



**FARKLI CANLI GRUPLARINDA *TOR1* GEN YAPISI ve
KONTROL MEKANİZMASININ KARŞILAŞTIRMALI
ANALİZİ**

NACİ ÖZ



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

**FARKLI CANLI GRUPLARINDA *TORI* GEN YAPISI VE KONTROL
MEKANİZMASININ KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ**

Naci ÖZ

Prof. Dr. Sezai TÜRKEL
(Danışman)

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**BURSA-2016
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ ONAYI

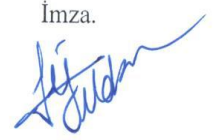
Naci ÖZ tarafından hazırlanan "Farklı Canlı Gruplarında *TORI* Gen yapısı ve Kontrol Mekanizmasının Karşılaştırmalı Analizi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Başkan: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL
U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza.



Üye: Yrd. Doç. Dr. Figen ERSOY
U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza.


Üye: Yrd. Doç. Dr. Hülya KARACA GENCER
Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İmza


Yukarıdaki sonucu onaylarım


Prof. Dr. Ali Osman DEMİR
Enstitü Müdürü

31 / 10 / 2016

Bilimsel Etik Bildirim Sayfası

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

- 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.

31 / 10 / 2016

Naci ÖZ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI CANLI GRUPLARINDA *TOR1* GEN YAPISI VE KONTROL MEKANİZMASININ KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ

Naci ÖZ

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Saccharomyces cerevisiae' da bulunan *TOR1* geni ve onun diğer canlılardaki homologları hücre büyümesi, translasyon, transkripsiyon, lipid ve protein sentezi gibi hücresel aktiviteleri kontrol eden ser/thr kinazlardır. TORC1 ve TORC2 olmak üzere 2 farklı protein kompleksi oluşturur. Bu kompleksler yapısal ve işlevsel olarak mayalardan memelilere kadar tüm canlılarda korunmuştur. Tüm canlı gruplarında büyüme faktörleri, stres, besin varlığı, enerji seviyeleri, hipoksi gibi sinyallerle kontrol edilir. Bu çalışmada çeşitli genom veri tabanları kullanılarak çeşitli canlılarda *TOR1* geninin ve homologlarının ne kadar korunduğu incelenmiştir. Farklı *Saccharomyces* türlerinin *TOR1* ekspresyon seviyeleri RNAseq ile karşılaştırıldığında; *S. bayanus* türünde *TOR1* geni ekspresyonunda ciddi bir farklılık bulunmuştur. Bu farklılığın hangi nedenden kaynaklandığını öğrenebilmek için *S. bayanus* ve *S. cerevisiae* türlerinin *TOR1* promotor bölgeleri ve transkripsiyon faktörleri incelenmiştir. Her iki tür için transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon seviyeleri Deseq2 analizi ile karşılaştırılmıştır. *S. bayanus* türünde özellikle stres cevap genlerinin *S. cerevisiae*' ya göre yüksek eksprese edildiği bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak; farklı stres koşullarında ve çevre şartlarında yaşamaya adaptasyon sürecinin TOR sinyal yoluyla yakından ilişkili olduğu öne sürülebilir.

Anahtar Kelimeler: *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, TOR1 geni, TORC1, TORC2, stres koşulları, RNAseq, Deseq2, Protein kinaz, Transkripsiyon.

2016, vii + 60 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE STRUCTURE AND CONTROL MECHANISMS OF *TOR1* GENE IN DIFFERENT ORGANISMS

Naci ÖZ

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

Supervisor: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

TOR1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* and its homologs are ser/thr kinases which regulate cellular processes such as cell growth, translation, transcription, lipid and protein synthesis. *TOR1* functions in 2 distinct protein complexes, called TORC1 and TORC2. Its major upstream regulators are growth factors, stress, nutrient, cellular energy levels and hypoxia. In this research, conserved regions of TOR1 and its homologs were investigated by using different genome databases. It's found that *S. bayanus* has overexpression of *TOR1* comparing *S. cerevisiae* according to RNAseq analysis results. To find out its reason, *TOR1* promotor regions and transcription factors of these two species were investigated and compared by Deseq2 analysis. It's found that *S. bayanus* relatively overexpressed certain stress response genes comparing *S. cerevisiae*. The results of this research revealed that adaptation to different environmental and stress conditions might be linked to TOR signaling pathway.

Keywords: *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, TOR1 gene, TORC1, TORC2, stress conditions, RNAseq, Deseq2, Protein kinase, Transcription.

2016, vii + 60 pages

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin başlangıcından bitimine kadar bana inanan, benden yardımlarını esirgemeyen, her zaman yanımda olan, bildiklerini paylaşan, tezimin her aşamasında destek olan değerli hocam ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Sezai TÜRKEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez aşaması sırasında bana ayırdığı değerli zamanı ve sağladığı destek için Dr. Cemalettin BEKPEN'e teşekkür ederim.

Tanıştığımız günden beri bana arkadaştan öte kardeş olan Mevlüt ULAŞ ve Varol GÜLER'e hayatımın her aşamasındaki destekleri için teşekkür ederim.

Hayatta aldığım ilk nefesten beri bana olan desteklerini esirgemeyen, inançlarını yitirmeyen, hayallerimin peşinde koşmamı destekleyen, şu an olduğum ve yarın olabileceğim yerleri borçlu olduğum annem Arzu ÖZ, babam Naim ÖZ, ablam Fatma ÖZ ACAR, minik prensesim Gülsüm Ece ACAR'a teşekkür ederim.

Naci ÖZ
31./10/ 2016

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLERİN DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	2
2.1. İsim Babası Rapamycin	2
2.2. Rapamycin'den TOR'a Açılan Yol.....	3
2.3. Target of Rapamycin (TOR).....	3
2.3.1. <i>S. cerevisiae</i> 'da TOR'un Genel Yapısı.....	4
2.3.2. Memelilerde TOR'un Genel Yapısı.....	6
2.4. TOR Sinyal Yolağı	8
2.4.1 <i>S. cerevisiae</i> 'da TOR Sinyal Yolağı.....	8
2.4.2. Memelilerde mTOR Sinyal Yolağı.....	10
2.5. TOR'un İnsan Hastalıkları ile İlişkisi	12
2.6. Çalışmada Kullanılan Organizmalar	13
2.6.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
2.6.2. <i>Saccharomyces bayanus</i>	15
2.6.3. <i>Saccharomyces mikatae</i>	16
2.6.4. <i>Saccharomyces paradoxus</i>	16
2.6.5. <i>Mus musculus domesticus</i>	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1. Materyaller.....	18
3.1.1. RNAseq Analizi	18
3.1.2. Deseq2 Analizi	21
3.1.3. Biyoinformatik Veri Tabanları	21
3.1.4. Biyoinformatik Araçlar	22
3.2. Yöntemler	24
3.2.1. İnsan mTOR Sekansının Diğer Canlılarla Karşılaştırılması	24
3.2.2 <i>S. cerevisiae</i> TOR1 ve TOR2 Genlerinin Fungi Aleminde Karşılaştırılması	24
3.2.3 Mayalarda RNAseq Analizi	24
3.2.4 Mayalarda RNAseq Sonuçlarının Deseq2 Analizi	28
3.2.5 Mayalarda TOR1 Geni Promotor Bölgesi Karşılaştırılması	30
3.2.6 <i>Mus Musculus Domesticus</i> için RNAseq Analizi	30
4. BULGULAR.....	32
4.1. İnsan mTOR Sekansının Diğer Canlılarla Karşılaştırılması	32
4.2. <i>S. cerevisiae</i> TOR1 ve TOR2 Genlerinin Fungi Aleminde Karşılaştırılması.....	37
4.3. Mayalarda RNAseq Analizi.....	40
4.4. Mayalarda RNAseq Sonuçlarının Deseq2 Analizi	41
4.5. Mayalarda TOR1 Geni Promotor Bölgesi Karşılaştırılması	42
4.6. <i>Mus Musculus Domesticus</i> için RNAseq Analizi	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	47
KAYNAKLAR DİZİNİ	51
ÖZGEÇMİŞ	60

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%:	Yüzde
°C:	Santigrat derece
µm:	Mikron
g:	Gravity (santrifuj birimi)
α:	Alfa
β:	Beta
Δ:	Delta, delesyon
µg:	Mikrogram
µl:	Mikrolitre

Kısaltmalar

ATP:	Adenosin tri fosfat
AMP:	Halkasal Adenosin Mono Fosfat
DNA:	Deoksiribonükleik asit
FKBP12:	FK506 Bağlanan Protein 12
Leu:	Lösin
MAT:	Mating type, <i>S. cerevisiae</i> 'da eşleşme tipi
mg:	Miligram
ml:	Mililitre
mRNA:	Mesajcı ribonükleik asit
mTOR:	Mekanistik Rapamycin Hedefi
OD:	Optical Density, optik yoğunluk
pH:	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PKA:	Protein Kinaz A
RNA:	Ribonükleik asit
<i>S. cerevisiae</i> :	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. bayanus</i> :	<i>Saccharomyces bayanus</i>
<i>S. mikatee</i> :	<i>Saccharomyces mikatee</i>
<i>S. paradoxus</i> :	<i>Saccharomyces paradoxus</i>
Ser:	Serin
SGD:	Saccharomyces Genome Database
YPD:	Yeast extract pepton dextrose
TOR:	Rapamycin Hedefi
TORC1:	TOR kompleks 1
TORC2:	TOR kompleks 2
Thr:	Treonin

