüj tüplerine eklendi ve reaksiyon durduruldu. İnvertaz aktivitesini bekirmek için reaksiyon sonucunda oluşan glukoz miktarı, spektrofotometrik bir yöntem olan Glukoz oksidaz-Peroksidaz (GOD-POD) glukoz tayin yöntemi kullanılarak tayin edildi (Goldstein ve Lampen 1975). İnvertaz aktiviteleri 100 mg kuru maya başına dakikada hidroliz edilen sukrozdan açığa çıkan mikromol glukoz olarak verildi (µM Glukoz/dk/100 mg maya).

4- BULGULAR

4.1. Apoptoz Sinyali Aktivasyonunun *GPD1* Transkripsiyonlarına Etkisi

Apoptozun *GPD1*, *CYC1* ve *SUC2* genleri transkripsiyonuna olan etkilerini incelemek için bu genlerin lacZ gen füzyonu olarak klonlandığı vektörleri içeren yaban tip *S. cerevisiae* suşu transformantları minimal üreme ortamında üretildi ve apoptoz sinyalini aktive etmek için maya kültürlerine asetik asit uygulandı. Normal üreme ortamındaki ekspresyon seviyeleri ile karşılaştırıldığında apoptoz uyarımının *GPD1* geni bazal transkripsiyonunda yaklaşık 4-kat kadar baskılamaya yol açtığı bulundu (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Apoptoz sinyali aktivasyonunun *GPD1* geninin ekspresyonuna etkisi

Maya suşları	Normal Ortam	60 mM Asetik Asit
Yaban tip (YST124)	2081 ± 113	517 ± 56
Hog Mutantı (YST240)	824 ± 50	285 ± 53
Tor Mutantı (YST155)	2074 ± 1	1145 ± 54

GPD1 geninin ana kontrol faktörü Hog1p kinazdır. Bu nedenle apoptoz sinyalinin Hog1p kinaz aracılı etkisinin olup olmadığı da incelendi. Bunun için yaban tip *S. cerevisiae* suşu ile (YST124 suşu) Hog1p kinazı içermeyen mutant (*hog1Δ*) *S. cerevisiae* suşunda (YST240) *GPD1* ekspresyon seviyeleri normal ve apoptoz uyarılmış koşullarda incelendi. Beklendiği şekilde *hog1Δ* mutant suşunda *GPD1* geni bazal transkripsiyonun da önemli seviyede azalma olduğu görülmektedir (2081 üniteden 824 üniteye). Apoptoz sinyalinin aktivasyonu ile bu maya suşlarında da *GPD1* transkripsiyonunda 3-4 kat azalma olduğu görüldü (Çizelge 4.1). Tor1p kinaz da *S. cerevisiae*'da besin sinyallerinin iletilmesinde global etkisi olan kinazdır. Bu kinazın da *GPD1* geni transkripsiyonuna etkisi *tor1Δ* mutant suşunu kullanarak test edildi. Apoptoz sinyali aktive edilmiş mutant maya suşunda *GPD1* transkripsiyonun da yaklaşık 2-kat baskılanma olduğu görüldü. Bu seviye *GPD1* transkripsiyonunda apoptoz sinyaline yanıt olarak yaban tipde görülen yaban tip baskılanma seviyesinden daha azdır. Yaban tip suşta apoptoz sinyali ile 4-kat baskılama

görülürken, *tor1Δ* mutantında 2 kadar baskılama olduğu görülmektedir (Çizelge 4.1). Bu sonuç apoptoz sinyaline yanıt olarak *GPD1* transkripsiyonunun önemli derecede baskılandığı ve bu baskılanmanın *GPD1* geni aktivatörü olan Hog1p kinzadan bağımsız olduğu ancak Tor1p kinaz aktivitesine kısmen bağlı olabileceğini göstermektedir.

4.2. Apoptozun *CYCI* Geninin Transkripsiyonuna Etkisi

Apoptoz sinyalinin *CYCI* geni bazal transkripsiyonuna etkileri de yaban tip ve *tor1Δ* mutant suşlarında karşılaştırmalı olarak analiz edildi. *CYCI* transkripsiyonunun apoptoz sinyali ile yaban tip suşta 7-kat baskılandığı ve *CYCI* transkripsiyonunun 172 üniteden 24 üniteye azaldığı bulundu. Apoptoz sinyali aktivasyonunun *tor1Δ* mutant suşunda *CYCI* transkripsiyonuna etkisi ise daha düşük seviyede gerçekleşti ve yaklaşık 3-kat azaldığı bulundu. Bu sonuçlar da *CYCI* geni transkripsiyonunda apoptoz sinyaline yanıt olarak önemli seviyede baskılama olduğu ve bu baskılamada direkt veya dolaylı olarak Tor1p kinazın da etkisi olduğu görüldü (Çizelge 4.2)

Çizelge 4.2. Apoptoz sinyali aktivasyonunun *CYCI* geninin ekspresyonuna etkisi

Maya suşları	Normal Ortam	60 mM Asetik Asit
Yaban tip (YST124)	172 ± 11	24 ± 2
Tor Mutantı (YST155)	259 ± 1	88 ± 9

4.3. Apoptozun *SUC2* Geninin Transkripsiyonuna Etkisi

Apoptoz sinyali aktivasyonunun *SUC2* geni transkripsiyonuna etkileri de incelendi. *SUC2* geni glukoz baskılaması ile kontrol edildiğinden *SUC2-lacZ* gen füzyonunu içeren transformant maya suşları derepres şartları oluşturmak için % 2 galaktoz içeren minimal ortamda üretildi. Apoptoz sinyali aktivasyonunun *SUC2* geni transkripsiyonunda yaklaşık 10 kat kadar baskılamaya neden olduğu bulundu (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Apoptoz sinyali aktivasyonunun *SUC2* geninin ekspresyonuna etkisi

Maya Suşu ve üreme ortamı durumu	Normal Ortam	60 mM Asetik Asit
Yaban tip (YST124) - Derepress	1227 ± 71	13 ± 3

4.4. Otofajinin *GPD1* Geninin Transkripsiyonlarına Etkisi

Otofaji sinyali de farklı şekillerde uyarılmaktadır ve hücrede genel olarak protein degradasyonuna neden olan bir süreçtir. Genel otofaji durumu amino asit açlığı ile uyarılabildiği gibi Tor1p kinaz inhibitörü olan kafein ile de uyarılmaktadır. Araştırmamızda otofaji sinyalinin aktivasyonu için Tor1p kinaz inhibitörü olan kafein kullanıldı. Otofaji aktivasyonunun *GPD1* transkripsiyonuna etkileri yaban tip maya suşunda ve bu genin kontrolünde işlevi olduğu gösterilen *HOG1* mutant suşunda (*hog1Δ*) incelendi. Ayrıca otofaji sinyalinde hedef olan Tor1p kinaz mutant suşunda (*tor1Δ*) da *GPD1* transkripsiyonuna otofaji etkileri incelendi (Çizelge 4.4). Otofaji aktivasyonunun yaban tip maya suşunda *GPD1* transkripsiyonunda yaklaşık %25 kadar baskılamaya yol açtığı görüldü. *tor1Δ* mutant suşunda ise otofaji aktivasyonunun *GPD1* transkripsiyonuna istatikselsel olarak önemli etkisi olmadığı görüldü (Çizelge 4.4). Ancak, kafein ile aktive edilen otofaji sinyalinin *hog1Δ* mutant suşunda *GPD1* transkripsiyonunda önemli derecede (yaklaşık %50 kadar) aktivasyona neden olduğu bulundu. Bu durum *GPD1* geni transkripsiyonunda otofaji koşullarında Hog1 kinazın da etkilendiğini göstermektedir.