ŞEKİLLERİN DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: Rapamycin ve türevlerinin kimyasal yapısı	3
Şekil 2.2: <i>S. cerevisiae</i> 'da TORC1 ve TORC2 yapısı	6
Şekil 2.3: mTOR ve mTORC proteinlerinin domain organizasyonu	7
Şekil 2.4: <i>S. cerevisiae</i> 'nın yaşam döngüsü	14
Şekil 2.5: <i>Saccharomyces</i> türlerinin filogenetik ilişkisi	15
Şekil 4.1: TOR1 geninin farklı <i>Saccharomyces</i> türlerindeki ekspresyon seviyesi	40
Şekil 4.2: TOR2 geninin farklı <i>Saccharomyces</i> türlerindeki ekspresyon seviyesi	41
Şekil 4.3: Deseq2 log2 değişim grafiği	42
Şekil 4.4: <i>S. cerevisiae</i> ve <i>S. bayanus</i> TOR1 promotor bölgesi çoklu hizalama	43
Şekil 4.5: <i>Mus musculus domesticus</i> İran ve Almanya popülasyonlarına ait iki bireyde farklı dokularda mTOR ekspresyon düzeyi karşılaştırılması	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1: “Expression evolution in gene groups: Inferring non-neutral regulatory change in pathways from transcriptional profiling data” projesinde RNAseq analizi için kullanılan maya suşları	19
Çizelge 3.2: İndirilen RNAseq Dataları ve Erişim Numaraları	20
Çizelge 4.1: İnsan mTOR sekansının primatlar üzerine BLAT ile hizalanması	32
Çizelge 4.2: İnsan mTOR sekansının primat dışındaki memeliler üzerine BLAT ile hizalanması	33
Çizelge 4.3: İnsan mTOR sekansının memeliler dışındaki omurgalılara BLAT ile hizalanması	35
Çizelge 4.4: İnsan mTOR sekansının omurgasızlara BLAT ile hizalanması	36
Çizelge 4.5: <i>S. cerevisiae</i> TOR1 ve TOR2 sekansının farklı <i>S. cerevisiae</i> suşları üzerine BLAST ile hizalanması	37
Çizelge 4.6: <i>S. cerevisiae</i> TOR1 ve TOR2 sekansının farklı <i>Saccharomyces</i> ve fungi suşları üzerine BLAST ile hizalanması	39
Çizelge 4.7: <i>S. cerevisiae</i> TOR1 promotor bölgesi için olası transkripsiyon faktörleri	44
Çizelge 4.8: <i>S. bayanus</i> TOR1 promotor bölgesi için olası transkripsiyon faktörleri.	45

1. GİRİŞ

TOR, hücre içi ve dışı sinyalleri kullanarak hücre büyümesini kontrol eden bir serin/treonin kinazdır. Mayada iki farklı *TOR* geni (*TOR1* ve *TOR2*) bulunurken; bilinen diğer ökaryotlar sadece bir tane *TOR* genine sahiptir. Mayalardan memelilere kadar evrimsel olarak korunmuş bir genidir.

Hücre içerisinde 2 farklı protein kompleksi içerisinde yer alır (*TORC1* ve *TORC2*). Bu kompleksler hücre içi ve dışı sinyallerle hücre büyümesi, translasyon, transkripsiyon, lipid sentezi, protein sentezi gibi hücresel aktiviteleri kontrol eder.

TORC1 güçlü bir antifungal ilaç olan rapamycin'e karşı hassas iken; *TORC2* rapamycin'e karşı dirençlidir. *TORC1* aktivasyonu büyüme faktörü, stres, hipoksi, besin varlığı, enerji seviyesi gibi çeşitli sinyaller tarafından kontrol edilirken; *TORC2* sadece büyüme faktörleri ile kontrol edilir.

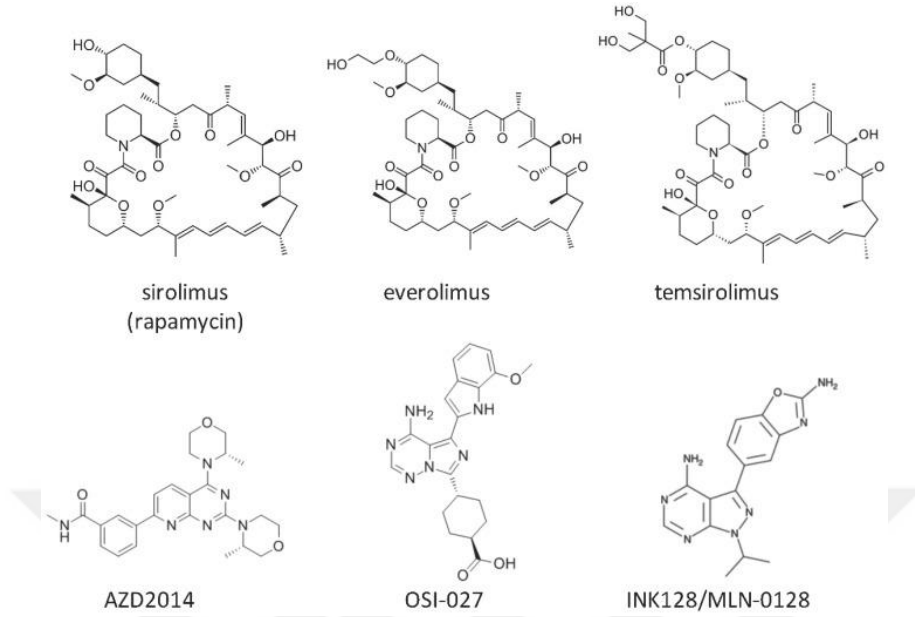
TOR sinyal yolağında ortaya çıkan aksaklıklar birçok insan hastalığıyla ilişkilendirilmiştir. Kanser, doku reddi gibi durumlarda *TOR* inhibitörü rapamycin ilaç olarak kullanılmaktadır. Ayrıca immün hastalıklar, yaşlanma, metabolik hastalıklar, sinir sistemi hastalıkları ve genetik hastalıklar *TOR* sinyal yolağı ile yakından ilişkilidir. Tezin amacı *TOR* genini farklı canlı gruplarında hem yapısal hem de kontrol mekanizması açısından karşılaştırılmalı analiz etmektir. Bulunan farklılıkların özellikle stres koşullarına adaptasyon üzerine etkisi araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. İsim Babası Rapamycin

TOR genlerinin etkileyici hikâyesi aslında olağanüstü bir ilaç olan rapamycin ile başlar. Rapamycin, *Streptomyces hygroscopicus* türü bakteri tarafından üretilen doğal bir ikincil metabolittir. Lipofilik bir makrolid olan rapamycin, 1975 yılında kendisine adını da veren Rapa-Nui (Easter Island) adasından alınan bakteri kültüründen izole edilmiş ve antifungal ajan olarak tanımlanmıştır (Vezina ve ark. 1975). Çok etkili bir antifungal olmasına rağmen bağışıklık sistemini baskılayan yan etkileri sebebiyle antifungal olarak tercih edilmemiştir. Yıllar sonra, organ naklinde transplant reddinin tedavisinde, T hücreleri inhibitörü ve bağışıklık sistemi baskılayıcı ilaç olarak kullanılmaya başlanmıştır (Benjamin ve ark. 2011).

Günümüzde rapamycin için 3 önemli klinik kullanım alanı vardır: organ nakli, kanser ve kalp-damar hastalıkları. Klinik öncesi çalışmalar göstermiştir ki; rapamycin ve türevleri, CCI-779 (Wyeth-Ayerst) ve RAD001 (Novartis), kanser hücrelerinin çoğalmasını etkileyici bir biçimde yavaşlatmaktadır (Rini 2008, Gabardi ve Baroletti 2010). Rapamycin 1999 yılında böbrek naklinde organ reddini engellemek için kullanılmak üzere bağışıklık sistemi baskılayıcı ilaç olarak klinik onay almıştır. Rapamycin türevleri olan CCI-779 (Torisel) ve RAD001 (Afinitor) sırasıyla 2007 ve 2009 yıllarında böbrek kanseri tedavisinde kullanılmak üzere onay almıştır (Rini 2008, Gabardi ve Baroletti 2010). Rapamycin ve türevleri, tümör hücrelerinin büyümesini direkt olarak engelleyebilmesi ve anjiyogenezi engelleyerek dolaylı olarak tümör hücrelerinin oksijen ve besin yollarını yok etmesi gibi özellikleri sayesinde kansere karşı etkili bir maddedir (Guba ve ark. 2002, Benjamin ve ark. 2011).



Şekil 2.1: Rapamycin ve türevlerinin kimyasal yapısı (Kajiwara ve Masuda 2016)

2.2. Rapamycin'den TOR'a Açılan Yol

Rapamycin hücrel hedefini keşfetmek ve nasıl çalıştığını ortaya çıkarmak için 1980'li yılların sonunda maya (Heitman ve ark. 1991, Cafferkey ve ark. 1993, Kunz ve ark. 1993) ve memeli (Brown ve ark. 1994, Chiu ve ark. 1994, Sabatini ve ark. 1994, Sabers ve ark. 1995) hücreleri üzerinde çalışmalar başlatılmıştır. Rapamycin'in bir immünofilin olan FKBP12'ye (FK506-bağlayıcı protein 12) bağlanıp TOR'u inhibe ettiği ortaya koyulmuştur (Schreiber 1991). Ayrıca hem maya hem de memeli hücrelerinde hücre döngüsünü inhibe etmesinin görülmesi, moleküler hedefinin ökaryotik canlılar arasında korunmuş olabileceği ihtimalini göstermiştir (Heitman ve ark. 1991).

2.3. Target of Rapamycin (TOR)

TOR (target of rapamycin) ilk olarak rapamycin üzerine yapılan çalışmalar sırasında *S. cerevisiae* hücrelerinde keşfedilmiştir (Heitmann ve ark. 1991). TOR, PIKK ailesi

içerisinde yer alan bir serin/treonin kinazdır ve geniş çaplı hücre içi ve hücre dışı sinyalleri kullanarak hücre büyümesini kontrol eden bir sinyal yolağının başrol oyuncusudur (Wullschleger ve ark. 2006). Mayada iki farklı TOR geni (TOR1 ve TOR2) bulunurken; bilinen diğer ökaryotlarda (sinek, solucan, arı, böcek, bitki, memeli) sadece bir tane TOR geni bulunur. TOR genlerinin hem yapısal hem de fonksiyonel özellikleri (hücre büyümesi, otofaji, translasyon vb.) mayadan memelilere kadar tüm canlılarda büyük oranda korunmuştur. TOR genlerinin aktivitesi genel olarak büyüme faktörleri (insülin ve IGF1), hücresel enerji seviyesi, besin varlığı (aminoasit) ve stres koşulları (hipoksi) ile kontrol edilmektedir (Wullschleger ve ark. 2006).

2.3.1 *S. cerevisiae*'da TOR'un Genel Yapısı

S. cerevisiae dâhil olmak üzere mayalar diğer ökaryotların aksine iki farklı TOR genine (*TOR1* ve *TOR2*) sahiptir. *TOR1* ve *TOR2* genlerinin aminoasit dizisi birbirine %67 oranında benzerlik gösterir. Tor1 ve Tor2 282 kDa büyüklüğünde olup sırasıyla 2470 ve 2474 aminoasit dizisinden oluşur. Ayrıca TOR1 ve TOR2 proteinleri serin/treonin kinaz PIKK ailesinin üyeleridir. (diğer üyeleri: TEL1, ATM, DNA-PK ve MEC1) TOR proteinleri genel olarak benzer domain yapısına sahiptir (Keith ve Schreiber 1995). Amino ucundan karboksi ucuna doğru sırasıyla HEAT tekrarları, FAT, FRB, kinaz ve FATC domainleri bulunur. TOR'un amino ucunda bulunan HEAT tekrarları TOR komplekslerinin diğer alt birimleri için bağlanma bölgesidir. Her biri 40 aminoasit içeren yaklaşık 20 tane HEAT tekrar motifinden oluşur. FAT (yaklaşık 500 aminoasit) ve FATC (yaklaşık 35 aminoasit) domainleri tüm PIKK ailesi üyelerinde bir arada bulunur. FRB bölgesi ise rapamycin-FKBP12 kompleksinin bağlanma bölgesidir. Bu bölgedeki missense (kayıp) mutasyonlar rapamycin direnci ortaya çıkarır. Kinaz domain ise protein katalitik domainidir. Hedef proteinlerdeki Ser/Thr aminoasitlerini fosforlar (Schmelzle ve ark. 2002, Wullschleger ve ark. 2005, Loewith ve Hall 2011).

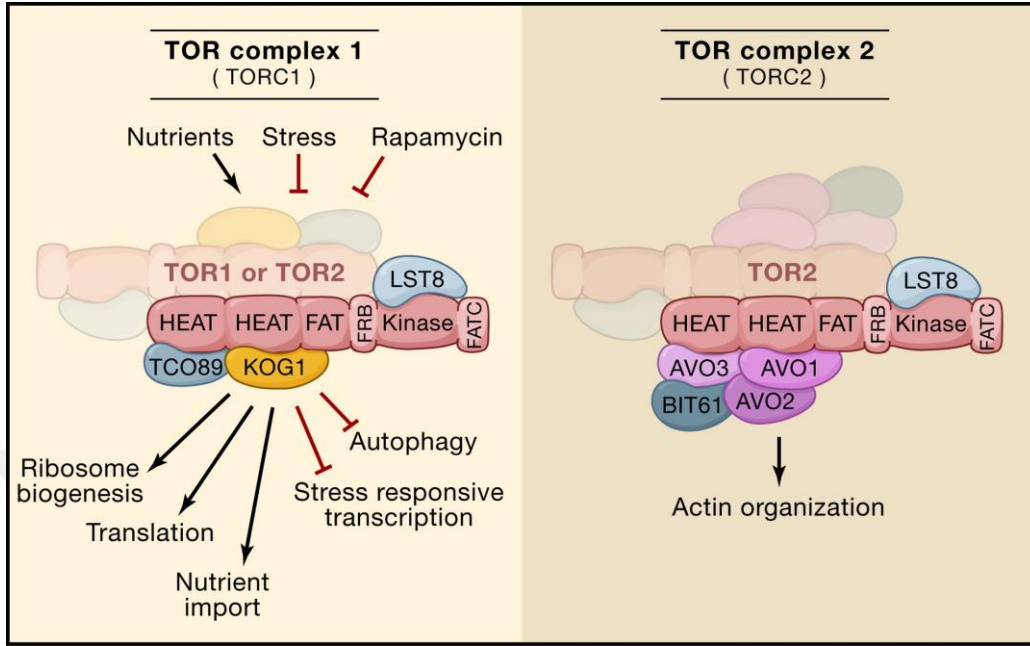
TOR1 ve *TOR2* genleri genel olarak protein sentezi, ribozom biyogenezi, otofaji, transkripsiyonel aktivasyon, mayoz, hücre döngüsü ve aktin organizasyonu gibi birçok hücresel sürecin kontrolünde görev alırlar. Ancak çeşitli çalışmalar göstermiştir ki TOR sinyal ağı iki farklı kola ayrılmıştır. İlki TOR genlerinin ortak kontrol ettiği, ikincisi ise

TOR2'nin spesifik olarak kontrol ettiği sinyal ağıdır. TOR ortak sinyal ağı hücresel büyümesinin geçici kontrolüne aracılık eder. Hücresel büyümesini kontrol etmek için protein sentezi ve degradasyonu, mRNA sentezi ve degradasyonu, ribozom biyogenezi, besin transportu ve otofaji gibi hücre içi olayları düzenler. TOR2 spesifik sinyal ağı ise endositoz, sfingolipid biyosentezi ve aktin hücre iskeletinin organizasyonunu kontrol eder. Bu sinyal yolu ise hücre büyümesinin üç boyutlu kontrolünde görev alır (Schmelzle ve Hall 2000, Loewith ve Hall 2004, Powers ve ark. 2010, Loewith ve Hall 2011).

TOR proteinleri farklı proteinlerle bir araya gelerek, yapısal ve fonksiyonel olarak farklı olan iki çeşit TOR kompleksi (TORC1 ve TORC2) oluşturur. TORC1 ortak sinyal yolağında yer alırken; TORC2 TOR2 spesifik sinyal yolağına aracılık eder. TORC1 ve TORC2'yi oluşturan diğer protein alt birimleri bilinse de fonksiyonları tam olarak aydınlatılmamıştır (Loewith ve ark. 2002; Wedaman ve ark. 2003; Reinke ve ark. 2004, Wullschleger ve ark. 2006).

TOR kompleks 1 (TORC1) TOR ortak sinyal yolağında bahsedilen görevlerden sorumlu olmasının yanı sıra; tetrad formasyonu ve besin azlığıyla aktive edilen genlerin transkripsiyonunun baskılanmasında görev alır. Ayrıca nükleotid, lipit ve protein sentezini, glikolizi ve besin alımını teşvik ederek hücre büyümesini destekler. TORC1 içerisinde TOR1 proteini veya TOR2 proteini içerebilir. Bunun yanı sıra Kog1, Lst8 ve Tco89 gibi farklı alt birimleri de vardır. Ayrıca TORC1, rapamycin-FKBP12 kompleksi ile kolayca inhibe olabilir. Bu sebeple TORC1 kontrol mekanizması üzerinde çalışmalar TORC2'ye oranla daha hızlı ilerlemektedir (Loewith ve ark. 2002; Wedaman ve ark. 2003; Reinke ve ark. 2004, Loewith ve Hall 2011).

TORC2 ise hücre döngüsü sırasında hücre iskeleti (aktin) polarizasyonu, hücre duvarı bütünlüğü, lipit biyosentezi ve endositoz olaylarının kontrolünde yer alır. TORC2 sadece TOR2 proteini ile Avo1, Avo2, Avo3 (Tsc11), Lst8, Bit61, Bit2 alt birimlerini içerir. Ayrıca TORC2 rapamycin-FKBP12 kompleksine karşı hassas değildir. Bu sebeple kontrol mekanizması tam bilinmemektedir (Loewith ve ark. 2002; Wedaman ve ark. 2003; Reinke ve ark. 2004, Zinzalla ve ark. 2011, Loewith ve Hall 2011) .



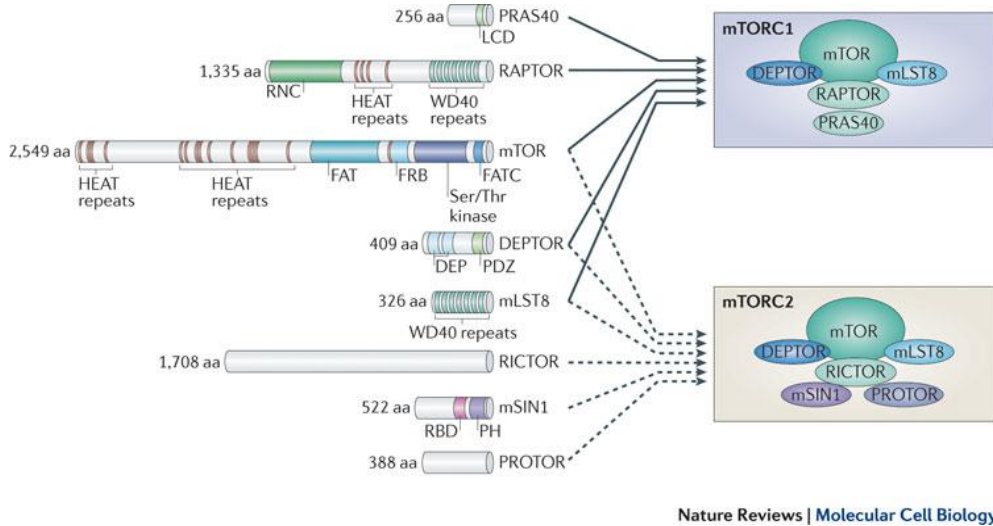
Şekil 2.2: *S.cerevisiae*'da TORC1 ve TORC2 yapısı (Wullschleger ve ark. 2006)

2.3.2: Memelilerde TOR'un Genel Yapısı

Mayaların aksine memeli hücrelerin tek bir *TOR* geni (*mTOR*) bulunur. Protein sekansı 2549 aminoasitten oluşur ve yaklaşık 289 kDa büyüklüğündedir. *mTOR* diğer TOR homologları ile aynı domainlere (HEAT, FAT, FRB, kinaz ve FATC) sahiptir. Memelilerde tek gen olmasına rağmen tıpkı mayalarda olduğu gibi fonksiyonel ve yapısal olarak farklı iki tane kompleks (mTORC1 ve mTORC2) bulunur. mTORC1 içerisinde mTOR, RAPTOR, DEPTOR, PRAS40, mLST8 ve Tti1/Tel2 domainleri bulundurulur. mTORC2 ise içerisinde mTOR, RICTOR, DEPTOR, PROTOR, mLST8, Tti1/Tel2 ve mSIN1 domainleri bulundurulur. Rapamycin-FKBP12 kompleksi mTORC1 içerisindeki mTOR'a direkt olarak bağlanıp inhibe edebilirken; mTORC2 için bu geçerli değildir. Ancak bu bağlanma farkının neden dolayı oluştuğu ve bağlanma mekanizması hala bilinmemektedir (Laplante ve Sabatini 2009a, Peterson ve ark. 2009, Laplante ve Sabatini 2012, Yang ve ark. 2013).