Çizelge 4.4. Otofaji aktivasyonunun *GPD1* geninin ekspresyonuna etkisi

Maya suşları	Normal Ortam	8 mM Kafein
Yaban tip (YST124)	2081 ± 113	1720 ± 2
Hog Mutantı (YST240)	824 ± 50	1326 ± 24
Tor Mutantı (YST155)	2074 ± 1	2258 ± 92

4.5. Otofajinin *CYCI* Geninin Transkripsiyonlarına Etkisi

Otofajinin *CYCI* geni transkripsiyonuna etkileri incelendiğinde yaban tip suşta kafein ile uyarılan otofajinin *CYCI* transkripsiyonuna hiçbir etkisi olmadığı görüldü (Çizelge 4.5). Otofaji sinyalinde hedef kinaz olan Tor1p mutant suşunda ise otofajinin *CYCI* transkripsiyonunda baskılanmaya neden olduğu bulundu. Otofaji aktivasyonu ile *CYCI* transkripsiyonu 259 üniteden 159 üniteye azaldı. Benzer şekilde hog1Δ mutant suşunda da *CYCI* transkripsiyonunun otofaji uyarımı ile azaldığı (198 üniteden 131 üniteye) görüldü (Çizelge 4.5). Bu durum otofaji koşullarında Hog1p ve Tor1p'nin yaban tip suşta *CYCI* transkripsiyonunun kontrol edilmesinde işlevleri olabileceğini göstermektedir. Çünkü yaban tip suşta hem Hog1p ve hemde Tor1p işlevsel olarak bulunduğu otofajinin etkisi görülmemektedir.

Çizelge 4.5. Farklı suşlarda otofajinin *CYCI* geninin ekspresyonuna etkisi

Maya suşları	Normal Ortam	8 mM Kafein
Yaban tip (YST124)	172 ± 11	178 ± 5
Hog Mutantı (YST240)	198 ± 4	131 ± 4
Tor Mutantı (YST155)	259 +/- 1	159 +/- 0

4.6. Otofajinin *SUC2* Geninin Transkripsiyonlarına Etkisi

Otofaji koşullarının *SUC2* geni transkripsiyonuna etkileri derepres koşullarda üretilen yaban tip maya suşunda incelendi. Derepres koşullarda 1227 ünite olan *SUC2* geni transkripsiyon seviyesi kafein ile uyarılan otofaji koşullarında yaklaşık 2.5-kat baskılanarak 488 üniteye azaldı (Çizelge 4.6). Bu durum periplazmik alana salgılanan invertaz enzimi transkripsiyonunun otofaji aktivasyonu ile baskılandığını göstermektedir.

Çizelge 4.6. Otofajinin *SUC2* geninin ekspresyonuna etkisi

Maya Suşu ve üreme ortamı durumu	Normal Ortam	8mM Kafein
Yaban tip (YST124) - Derepres	1227 ± 71	488 ± 50

4.7. Retrogradın *GPD1*, *CYC1*, *SUC2* Genlerinin Transkripsiyonlarına Etkisi

Retrograd sinyal yolunun *GPD1*, *CYC1* ve *SUC2* genlerine etkisi biyoinformatik olarak incelendi. Retrograd sinyal yolu ile oluşturulan cevaplar, Rtg1/3p kompleksinin RTG hedef genleri olan *CIT2*, *IDH1/2*, *ATO3* promotorlarına bağlanıp cevap oluşturması ile ilgilidir. Rtg1p ve Rtg3p nükleusa girmeden önce heterodimer oluştururlar ve bu kompleksin ilgili genlere bağlandığı dizi, GTCAC veya GGTAC dizisi olup R-box (R-kutusu) olarak adlandırılır. Tez çalışmasının bu bölümünde SGD de verilen promotor sekans bilgileri kullanılarak *GPD1*, *CYC1* ve *SUC2* genleri promotor bölgelerinin 1 Kb'lik bölgelerinde R kutusu sekanslarının (GTCAC veya GGTAC dizisi) bulunup bulunmadığı incelendi (Anonim 2020a). İncelememizde YEASTRACT veri tabanı bilgileri de kullanıldı (Anonim 2020b). Elde edilen sonuçlar ayrı ayrı aşağıdaki çizelgelerde sırasıyla verildi (Şekil 4.1) (Şekil 4.2) (Şekil 4.3). Yapılan analizlerde *GPD1*, *SUC2* ve *CYC1* promotorlarında R-kutusu benzer sekanslar olduğu görüldü. Özellikle *SUC2* geni promotor bölgesinde Rtg1/3p kompleksinin bağlantığı tam sekansdan iki adet olduğu görülmektedir (Şekil 4.3). Bu sonuçlar *GPD1*, *CYC1* ve *SUC2* genlerinin retrograd transkripsiyona yanıt olarak Rtg1-Rtg3 heterodimer kompleksi tarafından kontrol edilebileceğini göstermektedir. Ancak bunun için daha fazla moleküler analize (örneğin Rg1, Rtg3 mutant suşu veya promotor delesyonları gibi) ihtiyaç olduğunda görülmektedir.

AGCCCGAAAGAGTTATCGTTACTCCGATTATTTTGTACAGCTGATGGGAC
 CTTGCCGTCTTCATTTTTTTTTTTTTTCACCTATAGAGCCGGGCAGAGCTGC
 CCGGCTTAACTAAGGGCCGGAAAAAAACGGAAAAAAGAAAGCCAAGC
 GTGTAGACGTAGTATAACAGTATATCTGACACGCACGTGATGACCACGTA
 ATCGCATCGCCCCTCACCTCTCACCTCTCACCGCTGACTCAGCTTCACTAA
 AAAGGAAAATATATACTCTTTCCCAGGCAAGGTGACAGCGGTCCCCGTCT
 CCTCCACAAAGGCCTCTCCTGGGGTTTGAGCAAGTCTAAGTTTACGTAGC
 ATAAAAATTCTCGGATTGCGTCAAATAATAAAAAAAGTAACCCCACTTCT
 ACTTCTACATCGGAAAAACATTCCATTACATATCGTCTTTGGCCTATCTT
 GTTTTGTCCTCGGTAGATCAGGTCAGTAAACGCAACACGAAAGAACAA
 AAAAAGAAGAAAACAGAAGGCCAAGACAGGGTCAATGAGACTGTTGTCC
 TCCTACTGTCCCTATGTCTCTGGCCGATCACGCGCCATTGTCCCTCAGAAA
 CAAATCAAACACCCACACCCCGGGCACCCAAAGTCCCCACCCACACCACC
 AATACGTAAACGGGGCGCCCCCTGCAGGCCCTCCTGCGCGCGGCCTCCCG
 CCTTGCTTCTCTCCCCTTCCTTTTCTTTTCCAGTTTCCCTATTTTGTCCCT
 TTTTCCGCACAACAAGTATCAGAATGGGTTTCATCAAATCTATCCAACCTA
 ATTCGCACGTAGACTGGCTTGGTATTGGCAGTTTCGTAGTTATATATATAC
 TACCATGAGTGAAACTGTTACGTTACCTTAAATTCTTTCTCCCTTTAATTTT
 CTTTTATCTTACTCTCCTACATAAGACATCAAGAAACAATTGTATATTGTA
 CACCCCCCCCCTCCACAAACACAAATATTGATAATATAAAG

Şekil 4.1. *GPD1* geni 1 Kbp promotor bölgesinde Rtg1/3p bağlanma sekanslarının incelenmesi

GAGGCACCAGCGTCAGCATTTTCAAAGGTGTGTTCTTCGTCAGACATGTTTTAGT
 GTGTGAATGAAATAGGTGTATGTTTTCTTTTTGCTAGACAATAATTAGGAACAAG
 GTAAGGGAACTAAAGTGTAGAATAAGATTAAGAAAGAAACAAGTTGAAAAG
 GCAAGTTGAAATTTCAAGAAAAAAGTCAATTGAAAGTAAATTGACCTGAA
 TATATCTGAGTTCCGACAACAATGAGTTTACCAAAGAGAACAATGGAATAGGAA
 ACTTTGAACGAAGAAAGGAAAGCAGGAAAGGAAAAAATTTTTAGGCTCGAGAA
 CAATAGGGCGAAAAAACAGGCAACGAACGAACAATGGAAAAACGAAAAA
 AAAAAAACACAGAAAAGAATGCAGAAAGATGTCAACTGAAAAAAGGT
 GAACACAGGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGAGGACGAAACAAA
 AAAGTAAAAAATGAAAATTTTTTGAAAACCAAGAAATGAATTATATTTT
 CGTGTGAGACGACATCGTCGAATATGATTCAGGGTAACAGTATTGATGTAATCAA
 TTCCTACCTGAATCTAAAATTCCCGGGAGCAAGATCAAGATGTTTCACCGATC
 TTCGGTCTCTTTGGCCGGGTTTACGGACGATGGCAGAAGACCAAAGCGCCAG
 TTCATTTGGCGAGCGTTGGTTGGTGGATCAAGCCACGCGTAGGCAATCCTCGAG
 CAGATCCGCCAGGCGTGTATATATAGCGTGGATGGCCAGGCAACTTTAGTGCTGA
 CACATACAGGCATATATATATGTGTGCGACGACACATGATCATATGGCATGCATG
 TGCTCTGTATGTATATAAACTCTTGTTTTCTTTCTTCTAAATATTCTTTCCTT
 ATACATTAGGACCTTGCAGCATAAATTACTATACTTCTATAGACACACAAACAC
 AAATACACACACTAAATTAATA