Her iki kompleksin ortak elemanlarından *mTOR* tıpkı diğer homologları gibi Ser/Thr kinaz aktivitesi görür. *mLST8*'nin ise fonksiyonu bilinmemektedir. *DEPTOR* *mTOR* inhibitörü olarak görev yapar. *Tti1/Tel2* ise *mTOR* komplekslerinin stabilitesini ve bir arada kalmasını düzenleyen proteinlerdir. Sadece *mTORC1* içerisinde bulunan *PRAS40* ise *mTORC1* inhibitörüdür. *RAPTOR* *mTORC1*'in substrata bağlanması, lokalizasyonu ve kompleksin bir arada kalmasını düzenleyen proteindir. *RICTOR* da *mTORC2* için aynı görevi görür. *PROTOR* ise *mTOR2* aracılı *SGK1* aktivasyonunu artırır (Laplane ve Sabatini 2009a, Peterson ve ark. 2009, Lablante ve Sabatini 2012, Yang ve ark. 2013).

mTORC1 hücre metabolizması, hücre büyümesi, hücre döngüsü, makromolekül biyosentezi ve otofaji gibi olayları düzenlerken; *mTORC2* ise hücrenin hayatta kalması, hücre iskeleti organizasyonu ve hücre metabolizmasını düzenler. *mTORC1* aktivitesi oksijen varlığı, aminoasit varlığı, stres koşulları, enerji, büyüme faktörleri ve stres koşulları ile kontrol edilirken; *mTORC2* sadece büyüme faktörleri ile kontrol edilir (Laplane ve Sabatini 2009a, Peterson ve ark. 2009, Lablante ve Sabatini 2012, Yang ve ark. 2013).



Şekil 2.3: *mTOR* ve *mTORC* proteinlerinin domain organizasyonu (Zoncu ve ark. 2011)

2.4. TOR Sinyal Yolağı

2.4.1 *S. cerevisiae*'da TOR Sinyal Yolağı

Maya hücrelerini rapamycin'e maruz bırakmak (tıpkı besin açlığında olduğu gibi) hücrede protein sentezinin hızla düşmesine, otofajinin tetiklenmesine, hücre döngüsünden çıkıp pasif G0 fazına geçişe neden olur (Barbet ve ark. 1996). Ayrıca hem akut olarak besin (karbon, nitrojen, fosfat ve aminoasit) açlığındaki hücrelerde hem de rapamycin'e maruz bırakılan hücrelerde TORC1'in substratı *Sch9* hızlı bir şekilde defosforile olur (Urban ve ark. 2007; Binda ve ark. 2009). Hem metazoan hem de maya hücrelerinde yapılan çalışmalarda TORC1'in özellikle glutamin ve lösin aminoasitlerine karşı aktif olduğu saptanmıştır (Crespo ve ark. 2002; Binda ve ark. 2009). Bu gözlemler TORC1'in besin varlığı ve yokluğu ile kontrol edildiğini gösterse de bu sinyallerin nasıl alındığı ve TORC1'e nasıl aktarıldığı bilinmemektedir (Loewith ve Hall 2011). Ayrıca hücre yüksek miktarda tuz, redoks stresi, yüksek sıcaklık veya kafein gibi çeşitli stres koşullarına maruz bırakıldığında, rapamycin etkisinde olduğu gibi *Sch9* fosforilasyonu hızlıca düşer (Kuranda ve ark. 2006; Urban ve ark. 2007). Direkt olarak TORC1'i inhibe eden kafein dışında bu çevresel stres sinyallerinin nasıl TORC1'e iletildiği bilinmemektedir (Loewith ve Hall 2011). Hücre dışı sinyallerin yanı sıra TORC1 hücre içi sinyallere de yanıt verir. Hem mayalarda hem de memeli hücrelerinde TORC1'in translasyonun başlatılmasını tetiklediği bilinmektedir (Wullschleger ve ark. 2006). İlginç bir şekilde translasyonun inhibe edilmesi bu hücrelerde TORC1 aktivitesini arttırmıştır (Beugnet ve ark. 2003, Urban ve ark. 2007, Binda ve ark. 2009). Hücre içi sinyallere bir diğer örnek de ribozom biyogenezidir. TORC1 ribozom biyogenezini substratı olan *Sch9* ve *Sfp1* aracılığıyla kontrol eder. Bu iki TORC1 substratının delesyonu sonucunda ribozom biyogenezi azalır ve ertesinde TORC1 aktivesinde hızlı bir yükseliş meydana gelir (Lempiainen ve ark. 2009).

TORC2'nin upstream düzenleyicileri tam olarak karakterize edilememiştir (Cybulski ve Hall 2009). TORC1'in aksine TORC2'nin besin varlığı ile kontrol edildiğine dair hiçbir kanıt yoktur. Ayrıca gen TORC2'in etkisizleştirilmesi de TORC1'de olduğu gibi besin açlığı benzeri fenotipler ortaya çıkarmamıştır. Ancak *Ypk2* isimli protein kinaz ve bir

ribozom olgunlaşma faktörü olan *Nip7*'nin TORC2 aktivasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir (Zinzalla ve ark. 2011). Ayrıca çevresel stres faktörlerinin de TORC2'yi inhibe ettiğine dair bulgular vardır (Bultynck ve ark. 2006; Mulet ve ark. 2006).

Hem maya hem de metazoan TOR kompleksleri için en iyi karakterize edilmiş substrat AGC ailesi kinazlarıdır. Bu kinazların aktivasyonu için hidrofobik ve T motiflerinin fosforlanması gerekir. Bu fosforlanma aktif durumdaki kinaz bölgesinin stabil kalmasına yardımcı olur. Bazı kinazlarda bu iki motif dışında “turn” motifi de bulunur. Bu motifin fosforlanması ise proteinin stabil kalmasını desteklediği düşünülmektedir. T motifi memeli ve maya hücrelerinde sırasıyla *PDK1* ve onun ortoloğu *Pkh* ile fosforlanırken; hidrofobik ve turn motifleri çoğunlukla TORC1 ve TORC2 aracılığıyla fosforlanır (Loewith ve Hall 2011). AGC kinaz *Sch9* mayada TORC1'in direkt substratıdır (Powers 2007). *Sch9*'a ek olarak TORC1 tip 2A (*Pph21*, *Pph22*, *Pph3*, *PP2Ac*) ve 2A-bağlantılı fosfotazları (*Sit4*, *Ppg1*) düzenler. Bu enzimler *Tap42* isimli düzenleyici protein ile de etkileşim halindedir. TORC1 aktif iken *Tap42* fosforlanır ve bu fosfotazlara ile sıkıca bağlanır. Ancak TORC1'in *Tap42*'yi nasıl fosforladığı bilinmemektedir (Di Como ve Arndt 1996; Jiang ve Broach 1999; Zheng ve Jiang 2005). TORC1 ayrıca *Sfp1*, *Gln3n* ve *Atg13* transkripsiyon faktörlerini de direkt olarak fosforlar. Breitzkreutz ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada TORC1'in *Mks1*, *FMP48*, *Npr1*, *Ksp1*, *Nap1*, *Nnk1*, *Sky1*, *Bck1* ve *Kdx1* enzimleri ile fiziksel etkileşimde olduğu bulunmuştur.

TORC2 substratları içerisinde en iyi karakterize edilene AGC protein kinaz ailesi içerisindeki *Ypk*'dir. TORC2 *Ypk2*'yi direkt olarak hidrofobik ve turn motiflerini fosforlayarak aktive eder. Ayrıca memeli ortoloğu olan *Sgk1*'i de fosforlar (Matsuo ve ark. 2003; Kamada ve ark. 2005; Garcia-Martinez ve Alessi 2008). Ayrıca *Slm1* ve *Slm2* homolog proteinleri de TORC2 tarafından fosforlandığı bildirilen proteinlerdir (Audhya ve ark. 2004; Fadri ve ark. 2005).

2.4.2. Memelilerde *mTOR* Sinyal Yolağı

Memeli hücrelerinde TOR kompleksleri farklı protein alt birimlerine, upstream sinyallere, substratlara ve farklı biyolojik olayları düzenleme becerilerine sahiptirler (Laplane ve Sabatini 2009a). mTORC1 hücre büyümesi ve çoğalması dâhil olmak üzere birçok biyolojik süreci düzenler. mTORC1'in aktiviteleri; büyüme faktörleri (insülin, *IGF1*), enerji düzeyi (*ATP*), aminoasitler, oksijen (hipoksi), stres koşulları gibi upstream sinyaller tarafından kontrol edilir. Aminoasitler dışındaki tüm sinyaller *TSC1-TSC2* kompleksinin aktivitesi ile kontrol eder. İnsülin veya *IGF1* gibi büyüme faktörleri hücre büyümesi, metabolizması ve hayatta kalmasının desteklenmesinde kritik roller oynarlar. Tirozin kinaz reseptörlerinin büyüme faktörlerince aktivasyonu; *PI3K* ile PtdIns(3,4,5)P3 üretimini destekler. Bu da *Akt* aktivasyonu için gereklidir. Aktif *Akt* ise mTORC1 aktivesini ya PRAS40-mTORC1 etkileşimini azaltarak ya da *TSC* kompleksini fosforlayarak inhibe ederek destekler (Sancak ve ark. 2007, Thedieck ve ark. 2007, Vander Haar ve ark. 2007, Wang ve ark. 2007, Dibble ve ark. 2012, Inoki ve ark. 2002, Manning ve ark. 2002, Potter ve ark. 2002; Roux ve ark. 2004). *TSC* kompleksi *Tsc1*, *Tsc2* ve *TBC1D7* alt birimlerinden oluşur. *Tsc1* ve *Tsc2* mTORC1'in kilit önemdeki upstream düzenleyicilerindendir ve Rheb GTPase için GTPase aktive eden protein olarak fonksiyon görürler. Rheb'in *GTP* bağlı formu direkt olarak mTORC1 ile etkileşimdedir ve onun kinaz aktivitesini tetikler. *Tsc* kompleksi Rheb'i *GDP* bağlı formuna çevirerek mTORC1 aktivitesini durdurur. (Inoki ve ark. 2003, Tee ve ark. 2003, Dibble ve ark. 2012). Ayrıca Ras sinyalleri ile aktive edilen *ERK1/2* ve ribozomal *S6K1* enzimleri *Tsc* kompleksini inhibe ederek mTORC1 aktivitesini destekler (Ma ve ark. 2005; Roux ve ark. 2004).

Akut büyüme faktörü sinyali olsa bile aminoasit yokluğu mTORC1 aktivitesini durdurur (Hara ve ark. 1998). mTORC1 aktivasyonu için gerekli aminoasit sinyal ağı lizozom lümen içerisinde başlar (Zoncu ve ark. 2011). Lizozomal lümen içerisinde biriken aminoasitler *v-ATPase* gerektiren bir sinyal ağını başlatır. Lizozom yüzeyinde *v-ATPase* direkt olarak "Ragulator" protein kompleksi ile etkileşime geçer (Sancak ve ark. 2010, Bar-Peled ve ark. 2012). Rag proteinleri GTP proteinlerine bağlanır. GTP bağlı Rag proteinleri RAPTOR alt birimine bağlanarak mTORC1'i sitoplazmadan

lizozom yüzeyine götürür. Burada bulunan Rheb ise mTORC1'i aktive eder (Kim ve ark. 2008; Sancak ve ark. 2008).

Glikoliz veya mitokondrial oksidatif fosforliasyonun inhibisyonu gibi olaylar sonucu hücrel enerji seviyesinin düşmesi AMP birikmesine yol açar. Bu da *AMPK*'yi aktifleştirir. Aktif olan *AMPK* iki farklı mekanizma ile mTORC1'i inhibe eder. İlkinde, *AMPK* direkt olarak *Tsc2*'yi fosforlar ve sonucunda mTORC1 inaktif olur. İkinci mekanizmada ise *AMPK* direkt olarak RAPTOR alt birimini fosforlar ve mTORC1'i inhibe eder. *Tsc2*'nin *AMPK* ile fosforlanması *Tsc2*'yi aktifleştirirken; *Akt* ile fosforlanması inhibe eder. Farklı sinyal ağlarında *Tsc2*'nin farklı şekilde fosforlanması mTORC1 aktivitesini hem inhibe hem de aktif edebilir (Evans ve ark. 2011).

Oksijen seviyesi mTORC1 aktivitesini birçok yolla etkiler. Hafif hipoksi durumunda *ATP* seviyesinde yaşanan düşme *AMPK*'yi aktive eder. *AMPK*, *Tsc* kompleksinin aktive olmasını sağlar. *Tsc* kompleksi de mTORC1 aktivitesini inhibe eder (Arsham ve ark. 2003; Liu ve ark. 2006). Hipoksi ayrıca bir hipoksi tepki geni olan *REDD1*'in transkripsiyonel düzenlenmesi ile de *Tsc* kompleksini aktifleştirebilir. *REDD1* *Tsc* kompleksini büyüme faktörleri etkisiyle ilişki kurduğu 14-3-3 proteinlerinden ayırarak mTORC1 aktivitesini bloklar (DeYoung ve ark. 2008).

mTORC1 sinyal yolağı ayrıca genotoksik stres, inflamasyon, *Wnt* sinyali ve *PA* tarafından da kontrol edilir. Genotoksik stres birçok yolla mTORC1 aktivitesini düşürebilir. Örneğin; DNA hasarıyla *p53*'ün aktivasyonu *AMPK*'yi aktifleştirir. Bu da *Tsc2*'yi aktive eder (Feng ve ark. 2005). Ayrıca *p53*; *PTEN* ve *Tsc2*'nin transkripsiyonunu artırarak da mTORC1'i inhibe edebilir (Stambolic ve ark. 2001, Feng ve ark. 2005). *TNF α* gibi pro-inflamator sitokinler *IKK β* 'yi aktive eder. *IKK β* *Tsc1*'i direkt inaktive eder. Bu da mTORC1'i aktifleştirir (Lee ve ark. 2007). *Wnt* sinyal yolağı da *Tsc* kompleksini aktifleştiren GSK3 enzimini inhibe ederek mTORC1'i aktifleştirir (Inoki ve ark. 2006). Son olarak fosfotidik asit (*PA*) ve *PA* üreten enzimlerin fazla ekspresyonunun mTORC1 sinyalini belirgin şekilde artırdığı görülmüştür (Foster 2007; Toschi ve ark. 2009).

Aktifleşen mTORC1; kinaz *S6K* ve translasyon düzenleyici *4E-BP1* proteinlerini fosforlayarak protein sentezini destekler (Ma ve Blenis 2009). Ayrıca *SREBP1* and *PPAR γ* transkripsiyon faktörlerini aktive ederek lipid biyogenezini başlatır (Laplante ve Sabatini 2009b). mTORC1'in en önemli işlevlerinden birisi de *ULK1–Atg13–FIP200* kompleksini fosforlayarak otofajiyi bloklamasıdır (Hosokawa ve ark. 2009).

mTORC2'nin plazma membranında MCT isimli bölmelerde, mitokondride, endoplazmik retikulumda, lizozomda yerleştiği rapor edilmiştir (Betz ve Hall 2013, Arias ve ark. 2015). MCTler plazma membranında içerisi proteinlerle dolu olan "eisosome" isimli bölmelerin hemen yanındadır. Hızla büyüyen hücrelerde mTORC2 alt birimi *Slm1/2* proteinleri MCT ve "eisosome" içerisinde yaklaşık eşit olarak bulunurlar. Lipid biyosentezinin inhibisyonu, hipotonik şok veya direkt bir mekanik manipülasyon ile artan membran gerilimi *Slm1/2* proteinlerinin eisosome bölmelerinden çıkıp MCT içerisinde birikmelerini sağlar. MCT içerisinde mTORC2'ye bağlanarak aktifleştirirler. (Berchtold ve ark. 2012, Niles ve ark. 2012). Ayrıca mTORC2; bir büyüme faktörü sinyali ürünü olan *Ptdlns(3,4,5)P3* proteinine bağlanarak da aktifleşebilir (Gan ve ark. 2011; Liu ve ark. 2015). Büyüme faktörleri mTORC2 alt birimlerinin fosforlanmasını sağlayarak aktifleştirebilir (Gaubitz ve ark. 2016). RICTOR alt biriminin asetilasyonu da mTORC2'nin aktifleşme yollarından biridir (Glidden ve ark. 2012, Masui ve ark. 2013).

mTORC2; *Akt*, *Sgk1* ve *PKC- α* gibi AGC kinazları turn ve hidrofobik motifleri üzerinden fosforlar (Shimada ve ark. 2013; Ikenoue ve ark. 2008; Guertin ve ark. 2006).

2.5. TOR'un İnsan Hastalıkları ile İlişkisi

TOR sinyal yolağının çeşitli insan hastalıkları ile yakından ilişkili olduğu saptanmıştır. Maya, sinek, fare ve solucanlarda yapılan çalışmalarda TOR sinyal yolağının yaşam süresini kontrol ettiği gösterilmiştir (Kenyon 2005). Ayrıca tip 2 diyabet ve kanser gibi hastalıklarda TOR sinyal yolağının düzenlenmesinde sorunlar gözlemlenmiştir (Brugge ve ark. 2007, Guertin ve Sabatini 2007). Kanser vakalarında mTOR aktivasyonu sıkça

rastlanan bir durum olmakla beraber özellikle mTOR'un negatif düzenleyicilerinin mutasyonları birincil kanser nedenlerindedir. Örneğin; Lenfanjiyoleyomiyomatozis, Tübero skleroz, Peutz–Jeghers sendromu, Cowden's sendromu (Benjamin ve ark. 2011). *mTOR*, özellikle mTORC1, besin ve enerji sensörü olarak görev alır. Böbrek, yağ doku, kas ve hipotalamus gibi metabolik önemi yüksek organlardaki TOR sinyal yolları besin alımı ve açlık (oruç gibi) durumlarında tüm vücut metabolizmasını düzenler. İnsanda sağlıklı durumdayken glikoz dengesi insülin ve *mTOR* sinyalleri ile düzenlenir. Fazla besin vücutta yağ doku içerisinde trigliserit olarak da depolanabilir. *mTOR* sinyal yolağı obezite ve yağ birikimini *PPAR γ* , *SREBP1* ve *SREBP2* transkripsiyon faktörleri aracılığıyla destekler (Benjamin ve ark. 2011). Kronik aşırı beslenme mTOR sinyalinin devamlı yüksek olmasına ve böylece tüm vücut metabolik düzenlenmesinin yoldan çıkmasına neden olur. Sonuç olarak da obezite ve tip 2 diyabet hastalıklarına yol açar. Uzun süreli *mTOR* sinyalinin baskılanması (besin sinyali ile tetiklenen) farelerde yaşam süresini uzattığı gözlemlenmiştir. Bu da insanda yaşam süresinin uzatılması konusunda yeni kapılar açmıştır (Benjamin ve ark. 2011).