Şekil 4.2. *CYCI* geni 1 Kbp promotor bölgesinde Rtg1/3p bağlanma sekanslarının incelenmesi

ATAGTAAAAAAAAAACTAAGTTTTCCCCTGTAGTAAACAGGGAGATACCGTACG
GAGGTCTGAATTCCCTACAGAAGTAGCTGTAAAAATTCAGAATTCGCAACAACCT
ATAATTGAGTTAAGTGCCTTTCCAAGCTAAAAAGTTTGAGGTTATAGGGGCTTAG
CATCCACACGTCACAAATCTCGGGTATCGAGTATAGTATGTAGAATTACGGCAGGA
GGTTTCCCAATGAACAAAGGACAGGGGCACGGTGAGCTGTCTGAAGGTATCCATT
TTATCATGTTTCGTTTGTACAAGCACGACATACTAAGACATTTACCGTATGGGAG
TTGTTGTCCTAGCGTAGTTCTCGCTCCCCCAGCAAAGCTCAAAAAAGTACGTCAT
TTAGAATAGTTTGTGAGCAAATTACCAGTCGGTATGCTACGTTAGAAAGGCCAC
AGTATTCTTCTACCAAAGGCGTGCCTTTGTTGAACTCGATCCATTATGAGGGCTTC
CATTATCCCCGCATTTTTATTACTCTGAACAGGAATAAAAAGAAAAAACCCAGT
TTAGGAAATTATCCGGGGGCGAAGAAATACGCGTAGCGTTAATCGACCCACGT
CCAGGGTTTTTCCATGGAGGTTTCTGGAAAACTGACGAGGAATGTGATTATAAA
TCCCTTTATGTGATGTCTAAGACTTTTAAAGTACGCCCGATGTTTGCCTATTACCA
TCATAGAGACGTTTCTTTTCGAGGAATGCTTAAACGACTTTGTTTGACAAAAATG
TTGCCTAAGGGCTCTATAGTAAACCATTTGGAAGAAAGATTTGACGACTTTTTTT
TTTTGGATTTTCGATCCTATAATCCTTCCTCCTGAAAAGAAACATATAAATAGATA
TGTATTATTCTTCAAACATTCTCTTGTCTTGTGCTTTTTTTTTTACCATATATCTT
ACTTTTTTTTTTCTCTCAGAGAAACAAGCAAAACAAAAAGCTTTTCTTTTCACTAA
CGTATATG

Şekil 4.3. *SUC2* geni 1 Kbp promotor bölgesinde Rtg1/3p bağlanma sekanslarının incelenmesi.

4.8. Farklı Suşlarda ve Koşullarda İnvertz Aktivitesi

Araştırmamızın bu bölümünde apoptoz ve otofaji sinyallerinin invertz sekresyonuna etkilerinin olup olmadığı incelendi. Bunun için yaban tip ve tor1Δ mutant suşunda apoptoz ve otofaji uyarılarak invertz aktiviteleri tayin edildi ve normal yaban tip suş ile karşılaştırıldı. İnvertz aktivitesinin hem apoptoz ve hem de otofaji koşullarına bağlı olarak önemli derecede azaldığı görüldü (Çizelge 4.10). Derepres koşullarda yaklaşık olarak 250 ünite olarak ölçülen invertz aktivitesinin apoptoz aktivasyonu ile yaklaşık olarak 35-kat kadar baskılandığını görüldü. Otofaji koşullarında ise yaban tip maya suşunda yaklaşık 2-kat baskılanan invertz aktivitesinin tor1Δ suşunda 4-kat kadar baskılandığı bulundu (Çizelge 4.10). Bu durum apoptoz ve otofaji aktivasyonuna bağlı olarak protein sekresyonunun da baskılandığını öne sürmektedir.

Çizelge 4.7. Apoptoz ve otofaji sinyallerinin invertz aktivitesine etkisi.

Maya Suşları	Repress	Derepres	Derepress + 60 mM Asetik Asit	Derepress + 8 mM Kafein
Yaban tip (YST124)	1	252,93	7,93	124,19
Tor Mutantı (YST155)	0,86	236,16	6,94	60,58

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Apoptoz çok hücreli organizmalara özgü bir hücrel mekanizma olarak tanımlanmasına rağmen *S. cerevisiae* hücrelerinde de apoptozun gerçekleştiği ve özellikle maya kolonilerinin hayatta kalma stratejilerinden birisi olduğu daha önce yapılan araştırmalar ile gösterilmiştir (Madeo ve ark. 2002, Carmona-Gutierrez ve ark. 2010). Çok hücreli ökaryotlarda apoptoz sürecinin gerçekleşmesi için gerekli olan faktörlerin birçoğunun *S. cerevisiae*'daki işlevsel homologları da bu maya türünde keşfedilerek tanımlanmıştır (Strich 2015).

GPD1, *CYC1* ve *SUC2* genleri *S. cerevisiae*'nin farklı metabolik işlevlerinde gerekli olan faktörleri kodlamaktadırlar. *GPD1* geni tarafından kodlanan NAD'a bağlı gliserol-3-fosfat dehidrojenaz enzimi reaksiyonunda hücrede sitoplazmik NADH/NAD dengesinin korunmasına katkı sağlanır. Ayrıca, bu reaksiyon sonunda oluşan gliserol 3 fosfat daha sonra sitoplazmik gliserole dönüştürülerek osmotik denge sağlanır (Albertyn ve ark. 1994). Araştırmamızda apoptoz sürecinin asetik asit ile indüklenmesi sonucu *GPD1* transkripsiyonunda 4-kat kadar azalma olduğu bulundu. Apoptoz uyarımına bağlı bu baskılanmanın kısmen TOR kinaz yolağına bağlı olduğu da görüldü. Aktif Tor1p kinaz içermeyen mutants suşta *GPD1* transkripsiyonundaki baskılanma yaban tip suşa göre daha az seviyede gerçekleşmektedir. Hog1p kinaz *GPD1* geni transkripsiyonunun aktivasyonu için gereklidir. Ancak, apoptoz koşullarında *GPD1* transkripsiyonunun *hog1Δ* mutant suşunda da yaban tip suşa olduğu gibi yaklaşık 4-kat kadar azaldığı bulundu. Bu durum apoptoz koşullarında hücrede NADH/NAD dengesinde de düzenleme olabileceği ve gliserol sentezinin kısmen de olsa baskılanmış olabileceğini öne sürmektedir. Fakat bunun kesin tayini için *GPD1* transkripsiyonuna ek olarak apoptoz koşullarında *S. cerevisiae*'da metabolom analizinin yapılmasını da gerekli kılmaktadır. *GPD1* geni transkripsiyonu birçok faktör tarafından kontrol edilmektedir ve bu faktörlerden bazıları da (Rap1p, Rpd3p gibi) represördür (Şekil 2.8). Apoptoz koşullarında aktive edilen represörün *GPD1* transkripsiyonunu baskıladığı düşünülmektedir. Bu faktörlerden birisi de Rpd3p olup apoptozda işlevleri olduğu da rapor edilmiştir (Anonim 2020a). *S. cerevisiae* genlerinin transkripsiyonlarının kontrolünde yer alan düzenleyici faktörler günümüze kadar yapılan in-vivo ve in-siliko

çalışmalardan derlenerek YEASTRACT veritabanında sağlanmıştır (Anonim 2020b). Bu tez çalışmasında incelenen genlerin kontrolünde işlevi olan transkripsiyon faktörlerinin tayin edilmesinde de YEASTRACT veritabanını sıklıkla kullanılmıştır.