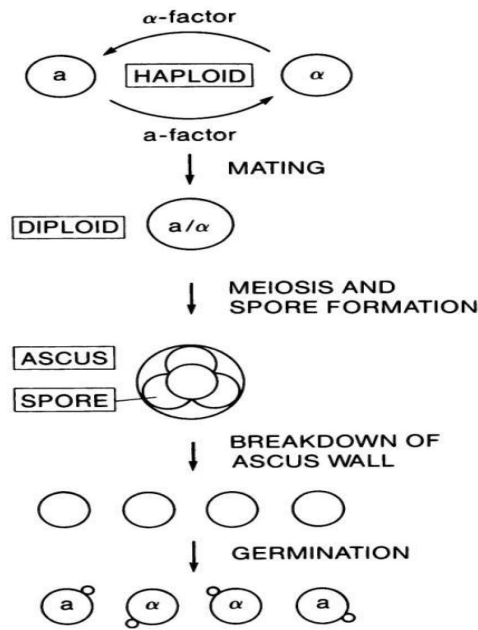
TOR sinyalleri bağışıklık sistemi için de önemli bir role sahiptir. Farelerde rapamycin ile *mTOR* inhibisyonunun dentritik hücrelerin farklılaşmasını ve hareketliliğini durdurduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca *mTOR* B hücrelerinin, doğal öldürücü hücrelerin çoğalması için de gereklidir. *mTOR*'un inhibisyonunun bu hücre tiplerinde çoğalmayı durdurduğu gözlemlenmiştir. *mTOR* inhibisyonunun tip 1 diyabet, sistemik lupus eritematozus, adjuvant artrit gibi birçok otoimmün hastalığı baskıladığı raporlanmıştır (Thompson ve ark. 2009).

2.6. Çalışmada Kullanılan Organizmalar

2.6.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Tek hücreli bir maya olan *Saccharomyces cerevisiae*, moleküler biyolojide en çok kullanılan ökaryotik model organizmalardan bir tanesidir. Fungi âleminin içerisindeki *Saccharomycetaceae* ailesinin bir üyesidir (Feldman 2012).

S. cerevisiae'nin yaşam döngüsü haploit ve diploit olmak üzere iki farklı evreden oluşur. Hem haploit hem de diploit evrede mitoz bölünme ile çoğalır. Ancak ortam şartları verimsiz olduğu takdirde diploit evredeyken mayoz ile spor oluşturabilirler. Haploit sayıda kromozom içeren hücreler a veya α tipi cinsiyete sahiptir. Bu hücreler sırasıyla – a veya $-\alpha$ tipi feromonlar salgırlar. Bu feromonların etkisiyle iki haploit hücre birleşerek diploit hücreyi oluştururlar. Ancak besin açlığı stres koşullarında mayoz bölünme ile spor oluştururlar (Dickinson 2004).

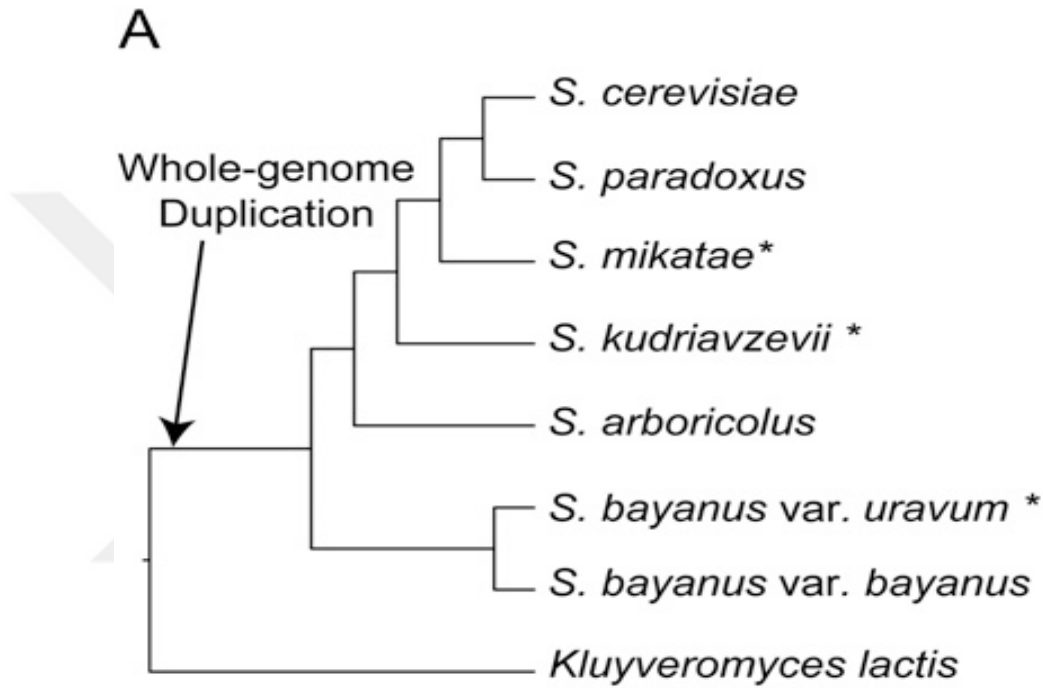


Şekil 2.4: *S. cerevisiae*'nin yaşam döngüsü (Herskowitz, 1988)

S. cerevisiae'nin optimum büyüme sıcaklığı 32⁰C civarındadır (Salvado ve ark. 2011). Tüm *S. cerevisiae* suşları aerobik ortamda glikoz, maltoz ve trehaloz varlığında büyüebilmelerine rağmen; laktozu besin kaynağı olarak kullanamazlar. Tüm *S. cerevisiae* suşları amonyak, üre, aminoasit ve peptidleri azot kaynağı olarak kullanabilirler (Domingues ve ark. 1999).

S. cerevisiae genomu yaklaşık 13392 kb büyüklüğünde olup 16 kromozom içerir. Ayrıca protein kodlayan gen sayısı 6000 tanedir (Feldman, 2012). Tüm genomunun

sekanslanmış olması, laboratuvarında hızlı ve kolay üretilebilmesi, haploit ve diploit hücre tiplerinin olması, genomunun kolayca manipüle edilebilmesi, GRAS özelliği olması, insanlar dâhil olmak üzere birçok canlıyla benzer sekans ve fonksiyona sahip protein içermesi onu en çok tercih edilen model organizmalardan birisi haline getirmiştir (Rudolf ve ark. 2009, Feldman 2012).



Şekil 2.5: *Saccharomyces* türlerinin filogenetik ilişkisi (Scannell ve ark. 2011)

2.6.2. *Saccharomyces bayanus*

S. bayanus, Fungi âlemi altındaki *Saccharomycetaceae* ailesinin bir üyesidir. Tıpkı *S. cerevisiae* gibi tomurcuklanarak çoğalır. *S. cerevisiae* ile aynı yaşam döngüsüne sahiptir. *S. cerevisiae* ile aynı kromozom sayısına sahiptir. Ancak sahip olduğu *AEP2* geni nedeniyle *S. cerevisiae* ile mitokondri özelinde farklılaşmıştır. *S. cerevisiae* anaerobik fermantasyonda özelleşmişken, *S. bayanus* aerobik solunumda daha iyidir (Greig ve Leu 2009). *S. cerevisiae*'ye göre daha düşük sıcaklıklarda büyümeye adapte

olmuştur. Optimal büyüme sıcaklığı yaklaşık 26-28⁰C civarındadır (Serra ve ark. 2005, Salvado ve ark. 2011).

2.6.3. *Saccharomyces mikatae*

S. mikatae, Fungi âlemi altındaki *Saccharomycetaceae* ailesinin bir üyesidir. Tıpkı *S. cerevisiae* gibi tomurcuklanarak çoğalır. *S. cerevisiae* ile aynı yaşam döngüsüne sahiptir. *S. cerevisiae* gibi 16 kromozoma sahiptir. Optimum büyüme sıcaklığı *S. bayanus*'a benzerdir (Salvado ve ark. 2011).

2.6.4. *Saccharomyces paradoxus*

S. paradoxus, Fungi âlemi altındaki *Saccharomycetaceae* ailesinin bir üyesidir. Tıpkı *S. cerevisiae* gibi tomurcuklanarak çoğalır. *S. cerevisiae* ile aynı yaşam döngüsüne sahiptir. *S. cerevisiae*'nın bilinen en yakın akrabasıdır. *S. cerevisiae* gibi 16 kromozomu vardır (Naumov ve ark. 1992). *S. cerevisiae* ile aynı optimum büyüme şartlarına sahiptir (Johnson ve ark. 2004).

2.6.5. *Mus musculus domesticus*

Mus musculus domesticus (ev faresi) memeliler sınıfı altında yer alan küçük bir kemirgendir. İnsanlarla yakın ilişkide yaşarlar. Yetişkin bir ev faresinin vücut uzunluğu 7.5-10 cm, kuyruk uzunluğu ise 5-10 m arasındadır. Ev farelerinin çok eşli bir üreme yaşamı vardır. Tüm yıl boyunca yavru dünyaya getirebilirler. Ortalama yaşam süresi 2 yıl olmasına rağmen 5 yıla kadar yaşayabilen bireyler gözlemlenmiştir. Vahşi hayatta bitki tohumu, kök, yaprak, böcek ve leş ile beslenirken; insan habitatı içerisinde ulaşabildikleri herhangi bir insan besinini tüketirler (Phifer-Rixey ve Nachman 2015).