CYCI geni *S. cerevisiae*'da çok fonksiyonlu bir protein kodlar. Bu genden kodlanan peptid "Cytochrome C, isoform 1" veya "İso-1-Cytochrome C" olarak adlandırılmıştır ve hem mitokondride elektron taşınımında hem de apoptoz koşullarında mitokondriden sitoplazmaya geğerek apoptozun kaspazlar aracılığı ile aktivasyonunda işlevi vardır (Dumont ve ark. 1991, Sherman 2005, Sharonov ve ark. 2005). Araştırmamızda apoptoz aktivasyonu ile *CYCI* geni transkripsiyonunun da önemli seviyede baskılandığı bulundu (Çizlege 4.2). *GPD1* genine benzer şekilde *CYCI* geni transkripsiyonunun apoptozda baskılanmasında Tor1p'nin de kısmen işlevi olduğu görüldü. Ancak apoptoz aktivasyonunda işlevi olan Cyc1p'nin apoptoz koşullarında transkripsiyonunun güçlü bir şekilde baskılanmasının protein seviyesinde de olduğunun gösterilmesi gerekir. Apoptoz koşulları aktive edildiğinde mitokondri işlevinin hızlı baskılanması için *CYCI* geni transkripsiyonu baskılanmış olabilir. Mitokondride normal koşullarda bulunan ve depo edilen Cyc1p ise apoptozun aktivasyonu için yeterli olabilir. Apoptoz koşullarının *CYCI* transkripsiyonuna etkileri daha önce de laboratuvarımızda yapılan bir tez çalışmasında incelenmiştir. Bu çalışmada apoptoz koşulları salisilik asit ile indüklenmiştir ve *CYCI* geni transkripsiyonunun tamamen baskılandığı gösterilmiştir (Keskin 2018). Bu çalışma elde edilen sonuçlarımızı teyid etmekle birlikte salisilik asitin apoptoz koşullarının indüklenmesinde asetik asite göre daha etkin olduğunu da göstermektedir.

SUC2 geni transkripsiyonunda apoptoz koşullarında yaklaşık 10-kat kadar baskılanma olduğu görülmektedir (Çizelge 4.3). *SUC2* metabolik bir enzim olan invertaz enzimigeni transkripsiyonunda ni kodlamaktadır ve bu enzimin apoptoz koşulları ile bağlantısı yoktur. *SUC2* genindeki baskılanma yine apoptoz koşullarında aktive edilen Rpd3p gibi represörlerin aktivasyonu ve *SUC2* transkripsiyonunu baskılaması ile açıklanabilir. YEASTRACT kayıtlarında *SUC2* geni transkripsiyonu kontrol eden çok sayıda transkripsiyon faktörleri rapor edilmiştir. Bu faktörlerden bazılarının da represör kodlayan kromatin modifiye edici faktörler (Nrg1p vd gibi) ve represör faktörler (Rap1p, Mig1p vd gibi) olduğu görülmektedir (Anonim 2020b). Aktive edilen Apoptoz

koşullarında invertaz aktivitesinin de önemli derecede azaldığı bulundu. Bu durum apoptoz koşullarında invertaz biyosentezinin ve periplazmik alana invertaz sekresyonunun da baskılandığını göstermiştir.

Otofaji de hücrel metabolizmanın korunması için gerekli bir süreç olup otofajinin moleküler mekanizmaları *S. cerevisiae*'de keşfedilmiştir (Suzuki ve ark. 2002, 2010, 2011). Otofaji koşulları apoptozdan farklı olarak hücrenin parçalanması ile sonuçlanmaz. Otofaji aktivasyonu ile stres koşullarında bazı makromoleküllerin parçalanarak yeniden hücre içinde kullanımı, yanlış katlanmış proteinlerin tekrar amino asit kaynağı olarak kullanımını ve hasarlı organellerin de degradasyonu sağlanır. Otofaji koşulları çeşitli şekillerde aktive edilir. Hücreleri uzun süreli olarak aç bırakmak veya Tor1 kinazı inhibe etmek genel otofajiyi aktive eden işlemlerden bazılarıdır (Klionsky ve Emr 2000). *S. cerevisiae* hücrelerini uzun süreli açlığa bırakmak (72 -96 saat kadar) otofajiyi aktive etmekle birlikte araştırmamızda kullanılan plazmit vektörlerinin maya hücrelerinde kopya sayısında da değişime neden olabilir. Bu nedenle araştırmamızda *S. cerevisiae* hücrelerinde otofajiyi aktive etmek için uzun süreli açlık yerine Tor1p kinaz inhibitörü olan kafein kullanıldı (Rallis ve ark. 2013). Logaritmik aşamada bulunan *S. cerevisiae* hücrelerinde kafein uygulanması ile uyarılan otofaji sinyali ile *GPD1*, *CYC1* ve *SUC2* genleri ekspresyonu ve invertaz sentezi ve sekresyonunda apoptozdan farklı bir düzenlenme olduğu bulundu. Otofaji indüklenmiş koşullarda yaban tip maya suşunda *GPD1* geni transkripsiyonunda düşük seviyede (yaklaşık % 25 kadar) azalma olduğu, *CYC1* geni transkripsiyonunda otofaji aktivasyonu ile değişiklik olmadığı ve *SUC2* geninde transkripsiyonun 3-kat kadar azaldığı bulundu. TOR1 mutant suşunda ise otofaji aktivasyonu ile *GPD1* transkripsiyonunda hiçbir değişiklik olmadığı görüldü. Bu durum kafein uygulamasının veya uygulama süresinin Tor1p aktivitesini tümüyle bloke etmek için yeterli olmadığını da göstermektedir. Çünkü Tor1p'nin hiç bulunmadığı mutant suşta *GPD1* transkripsiyonu kafein ile inkübasyondan hiç etkilenmemektedir. Diğer taraftan *GPD1* transkripsiyonu için gerekli olan Hog1p kinazın da normal koşullarda *GPD1* transkripsiyonu için gerekli olmasına rağmen (çünkü yaban tip suşta 2081 ünite olan transkripsiyon mutantda 824'e düşmektedir) otofaji koşullarında gerekli olmadığını ve otofaji aktivasyonu ile hog1Δ mutant suşta transkripsiyonun %60 kadar aktive edildiği

bulundu. Ancak mutant sušta otofaji koşullarında *GPD1* transkripsiyonun yaban tip suştan daha düşük seviyede gerçekleştiği de görülmektedir.

Otofaji koşullarında *CYCI* geni transkripsiyonuna Tor1p ve Hog1p kinazların da farklı şekilde etkilediği görülmektedir. Yaban tip sušta otofaji aktivasyonundan etkilenmeyen *CYCI* transkripsiyonunun hem hog1 ve hem de Tor1 mutant sušta yaklaşık %35 kadar azaldığı görülmektedir. Bu durum kafeinin oluşturduğu fizyolojik stresin farklı faktörlere de etki ederek *CYCI* ve *GPD1* transkripsiyonlarına farklı yönlerde etki ettiğini göstermektedir.

Retrograd regülasyon bütün ökaryotlarda görülen ve oragenler ile nükleus arasında genetik koordinasyon sağlayan bir kontrol mekanizmasıdır. Retrograd regülasyon hedef genlerde transkripsiyonel kontrol ile sağlanır. Bu transkripsiyon faktörleri ise heterodimer olarak hedef promotorlara bağlanan Rtg1/Rtg3 kompleksidir (Jia ve ark. 1997, Liao ve Butow 1993). Bu transkripsiyon faktörü kompleksinin hedef genlerdeki bağlanma dizileri (R kutusu sekansları: GTCAC veya GGTAC dizisi) hem in-vivo ve hem de in-siliko yöntemler ile belirlenmiştir ve YEASTRACT veritabanında sağlanmaktadır (Anonim 2020b). R kutusu sekanslarının araştırmamızda kullanılan *GPD1*, *CYCI* ve *SUC2* genleri promotor dizilerinde bulunup bulunmadıkları da YEASTRACT kayıtları incelenerek tayin edildi. Elde edilen analiz sonuçları her 3 gende de çok sayıda R-kutusu sekansı bulunduğunu göstermektedir. Ancak, SGD ve YEASTRACT kayıtlarında yapılan incelemede henüz bu genlerin Rtg1/Rtg3 kompleksi tarafından kontrol edildiğine yönelik kayıtlara rastlanmamıştır (Anonim 2020a, Anonim 2020b). Bu durumda ilgili genlerin promotor bölgelerinde belirlenen R-kutusu sekanslarının işlevsel olduğunun da yapılacak sekans delesyonu ile in-vivo olarak teyid edilmesine ihtiyaç vardır. Bu sekansların işlevsel olduğu saflaştırılacak Rtg1/Rtg3 kompleksi faktörleri kullanılarak yapılacak EMSA (elektroforetik mobility shift assay) veya DNazI footprint çalışmaları ile in vitro olarak da test edilebilir. Ancak bu çalışmalar bu aşamada tez önerimizin amaçları dışındadır.

GPD1, *CYCI* ve *SUC2* genleri *S. cerevisiae*'da önemli metabolik işlevleri olan genlerdir. Bu genlerin apoptoz ve otofaji koşullarında transkripsiyonel kontrol mekanizmalarının

farklı şekillerde etkilendiği bu tez çalışmasında gösterilmiştir. Ayrıca bu genlerde transkripsiyonun retrograd kontrol altında olabileceğine ilişkin de ilk bulgular elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Aguilera, J., Prieto, J.A. 2004.** Yeast cells display a regulatory mechanism in response to methylglyoxal. *FEMS Yeast Res.*, 4: 633–641.
- Ahn, S.H., Henderson, K.A., Keeney, S., Allis, C.D. 2005.** H2B (Ser10) phosphorylation is induced during apoptosis and meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell Cycle*, 4: 780–783.
- Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J.M., Prior, B.A. 1994.** *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell. Biol.*, 14: 4135–4144.
- Almeida, B., Silva, A., Mesquita, A., Sampaio-Marques, B., Rodrigues, F., Ludovico, P. 2008.** Drug-induced apoptosis in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, 1783: 1436–1448.
- Anonim, 2020a.** *Saccharomyces cerevisiae* Genome Database (SGD). <https://www.yeastgenome.org/>-(Erişim tarihi: 06 Temmuz, 2020).
- Anonim, 2020b.** YEASTRACT (Yeast Search for Transcriptional Regulators and Consensus Tracking). <http://www.yeasttract.com/>-(Erişim tarihi: 06 Temmuz, 2020).
- Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J.M., Adler, L. 1997.** The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J.*, 16: 2179–2187.
- Aoki, Y., Kanki, T., Hirota, Y., Kurihara, ve ark. 2011.** Phosphorylation of Serine 114 on Atg32 mediates mitophagy. *Mol. Biol. Cell*, 22: 3206–3217.
- Baba, M., Osumi, M., Scott, S.V., Klionsky, D.J., Ohsumi, Y. 1997.** Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J. Cell Biol.*, 139: 1687–1695.
- Beck, T., Hall, M.N. 1999.** The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature*, 402: 689–692.
- Bernales, S., McDonald, K.L., Walter, P. 2006.** Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol.*, 4, E423.
- Bernales, S., Schuck, S., Walter, P. 2007.** ER-phagy: selective autophagy of the endoplasmic reticulum. *Autophagy*, 3: 285–287.
- Björkqvist, S., Ansell, R., Adler, L., Liden, G. 1997.** Physiological response to anaerobicity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:128–132.

Boss, J.M., Darrow, M.D., Zitomer, R.S. 1980. Characterization of yeast iso-1-cytochrome c mRNA. *J. Biol. Chem.*, 255: 8623–8628.

Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., Boeke, J.D. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a Useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, 14: 115–132.

Brown, E.J. 1995. Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature*, 377:441–446.

Blommaart, E.F., Luiken, J.J., Blommaart, P.J., van Woerkom, G.M., Meijer, A.J. 1995. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 270: 2320-2326.

Bork, P., Sander, C., Valencia, A. 1992. An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 7290–7294.

Buttner, S., Eisenberg, T., Carmona-Gutierrez, D., Ruli, D., Knauer, H., Ruckenstein, C., et al. 2007. Endonuclease G regulates budding yeast life and death. *Mol. Cell*, 25: 233–246.

Carlson, M. Botstein, D. 1982. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted with intracellular forms of yeast invertase. *Cell*, 28: 145–154.

Carlson, M., Taussig, R., Kustu, S., Botstein, D. 1983. The secreted form of invertase in *Saccharomyces cerevisiae* is synthesized from mRNA encoding a signal sequence. *Mol. Cell. Biol.*, 3: 439–447.

Carlson, M., Botstein, D. 1983. Organization of the SUC gene family in *Saccharomyces*. *Mol. Cell. Biol.*, 3: 351–359.

Carlson, M., Celenza, J.L., Eng, F.J. 1985. Evolution of the dispersed SUC gene family of *Saccharomyces* by rearrangements of chromosome telomeres. *Mol. Cell. Biol.*, 5: 2894–2902.

Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Büttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G., Madeo, F. 2010. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death & Differentiation*, 17: 763–773.

Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F. 2009. Tracing the roots of death: apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Dong Z, Yin X-M (eds). *Essentials of Apoptosis – A Guide for Basic and Clinical Research*. Humana Press, 2009, pp 325–354.

- Chelstowska, A., Butow, R.A. 1995.** RTG genes in yeast that function in communication between mitochondria and the nucleus are also required for expression of genes encoding peroxisomal proteins. *J. Biol. Chem.*, 270: 18141–18146.
- Chelstowska, A., Liu, Z., Jia, Y., Amberg, D., Butow, R.A. 1999.** Signalling between mitochondria and the nucleus regulates the expression of a new D-lactate dehydrogenase activity in yeast. *Yeast*, 15:1377–1391.
- Cherry, J.M., Hong, E.L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., et al. 2012.** Saccharomyces genome database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Res.*, 40: 700–705.
- Chen, E.J., Kaiser, C.A. 2003.** LST8 negatively regulates amino acid biosynthesis as a component of the TOR pathway. *J. Cell Biol.*, 161:333–47.
- Chen, X.J., Wang, X., Kaufman, B.A., Butow, R.A. 2005.** Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science*, 307:714–717.
- Conrad-Webb, H., Butow, R.A. 1995.** A polymerase switch in the synthesis of rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 15:2420–2428.
- Cullen, P.J., Sprague, G.F. 2012.** The regulation of filamentous growth in yeast. *Genetics*, 190: 23–49.
- Darsow, T., Rieder, S.E., Emr, S.D. 1997.** A multispecificity syntaxin homologue, Vam3p, essential for autophagic and biosynthetic protein transport to the vacuole. *J. Cell Biol.*, 138: 517–529.
- Dilova, I., Aronova, S., Chen, J.C., Powers, T. 2004.** Tor signaling and nutrient-based signals converge on Mks1p phosphorylation to regulate expression of Rtg1.Rtg3p-dependent target genes. *J. Biol. Chem.*, 279: 46527–46535.
- Duina, A.A., Miller, M.E., Keeney, J.B. 2014.** Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*, 197: 33–48.
- Dumont, M.E., Cardillo, T.S., Hayes, M.K., Sherman, F. 1991.** Role of cytochrome c heme lyase in mitochondrial import and accumulation of cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 11: 5487–5496.
- Dunn, W.A., Jr. 1990.** Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol.*, 110: 1923–1933.
- Dunn, W.A., Jr. 1994.** Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.*, 4: 139–43.
- Easlon, E., Tsang, F., Skinner, C., Wang, C., Lin, S.J. 2008.** The malate-aspartate NADH shuttle components are novel metabolic longevity regulators required for calorie restriction-mediated life span extension in yeast. *Genes Dev.*, 22: 931–944.