Kapalı ortamlarda ucuz ve kolay bir şekilde yetiştirilebilmesi, hızlı bir şekilde üremesi, tek doğumda 5-10 yavru vermesi, tüm genomunun sekanslanmış olması, insanlarla %99 genom benzerliği taşıması, insanlarla ortak kalıtsal hastalıklar taşıması onu ideal bir model organizma yapmaktadır (Phifer-Rixey ve Nachman 2015, Guenet 2005). Genomu yaklaşık 2.6 Gb büyüklüğündedir ve 25000 civarı protein kodlayan gen taşır (Guenet 2005). Normal şartlarda DNAsı 2n=40 kromozomdan oluşmasına rağmen; sentromerik

bölgede telosentrik kromozomların füzyonu (Robertsonian düzenlenmeler) bu sayıyı $2n=22$ 'ye kadar düşürebilir (Solano ve ark. 2007).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. RNAseq Analizi

RNAseq (whole transcriptome shotgun sequencing) yeni nesil sekanslama yöntemlerinin kullanarak transkriptom profilleri oluşturarak analiz etmeye olanak veren bir yöntemdir. (Wang ve ark. 2009) RNAseq ile post-transkripsiyon modifikasyonlar, gen füzyon, mutasyonlar, tek nükleotid polimorfizm (SNP) ve gen ekspresyonundaki değişimler üzerine çalışmak mümkündür. (Wang ve ark. 2009)

- *Saccharomyces* RNAseq Dataları

DNAexus (<https://www.dnanexus.com/>) web sitesi üzerinde sunulan deneyler içerisinde “SRP013862” erişim numarasıyla Yulia Mostovoy tarafından paylaşılan “Expression evolution in gene groups: Inferring non-neutral regulatory change in pathways from transcriptional profiling data” başlıklı çalışmanın data setlerinden çeşitli *Saccharomyces* türlerindeki RNAseq verileri kullanıldı. (NCBI erişim numarası: GSE38875) *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. mikatae*, *S. paradoxus* ve bu türlerin ikili melezlerine (*S. cerevisiae* x *S. paradoxus*, *S. cerevisiae* x *S. mikatae*, *S. cerevisiae* x *S. bayanus*) ait RNAseq verileri indirildi. (Çizelge 3.1. ve Çizelge 3.2)

Çizelge 3.1: “Expression evolution in gene groups: Inferring non-neutral regulatory change in pathways from transcriptional profiling data” projesinde RNAseq analizi için kullanılan maya suşları (Schraiber ve ark. 2013)

Strain (Suş)	Tür	Genotip	Ebeveyn	Kaynak
<i>YHL068</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa/MATalpha</i> +/lys2Δ0 leu2Δ0/+ his3Δ1/+ met15Δ0/+ ura3Δ0/+	<i>BY4741</i> x <i>BY4716</i>	Baker Brachmann ve ark. 1998
<i>CBS 432</i>	<i>S. paradoxus</i>	<i>MATa/MATalpha</i>		Liti ve ark. 2009
<i>IFO 1815</i>	<i>S. mikatae</i>	<i>MATa/MATalpha</i>		Scannell ve ark. 2011
<i>CBS 7001</i>	<i>S. bayanus</i>	<i>MATa/MATalpha</i>		Scannell ve ark. 2011
<i>YYM014</i>	<i>S. paradoxus</i> x <i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa/MATalpha</i> +/lys2Δ0 ade2/+ ura3/+	<i>OZY361</i> x <i>BY4716</i>	Oliver Zill (Jasper Rine lab) ; Baker Brachmann ve ark. 1998
<i>YYM030</i>	<i>S. mikatae</i> x <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	<i>MATa/MATalpha</i> +/lys2Δ0 his3Δ/+	<i>JRY9175</i> x <i>BY4716</i>	Scannell ve ark. 2011; Baker Brachmann ve ark. 1998
<i>YYM015</i>	<i>S. bayanus</i> x <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	<i>MATa/MATalpha</i> +/lys2Δ0 his3/+ ura3/+	<i>JRY9191</i> x <i>BY4716</i>	Scannell ve ark. 2011; Baker Brachmann ve ark. 1998

Çizelge 3.2: İndirilen RNAseq Dataları ve Erişim Numaraları

RNAseq Dataları	NCBI SRA Erişim Numarası	NCBI GEO Erişim Numarası
<i>S. cerevisiae</i> (replika 1)	SRX155596	GSM951292
<i>S. cerevisiae</i> (replika 2)	SRX155597	GSM951293
<i>S. cerevisiae</i> (replika 3)	SRX155600	GSM951296
<i>S. cerevisiae</i> (replika 4)	SRX155601	GSM951297
<i>S. bayanus</i> (replika 1)	SRX155606	GSM951302
<i>S. bayanus</i> (replika 2)	SRX155607	GSM951303
<i>S. mikatae</i>	SRX155602	GSM951298
<i>S. paradoxus</i>	SRX155598	GSM951294
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. bayanus</i> (replika 1)	SRX272013	GSM1129460
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. bayanus</i> (replika 2)	SRX272014	GSM1129461
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. mikatae</i>	SRX272011	GSM1129458
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. paradoxus</i>	SRX272009	GSM1129456

- *Mus Musculus Domesticus* RNAseq Dataları

Mus musculus domesticus türü farelerin Almanya ve İran popülasyonlarından elde edilmiş farklı organlar için RNAseq dataları Max Planck Institute of Evolutionary Biology'den (Dr. Cemalettin Bekpen ve Prof. Dr. Diethard Tautz) temin edildi.

3.1.2. Deseq2 Analizi

<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>

RNAseq analizindeki sonuç datalarındaki genleri ekspresyon düzeylerindeki farklılığı tespit etmek için kullanılan bir yazılımdır. Negatif biomial dağılım modelini kullanarak sonuç verir.

3.1.3. Biyoinformatik Veri Tabanları

- University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser

<https://genome.ucsc.edu/>

UCSC Genome Browser; çalışmada kullanılan farklı canlıların TOR genlerinin sekans verilerine ulaşmak ve analiz etmek için kullanılmıştır. UCSC Genome Browser, University of California, Santa Cruz tarafından sunulan çevrimiçi hizmet veren bir veri tabanıdır. Kullanıcılara içerisinde omurgalı ve omurgasız birçok canlının genom sekans verileri, biyoinformatik analiz araçları (BLAT vb.) gibi olanaklar sunar. (Rosenbloom ve ark. 2015)

- *Saccharomyces* Genome Database (SGD)

www.yeastgenome.org/

SGD, *Saccharomyces cerevisiae* hakkında kapsamlı biyolojik bilgiler sunmanın yanı sıra arama ve analiz araçları (BLAST, GO Term Finder vb.) ile fungi alemi içerisindeki canlılar arasındaki genomik ilişkileri de aydınlatma imkanı verir (Cherry ve ark. 2012).

- Yeabstract

www.yeabstract.com/

Yeabstract; *S. cerevisiae* için transkripsiyon faktörleri ve hedef genleri içeren bir veri tabanıdır. Karakterize edilmiş 113 transkripsiyon faktörü için 326 spesifik DNA bağlanma bölgesinin açıklamasını içermektedir.

3.1.4. Biyoinformatik Araçlar

- BLAST

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

BLAST; aynı veya farklı tür canlılar arasında nükleotid veya protein dizilerinin karşılaştırılması için kullanılan bir hizalama algoritmasıdır. BLAST algoritması 1990 yılında Stephen Altschul ve arkadaşları tarafından National Institutes of Health (NIH)'de dizayn edilmiştir (Altschul ve ark, 1990).

- BLAT

<https://genome.ucsc.edu/FAQ/FAQblat.html>

BLAT (BLAST benzeri hizalama aracı) DNA, RNA ve protein gibi biyolojik sekansların karşılaştırılması ve analizi için 2000li yılların başında Jim Kent tarafından University of California Santa Cruz (UCSC) için geliştirilmiştir. (Kent, 2002) BLAT, homolog olma ihtimali yüksek kısa sekansları tespit eder ve sonrasında hizalayarak homolog bölgeleri ortaya çıkarır (Kent, 2002).

- FastQC

<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

FastQC; sekans datalarının kalite kontrolünü yapmak için tasarlanmış JAVA tabanlı bir yazılımdır.

- Trimmomatic

<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>

Trimmomatic; yeni nesil sekanslama datalarındaki okumaların kırılması için kullanılan bir yazılımdır.

- TopHat2

<https://ccb.jhu.edu/software/tophat/>

TopHat2, Cole Trapnell (University of Maryland, College Park) tarafından geliştirilmiş, RNAseq okumaları için kullanılan hızlı bir haritalama aracıdır. RNAseq okumalarını

Bowtie yazılımının altyapısını kullanarak genom üzerine haritalandırır. Daha sonra ise ekzonlar arasındaki “splice junctions” bölgelerini tanımlamak için haritalama sonuçlarını analiz eder.

- NextGenMap (NGM)

<http://cibiv.github.io/NextGenMap/>

NGM; esnek ve hızlı bir haritalama yazılımıdır. Tophat2’ye göre nispeten daha yeni bir yazılımdır. NGM, BWA’dan iki kat hızlı olmasının yanı sıra Stampy ve Bowtie2 kadar yüksek haritalama hassasiyetine sahip bir yazılıma sahiptir.

- FeatureCounts

<http://bioinf.wehi.edu.au/featureCounts/>

FeatureCounts; yüksek verimli genel amaçlı bir okuma özetleme aracıdır. Gen, ekzon, promotor gibi genomik bölgeler için haritalandırılmış okumaları sayar. Hem RNAseq hem de genomik DNAseq okumalarını saymak için kullanılabilir.

- Clustal Omega

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

İlgilenilen gen bölgelerinin sekanslarını karşılaştırmak çoklu hizalama yazılımıdır.

- Boxshade

http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html

çoklu hizalama sonuçlarının farklılık ve benzerliklerini görselleştirmek için kullanılan bir yazılımdır.