- Epstein, C.B., Waddle, J.A., Hale, W. IV., Davé, V., Thornton, J., ve ark. 2001.** Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Mol. Biol. Cell.*, 12: 297–308.
- Fabrizio, P., Battistella, L., Vardavas, R., Gattazzo, C., Liou, L.L., Diaspro, A., et al. 2004.** Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, 166: 1055–1067.
- Fahrenkrog, B., Sauder, U., Aebi, U. 2004.** The *S. cerevisiae* HtrA-like protein Nma111p is a nuclear serine protease that mediates yeast apoptosis. *J. Cell Sci.*, 117: 115–126.
- Fannjiang, Y., Cheng, W.C., Lee, S.J., Qi, B., Pevsner, J., McCaffery, J.M., et al. 2004.** Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. *Genes Dev.*, 18: 2785–2797.
- Feldmann, H. 2012.** Yeast, Molecular and Cell Biology, Second Editin, Wiley-VCH Verlag & Co. Weinheim, Germany.
- Forsburg, S.L., Guarente, L. 1989.** Identification and characterization of HAP4: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. *Genes Dev.*, 3: 1166–1178.
- Gascon, S., Neumann, N.P., Lampen, J.O. 1968.** Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast. *J. Biol. Chem.*, 243: 1573–1577.
- Gelperin, D., Weigle, J., Nelson, K., Roseboom, P., Irie, K., ve ark. 1995.** 14-3-3 proteins: potential roles in vesicular transport and Ras signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 11539–11543.
- Goffeau, A., Barrel, B.G., Bussey, H., Dawis, ve ark. 1996.** Life with 6000 genes. *Science*, 274: 546–567.
- Goldstein, A., Lampen, J.O. 1975.** β -D-Fructofuranoside Fructohydrolase from yeast. *Methods Enzymol.*, 42: 504–511.
- Guarente, L., Mason, T. 1983.** Heme regulates transcription of the *CYCI* gene of *S. Cerevisiae* via an upstream activation site. *Cell*, 32: 1279–1286.
- Guarente, L., Lalonde, B., Gifford, P., Alani, E. 1984.** Distinctly regulated tandem upstream activation sites mediate catabolite repression of the *CYCI* gene of *S. cerevisiae*. *Cell*, 36: 503–511.
- Guthrie, C., Fink, G.R. 1991.** Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol.*, 194: 1–932.
- Hamasaki, M., Noda, T., Baba, M., Ohsumi, Y. 2005.** Starvation triggers the delivery of the endoplasmic reticulum to the vacuole via autophagy in yeast. *Traffic*, 6: 56–65.

Hauptmann, P., Riel, C., Kunz-Schughart, L.A., Frohlich, K.U., Madeo, F., Lehle, L. 2006. Defects in *N*-glycosylation induce apoptosis in yeast. *Mol. Microbiol.*, 59: 765–778.

Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K.A., Maldener, C., Frohlich, K.U., Wissing, S., ve ark. 2004. Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.*, 164: 501–507.

Hörtner, H., Ammerer, G., Hartter, E., Hamilton, B., ve ark. 1982. Regulation of synthesis of catalases and iso-1-cytochrome *c* in *Saccharomyces cerevisiae* by glucose, oxygen and heme. *Eur. J. Biochem.*, 128: 179–184.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, 153: 163–168.

Jazwinski, S.M. 2013. The retrograde response: When mitochondrial quality control is not enough. *BBA- Mol. Cell Res.*, 1833: 400–409.

Jia, Y., Rothermel, B., Thornton, J., Butow, R.A. 1997. A basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription complex in yeast functions in a signaling pathway from mitochondria to the nucleus. *Mol. Cell Biol.*, 17: 1110–1117.

Jung, S., Marelli, M., Rachubinski, R.A., Goodlett, D.R., Aitchison, J.D. 2010. Dynamic changes in the subcellular distribution of Gpd1p in response to cell stress. *J. Biol. Chem.*, 285: 6739–6749.

Kasai, S., Yamazaki, H., Tanji, K., Engler, ve ark. 2019. Role of the ISR-ATF4 pathway and its cross talk with Nrf2 in mitochondrial quality control. *J Clin Biochem Nutr.*, 64: 1–12.

Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., ve ark. 2000. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.*, 150: 1507–1513.

Kanki, T., Klionsky, D.J. 2008. Mitophagy in yeast occurs through a selective mechanism. *J. Biol. Chem.*, 283: 32386–32393.

Kanki, T., Wang, K., Cao, Y., Baba, M., Klionsky, D.J. 2009. Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Dev. Cell.*, 17: 98–109.

Keskin, C. 2018. Cyc1 geni transkripsiyonuna etki eden apoptotik faktörlerin araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, UÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Bursa.

Kim, J., Dalton, V.M., Eggerton, K.P., Scott, S.V., Klionsky, D.J. 1999. Apg7p/Cvt2p is required for the cytoplasm-to-vacuole targeting, macroautophagy, and peroxisome degradation pathways. *Mol. Biol. Cell*, 10: 1337–1351.

- Kim, J., Klionsky, D.J. 2000.** Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.*, 69: 303–342.
- Kirchman, P.A., Kim, S., Lai, C.Y., Jazwinski, S.M. 1999.** Interorganelle signaling is a determinant of longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 152: 179–190.
- Klionsky, D.J., Emr, S.D. 2000.** Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 290: 1717–1721.
- Klionsky, D.J., Ohsumi, Y. 1999.** Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 15: 1–32.
- Komeili, A., Wedaman, K.P., O'Shea, E.K., Powers, T. 2000.** Mechanism of metabolic control. Target of rapamycin signaling links nitrogen quality to the activity of the Rtg1 and Rtg3 transcription factors. *J. Cell Biol.*, 151: 863–878.
- Koonin, E.V. 1994.** Yeast protein controlling interorganelle communication is related to bacterial phosphatases containing the Hsp 70-type ATP-binding domain. *Trends Biochem. Sci.*, 19: 156–157.
- Laun, P., Pichova, A., Madeo, F., Fuchs, J., Ellinger, A., Kohlwein, S., et al. 2001.** Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol. Microbiol.*, 39: 1166–1173.
- Lee, Y.J., Jeschke, G.R., Roelants, F.M. Thorner, J., Turk, B.E. 2012.** Reciprocal phosphorylation of yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenases in adaptation to distinct types of stress. *Mol. Cell. Biol.*, 32: 4705–4717.
- Liao, X., Butow, R.A. 1993.** RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell*, 72: 61–71.
- Liao, X.S., Small, W.C., Srere, P.A., Butow, R.A. 1991.** Intramitochondrial functions regulate nonmitochondrial citrate synthase (*CIT2*) expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 11: 38–46.
- Lipponen, P., Aaltomaa, S., Kosma, V.M., Syrjänen, K. 1994.** Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur. J. Cancer*, 30A: 2068–2073.
- Liu, Z., Butow, R.A. 1999.** A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 6720–6728.
- Liu, Z., Sekito, T., Epstein, C.B., Butow, R.A. 2001.** RTG-dependent mitochondria to nucleus signaling is negatively regulated by the seven WD-repeat protein Lst8p. *EMBO J.*, 20: 7209–7219.

- Liu, Z., Sekito, T., Spirek, M., Thornton, J., Butow, R.A. 2003.** Retrograde signaling is regulated by the dynamic interaction between Rtg2p and Mks1p. *Mol. Cell*, 12: 401–411.
- Liu, Z., Spirek, M., Thornton, J., Butow, R.A. 2005.** A novel degron-mediated degradation of the RTG pathway regulator, Mks1p, by SCF^{Grr1}. *Mol. Biol. Cell*, 16: 4893–4904.
- Li, W., Sun, L., Liang, Q., Wang, J., Mo, W., Zhou, B. 2006.** Yeast AMID homologue Ndi1p displays respiration-restricted apoptotic activity and is involved in chronological aging. *Mol. Biol. Cell*, 17: 1802–1811.
- Loewith, R., Hall, M.N. 2011.** Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics*, 189: 1177–1201.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., ve ark. 2002.** Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell*, 10: 457–648.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farrand, A.L., Randall, R.J. 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265–275.
- Ludovico, P., Rodrigues, F., Almeida, A., Silva, M.T., Barrientos, A., Corte-Real, M. 2002.** Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, 13: 2598–2606.
- Ludovico, P., Sosuso, M.S., Silva, M.T., Leao, C., Corte-Real, M. 2001.** *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology*, 147: 2409–2415.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., ve ark. 2002.** A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol. Cell*, 9: 911–917.
- Magasanik, B., Kaiser, C.A. 2002.** Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 290: 1–18.
- Massari, M.E., Murre, C. 2000.** Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol. Cell. Biol.*, 20: 429–440.
- Mazzoni, C., Herker, E., Palermo, V., Jungwirth, H., Eisenberg, T., Madeo, F., et al. 2005.** Yeast caspase 1 links messenger RNA stability to apoptosis in yeast. *EMBO Rep.*, 6: 1076–1081.
- Mijaljica, D., Prescott, M., Devenish, R.J. 2006.** Endoplasmic reticulum and Golgi complex: contributions to, and turnover by, autophagy. *Traffic*, 7: 1590–1595.
- Mortimore, G.E., Miotto, G., Venerando, R., Kadowaki, M. 1996.** Autophagy. *Subcell. Biochem.*, 27: 93–135.

- Naumov, G.I., Naumova, E.S. 2010.** Comparative genetics of yeasts: a novel beta-fructosidase gene SUC8 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetika*, 46: 364–372.
- Nevoigt, E., and Stahl, U. 1996.** Reduced pyruvate decarboxylase and increased glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD⁺] levels enhance glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12: 1331–1337.
- Noda, T., Ohsumi, Y. 1998.** Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.*, 273: 3963–3966.
- Oda, M.N., Scott, S.V., Hefner-Gravink, A., Caffarelli, A.D., Klionsky, D.J. 1996.** Identification of a cytoplasm to vacuole targeting determinant in aminopeptidase I. *J. Cell Biol.*, 132: 999–1010.
- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., ve ark. 2006.** Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell. Biol.*, 26: 9220–9231.
- Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., Ohsumi, Y. 2009.** Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev. Cell*, 17: 87–97.
- Olesen, J., Hahn, S., Guarente, L. 1987.** Yeast HAP2 and HAP3 activators both bind to the *CYCI* upstream activation site, UAS2, in an interdependent manner. *Cell*, 51:953–961.
- Olson, M.V. 1991.** Genome structure and organization in *Saccharomyces cerevisiae*: The molecular biology of the yeast *Saccharomyces* genome dynamics, protein synthesis and energetics, Ed: Pringle, J.R., Broach, J.R., Jones, E.W., pp: 1-39.
- Pozniakovsky, A.I., Knorre, D.A., Markova, O.V., Hyman, A.A., Skulachev, V.P., Severin, F.F. 2005.** Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast. *J. Cell Biol.*, 168: 257–269.
- Qiu, J., Yoon, J.H., Shen, B. 2005.** Search for apoptotic nucleases in yeast: role of Tat-D nuclease in apoptotic DNA degradation. *J. Biol. Chem.*, 280: 15370–15379.
- Rallis, C., Codlin, S., and Bähler, J. 2013.** TORC1 signaling inhibition by rapamycin and caffeine affect lifespan, global gene expression, and cell proliferation of fission yeast. *Aging Cell*, 12: 563–573.
- Redza-Dutordoir, M., Averill-Bates, D.A. 2016.** Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *BBA., Mol. Cell Res.*, 1863: 2977–2992.
- Reinke, A., Anderson, S., McCaffery, J.M., Yates, J., ve ark. 2004.** TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 279: 14752–14762.

- Reiter, J., Herker, E., Madeo, F., Schmitt, M.J. 2005.** Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.*, 168: 353–358.
- Rep, M., Reiser, V., Gartner, U., Thevelein, J.M., Hohmann, S., Ammerer, G., Ruis, H. 1999.** Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol. Cell. Biol.*, 19(8): 5474-5485.
- Rieder, S.E., Emr, S.D. 1997.** A novel RING finger protein complex essential for a late step in protein transport to the yeast vacuole. *Mol. Biol. Cell*, 8: 2307–2327.
- Rose, M.D., Winston, F., Heiter, P. 1990.** Methods in Yeast Genetics. A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Rothe, C., Lehle, L. 1998.** Sorting of invertase signal peptide mutants in yeast dependent and independent on the signal-recognition particle. *Eur. J. Biochem.*, 252: 16–24.
- Rothermel, B.A., Thornton, J.L., Butow, R.A. 1997.** Rtg3p, a basic helix-loop-helix/leucine zipper protein that functions in mitochondrial-induced changes in gene expression, contains independent activation domains. *J. Biol. Chem.*, 272: 19801–19807.
- Sato, T.K., Darsow, T., Emr, S.D. 1998.** Vam7p, a SNAP-25-like molecule, and Vam3p, a syntaxin homolog, function together in yeast vacuolar protein trafficking. *Mol. Cell. Biol.*, 18: 5308–5319.
- Seals, D.F., Eitzen, G., Margolis, N., Wickner, W.T., Price, A. 2000.** A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 9402–9407.
- Scott, S.V., Baba, M., Ohsumi, Y., Klionsky, D.J. 1997.** Aminopeptidase I is targeted to the vacuole by a nonclassical vesicular mechanism. *J. Cell Biol.*, 138: 37–44.
- Sekito, T., Liu, Z., Thornton, J., Butow, R.A. 2002.** RTG-dependent mitochondria-to-nucleus signaling is regulated by MKS1 and is linked to formation of yeast prion [URE3]. *Mol. Biol. Cell*, 13: 795–804.
- Sekito, T., Thornton, J., Butow, R.A. 2000.** Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p. *Mol. Biol. Cell*, 11: 2103–2115.
- Severin, F.F., Hyman, A.A. 2002.** Pheromone induces programmed cell death in *S. cerevisiae*. *Curr. Biol.*, 12: R233–R235.
- Shamji, A.F., Kuruvilla, F.G., Schreiber, S.L. 2000.** Partitioning the transcriptional program induced by rapamycin among the effectors of the Tor proteins. *Curr. Biol.*, 10: 1574–1581.

- Sharonov, G.V., Feofanov, A.V., Bocharova, O.V., Astapova, M.V., ve ark. 2005.** Comparative analysis of proapoptotic activity of cytochrome c mutants in living cells. *Apoptosis*, 10: 797–808.
- Sherman, F., Taber, H., Campbell, W. 1965.** Genetic determination of iso-cytochromes c in yeast. *J. Mol. Biol.*, 13: 21–39.
- Sherman, F., Stewart, J.W., Margoliash, E., Campbell, W. 1966.** The structural gene for yeast cytochrome C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 55: 1498–1504.
- Sherman, F., Stewart, J.W., Jackson, M., Gilmore, R.A., Parker, J.H. 1974.** Mutants of yeast defective in iso-1-cytochrome c. *Genetics*, 77: 255–284.
- Sherman, F. 2005.** The importance of mutation, then and now: studies with yeast cytochrome c. *Mutat. Res.*, 589: 1–16.
- Shintani, T., Huang, W.P., Stromhaug, P.E., Klionsky, D.J. 2002.** Mechanism of cargo selection in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Dev. Cell*, 3: 825–837.
- Suzuki, K., Kamada, Y., Ohsumi, Y. 2002.** Studies of cargo delivery to the vacuole mediated by autophagosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dev Cell*, 3: 815–824.
- Suzuki, K., Kondo, C., Morimoto, M., Ohsumi, Y. 2010.** Selective transport of α -mannosidase by autophagic pathways: identification of a novel receptor, Atg34p. *J. Biol. Chem.*, 285: 30019–30025.
- Strich, R. 2015.** Programmed cell death initiation and execution in budding yeast. *Genetics*, 200: 1003–1014.
- Suzuki, K., Morimoto, M., Kondo, C., Ohsumi, Y. 2011.** Selective autophagy regulates insertional mutagenesis by the Ty1 retrotransposon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dev. Cell*, 21: 358–365.
- Taussig, R., Carlson, M. 1983.** Nucleotide sequence of the yeast *SUC2* gene for invertase. *Nucleic Acids Res.*, 11: 1943–1954.
- Thomas, G., Hall, M.N. 1997.** TOR signalling and control of cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9: 782–787.
- Todorova, T.T., Petrova, V.Y., Vuilleumier, S., Kujumdzieva, A.V. 2009.** Response to different oxidants of *Saccharomyces cerevisiae* ure2 mutant. *Arch. Microbiol.*, 191: 837–845.
- Treitel, M.A., Carlson, M. 1995.** Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:3132–3136.
- Trimble, R.B., and Maley, F. 1977.** Subunit structure of external invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 252: 4409–4412.

- Trumbly, R. J. 1992.** Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, 6: 15–21.
- Türkel, S., Turgut, T., Lopez, M., Uemura, H., Baker, H.V. 2003.** Mutations in GCR1 affect *SUC2* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics*, 268: 825–831.
- Vachova, L., Palkova, Z. 2005.** Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *J. Cell Biol.*, 169: 711–717.
- Valadi, A., Granath, K., Gustafsson, L., Adler, L. 2004.** Distinct intracellular localization of Gpd1p and Gpd2p, the two yeast isoforms of NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, explains their different contributions to redox-driven glycerol production. *J. Biol. Chem.*, 279: 39677–39685.
- van Heusden, G.P., Steensma, H.Y. 2001.** 14-3-3 Proteins are essential for regulation of RTG3-dependent transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 18: 1479–1491.
- Vittorini, S., Paradiso, C., Donati, A., Cavallini, G., ve ark. 1999.** The age-related accumulation of protein carbonyl in rat liver correlates with the age-related decline in liver proteolytic activities. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 54: B318–323.
- Walter, D., Wissing, S., Madeo, F., Fahrenkrog, B. 2006.** The inhibitor-of-apoptosis protein Bir1p protects against apoptosis in *S. cerevisiae* and is a substrate for the yeast homologue of Omi/HtrA2. *J. Cell Sci.*, 119: 1843–1851.
- Watanabe, Y., Noda, N.N., Kumeta, H., Suzuki, K., Ohsumi, Y., Inagaki, F. 2010.** Selective transport of α -mannosidase by autophagic pathways: structural basis for cargo recognition by ATG19 and ATG34. *J. Biol. Chem.*, 285: 30026–30033.
- Weinberger, M., Ramachandran, L., Feng, L., Sharma, K., Sun, X., Marchetti, M., et al. 2005.** Apoptosis in budding yeast caused by defects in initiation of DNA replication. *J. Cell Sci.*, 118: 3543–3553.
- Wissing, S., Ludovico, P., Herker, E., Buttner, S., ve ark. 2004.** An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.*, 166: 969–974.
- Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N. 2006.** TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124: 471–484.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F., Currie, A.R. 1980.** Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 68: 251–306.
- Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., Klionsky, D.J. 2006.** Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J. Biol. Chem.*, 281: 30299–30304.

EKLER

EK 1. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması

EK 2. β - Galaktozidaz Aktivitesi Hesaplanması

EK 1. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması

1: YPD (Yeast Ekstrakt, Pepton, Dekstroz)

10 g yeast ekstrakt ve 20 g pepton saf suda çözüldü. Katı besiyeri (petriler) için, sıvı besiyeri ortamına 20 gram/litre oluşturacak şekilde *Agar agar* eklendi ve 121°C sıcaklıkta, 25 dk steril edildi. Karbon kaynağı olarak %20'lik stok çözelti halinde glikoz hazırlandı, 121°C'de 25 dakika otoklavda steril edildi. Glikoz, kullanımından önce besiyerlerine son konsantrasyonu %2 olacak şekilde ortama ilave edildi.

2: Yeast Nitrogen Base, YNB

1,7 gram/litre Yeast Nitrogen Base (YNB), 5 gram/litre Amonyum sülfat distile suda çözülüp, otoklavda steril edildi. Otoklavdan sonra gerekli aminoasitler 0.45 mm'lik disk filtre ile steril edilerek verilen konsantrasyonlarda besiyerine eklendi. Katı besiyerleri için 20 gram/litre olacak şekilde *Agar agar* ilave edildi. Glukoz son konsantrasyonu %2 olacak şekilde %20'lik steril stok çözeltilerden deneydeki kullanımdan hemen önce ilave edildi.

3: Sc-Ura besi yeri

Urasil içermeyen sentetik tam besiyeri olarak transformantların üretilmesinde kullanıldı. Bu besiyerinin hazırlanmasında 1.7 gram/litre YNB, 5 gram/litre Amonyum sülfat distile suda çözüldü. Otoklavda 121°C sıcaklıkta, 1 saat steril edildi. Otoklavdan sonra herbir litre için 1.98 gram/litre olacak şekilde Sc-ura besiyeri tartılıp distile suda çözüldü ve filtre sterilizasyonu yapılarak besiyerine ilave edildi. Katı besiyeri için 20 gram/litre olacak şekilde agar ilave edildi. Bu besiyeri kullanımdan önce steril %20 glukoz stok çözeltisinden son konsantrasyonu %2 olacak şekilde glukoz eklendi.

4: Lityum Asetat Çözeltileri (1M ve 0,1M)

Lityum asetat (Molekül ağırlığı: 102,02) 1M olacak şekilde saf suda hazırlandı ve 0,45 µm por çaplı steril disk filtreler ile steril edildi.

5: Polietilen Glikol (%50 PEG)

Polietilen Glikol (PEG) (Molekül ağırlığı: 3,350) distile suda %50'lik stok çözelti olarak hazırlanıp, 121°C'de 25 dk otoklavda steril edildi.

6: SDS (%0,1) ve Kloroform Çözeltileri

Sodyum dodesil sülfat (SDS), steril distile suda %0,1'lik stok çözelti olarak hazırlandı. Kloroform seyreltilmeden, doğrudan stoktan kullanıldı.

7: Lizis Tampon Çözeltisi (Break Buffer)

Lizis Tampon Çözeltisinin (Break Buffer) Bileşenleri:

100 mM Tris.HCl (pH: 8)

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

%20 Gliserol

4 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF).

8: β - Galaktozidaz Tampon Çözeltisi (Z Buffer)

Z Buffer içeriği:

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

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

10 mM KCl,

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

50 mM β -Merkepto-etanol çözeltisi

Yukarıda belirtilen son konsantrasyonlarda, steril distile su ile hazırlanıp +4°C'de saklandı

9: Lowry Çözeltileri

I: Lowry A çözeltisi:

20 g Na_2CO_3 ve 4g NaOH, toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü.

II: Lowry-B1 çözeltisi:

1 g CuSO_4 , toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile su ile çözümlenip, +4 °C'de depolandı. III: Lowry-B2 çözeltisi:

2 g Sodyum potasyum tartarat, toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile su ile çözümlenip, +4 C'de depo edildi. (Stok çözelti)

IV: Lowry-C çözeltisi:

Her deney için, Lowry-A, Lowry-B1 ve Lowry-B2 stok çözeltilerden belirlenen konsantrasyonda taze olarak hazırlandı.

Lowry-C Çözeltisinin İçeriği:

24,5 ml Lowry A,

250 μl Lowry B1,

250 μl Lowry B2.

10: ONPG (O-Nitrofenil β -D-Galaktopiranozid)

ONPG (Sigma N1127), en son konsantrasyonu 4 mg/ml olacak şekilde Z-tampon çözeltisi içinde hazırlanıp, +4°C'de saklandı.

EK 2. β - Galaktozidaz Aktivitesinin Hesaplanması

β -galaktozidaz aktivitesi aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

Aktivite: $(OD_{420} \times 1.7 / 0.0045) / (t \times V \times P)$

OD₄₂₀: Sarı rengin absorbansı

1.7: Sarı rengin bulunduğu tüpün hacmi (980 μ l Z buffer, 20 μ l lizat, 200 μ l ONPG, 500 μ l NaCO₃)

0,0045: ONPG'nin molar absorpsiyon katsayısı

t: β -galaktozidaz reaksiyon süresi (dakika)

V: B-Galaktozidaz ölçümünde kullanılan hücre lizatı hacmi (ml)

P: Hücre lizatlarının protein konsantrasyonları (mg/ml)

β -Galaktozidaz aktivitesi biririmi, dakika başına 1 mg proteince hidroliz edilen nmol ONPG (nmol ONPG/dk/ mg protein) cinsinden verilmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Eren TANIK
Doğum Yeri ve Tarihi : Bursa, 30.06.1996
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lise : Emirsultan Anadolu Lisesi/ 2014
Lisans : Uludağ Üniversitesi/ 2018
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi/ 2020

Çalıştığı Kurum/Kurumlar :-
İletişim (e-posta) : eren.tanik@hotmail.com
Yayımları :

Türkel, S., Çolakoğlu, C., Tanık, E., Öztop, O.A. 2019. Induction of Autophagy and Apoptosis Affects the Gene Expression in Ty Elements of *Saccharomyces cerevisiae*. 29th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (ICYGMB). Gothenburg, İsveç. 18-22 Ağustos, 2019. (Poster).

Tanık, E., Çolakoğlu, C., Öztop, O.A, Türkel, S. 2019. Apoptosis and Autophagy Signaling Repress the Transcription of *GPD1* and *CYC1* Gene. 7th. International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey. İTÜ, İstanbul, 27-29 Eylül, 2019 (Poster) (Abstract published in Turk J Biol. 2019. 45 (5), Suppl. p:106.)

Öztop, O.A., Tanık, E., Çolakoğlu C., Türkel, S. 2020. Investigation of the Effects of Calcium Signaling Pathway on the Cell Cycle Regulation and Transcription of Genes That Involves in Glucose Metabolism. International Conference on Agricultural, Biological and Life Sciences. E-AGBIOL 2020. Sept 1-3, 2020, Edirne, Türkiye. (Poster)