- R

<https://www.r-project.org/>

R istatistiksel hesaplama ve grafikler oluşturmak için dizayn edilmiş bir yazılım ortamıdır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. İnsan *mTOR* Sekansının Diğer Canlılarla Karşılaştırılması

Farklı canlı türleri arasındaki TOR genlerini karşılaştırmak için UCSC Genome Browser üzerinden insan mTOR mRNA sekansı (RefSeq erişim no: NM_004958.3) indirildi. Bu örnek sekans kullanılarak UCSC Genome Browser içerisinde yer alan memeli ve diğer canlıların referans genom sekansları üzerine yine aynı site içerisinde bulunan BLAT programı ile hizalama yapıldı.

3.2.2 *S. cerevisiae TOR1* ve *TOR2* Genlerinin Fungi Aleminde Karşılaştırılması

Daha sonraki adımda farklı maya türleri arasındaki benzerlikleri bulmak için SGD veri tabanı içerisinde yer alan *Saccharomyces cerevisiae* 288c türünün TOR1 (SGD no: S000003827) (<http://www.yeastgenome.org/locus/S000003827/overview>) ve TOR2 (SGD no: S000001686) (<http://www.yeastgenome.org/locus/S000001686/overview>) mRNA sekansları indirildi. Daha sonra bu sekanslar aynı veri tabanı aracılığıyla diğer *Saccharomyces* türleri ve bazı fungal türleri üzerine BLASTn (<http://www.yeastgenome.org/blast-fungal>) yazılımı kullanılarak hizalandı.

3.2.3 Mayalarda RNAseq Analizi

RNAseq analizi için kullanılacak transkriptom verilerini içeren deneyin (Schraiber ve ark. 2013) verilerine <http://sra.dnanexus.com/studies/SRP013862/experiments> linki üzerinden ulaşıldı. İhtiyaç duyulan RNAseq dosyaları “wget” komutu ile indirildi. İndirilmiş olan sra uzantılı dosyalar fastq uzantılı dosyalara çevrildi. Bu fastq dosyaları “gunzip” komutu ile sıkıştırıldı ve FastQC ile sekans okumalarının kalite kontrolü yapıldı. Daha sonra sekans okumalarını kırmak için ise Trimmomatic programı kullanıldı.

Haritalandırma işleminde kullanılacak olan *S. cerevisiae* referans genom datası (SGD üzerinde 2011 yılında yayınlanan *S. cerevisiae* 288c suşuna ait “sacCer3” isimli genom datası) ftp://igenome:G3nom3s4u@ussd-ftp.illumina.com/Saccharomyces_cerevisiae/UCSC/sacCer3/Saccharomyces_cerevisiae_UCSC_sacCer3.tar.gz linki kullanılarak “wget” komutu ile indirildi.

Kırpılan sekansların referans genom üzerine haritalandırılması için ise en yaygın kullanılan haritalandırma programlarından TopHat2 ve NGM seçildi. Hangisinin kullanılmasına karar vermek için *S. cerevisiae* ve *S. bayanus* sekansları her iki program ile de haritalandırıldı. Her iki program için de başarılı haritalandırma oranını görmek için “samtools” komutu kullanıldı. Daha sonraki aşamalar için NGM programı seçilerek her bir örnek referans genom üzerine haritalandırıldı.

S. cerevisiae genomu üzerindeki gen setlerini içeren anotasyon dosyası ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-84/gtf/saccharomyces_cerevisiae/ linki kullanılarak indirildi. Daha sonra her bir gen lokusu üzerine haritalandırılmış kaç tane sekans okuması olduğu sayabilmek için FeatureCounts programı kullanıldı. FeatureCounts ile anotasyon dosyası içindeki gen setlerine isabet eden sekans okumaları sayıldı. Bu aşamadan sonra “grep” kodu kullanılarak *TOR1* ve *TOR2* gen bölgeleri için kaç tane eşleşme olduğu bakıldı. Bu işlem her bir replika için tekrar edildi. Çıkan sonuçlar *Saccharomyces* türleri için belgelenmiş housekeeping genler (*AL9*, *ACT1*, *CDC19*, *CCW12*, *FBA1*, *HHO1*, *PGK1*, *TEF1*, *TPI1*, *TDH3*, *UBC6*) kullanılarak normalize edildi (Teste ve ark. 2009; Cankorur-Çetinkaya ve ark. 2012).

RNAseq analizi için kullanılan örnek komutlar ve işlevleri aşağıda listelenmiştir:

- Linkteki dosyayı indirmek için;

```
wget ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-84/gtf/saccharomyces\_cerevisiae/
```

- .sra uzantılı dosyaları -fastq uzantılı dosyalara çevirmek için;

```
fastq-dump.2.5.2 *.sra
```

- .sra uzantılı tüm dosyaları silmek için;

```
rm *.sra
```

- Belirtilen dosyayı sıkıştırmak için;

```
gzip filename.fastq
```

- Trimmomatic programında belirtilen sekans dosyasını (SRR515220.fastq.gz) single-end olarak kırpma için;

```
java -jar /opt/biosoftware/Trimmomatic/Trimmomatic-0.30/trimmomatic-0.30.jar SE -phred33 SRR515220.fastq.gz cerevisiae_trimmed_fastq.gz ILLUMINACLIP:/opt/biosoftware/Trimmomatic/Trimmomatic-0.30/adapters/TruSeq2-PE.fa:2:30:10 CROP:36 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15
```

- TopHat2 programında seçilen sekans dosyasını referans genom üzerine haritalandırmak için;

```
tophat2 -p 5 -o ./tophat_out/S_cer ./yeast_index/Saccharomyces_cerevisiae/UCSC/sacCer3/Sequence/Bowtie2Index/genome cerevisiae_trimmed_fastq.gz
```

- NGM programında seçilen sekans dosyasını referans genom üzerine haritalandırmak için;

```
ngm -r sacCer3.fa -q cerevisiae_trimmed_fastq.gz -o ./ngm_out/S_cer.sam --strata 1 --silent-clip -t 4
```

- .sam uzantılı dosyayı (S_cer.sam) .bam uzantılı dosyaya (S_cer.bam) çevirmek için;

```
samtools view -Sb S_cer.sam > S_cer.bam
```

- Dosya (cerevisiae_trimmed_fastq.gz) içerisindeki satır sayısını görmek için;

```
zcat cerevisiae_trimmed_fastq.gz | wc -l
```

- Ngm ile haritalandırma sonucunda oluşturulan dosyadaki (S_cer.bam) başarılı haritalandırma sayısını ve oranını görmek için;

```
samtools flagstat S_cer.bam
```

- TopHat2 ile haritalandırma sonucunda oluşturulan dosyadaki başarılı haritalandırma sayısını görmek için;

```
samtools flagstat accepted_hits.bam
```

- FeatureCounts programı ile her bir gen bölgesine isabet eden okuma sayısını görmek için;

```
/home/rneme/software/subread-1.4.5-p1-Linux-x86_64/bin/featureCounts -T 2 -  
a S_cer_Anno_84.gtf -o yeast_read_count.out *.bam
```

- Girilen kelimenin (YER130C) seçilen dosya (yeast_read_count.out) içerisinde kaç tane olduğunu saymak için;

```
grep YER130C yeast_read_count.out
```

3.2.4 Mayalarda RNAseq Sonuçlarının Deseq2 Analizi

Deseq2 için ilk olarak R programı kuruldu ve Deseq2 kütüphanesi indirildi. *S. bayanus* ve *S. bayanus x S. cerevisiae* hibritlerindeki genlerin *S. cerevisiae*'ya göre ekspresyon seviyeleri Deseq2 ile analiz edildi. Analiz öncesi *S. cerevisiae* dataları “untreated” olarak, diğer datalar “treated” olarak isimlendirildi. Deseq2 için kullanılan komutlar sırasıyla aşağıdaki gibidir:

- Deseq2 kütüphanesini indirmek için;

```
source('http://bioconductor.org/biocLite.R')
```

```
biocLite('DESeq2')
```

- Deseq2 kütüphanesini açmak için;

```
library('DESeq2')
```

- Kullanılacak data dosyalarını programa tanıtmak için;

```
directory<-'C:/Users/ASUS/Desktop/Naci_data/Cer_vs_bay'
```

```
sampleFiles<-grep('treated',list.files(directory),value=TRUE)
```

```
sampleCondition<-
```

```
c('treated','treated','treated','treated','untreated','untreated','untreated','untreated')
```

- Tablo oluşturmada kullanılacak data iskeleti oluşturmak için;

```
sampleTable<-data.frame(sampleName=sampleFiles,      fileName=sampleFiles,  
condition=sampleCondition)
```

- Logaritmik hesaplamalar için gerekli ayarlamalar için;

```
ddsHTSeq<-DESeqDataSetFromHTSeqCount(sampleTable=sampleTable,  
directory=directory, design=~condition)
```

```
colData(ddsHTSeq)$condition<-factor(colData(ddsHTSeq)$condition,  
levels=c('untreated','treated'))
```

- Deseq2 analizini başlatmak için;

```
dds<-DESeq(ddsHTSeq)
```

```
res<-results(dds)
```

```
res<-res[order(res$padj),]
```

```
head(res)
```

- Farklı şekilde eksprese olmuş genleri göstermek için log2 değişim grafiği çizmek için;

```
plotMA(dds,ylim=c(-2,2),main='DESeq2')
```



```
dev.copy(png,'deseq2_MApplot.png')
```

```
dev.off()
```

- Tablo oluşturmak ve kaydetmek için;

```
mcols(res,use.names=TRUE)
```

```
write.csv(as.data.frame(res),file='sim_condition_treated_results_deseq2.csv')
```

3.2.5 Mayalarda *TOR1* Geni Promotor Bölgesi Karşılaştırılması

UCSC ve SGD üzerinden *S. cerevisiae* ve *S. bayanus* TOR1 promotor bölgesi sekansları elde edildi. Bu sekanslar Clustal Omega ile çoklu şekilde hizalandı ve Boxshade kullanılarak sekans farklılıkları renklendirildi.

TOR1 promotor bölgelerine bağlanan transkripsiyon faktörlerini bulmak için Yeastract sitesi üzerinden olası transkripsiyon faktörleri ve bağlandıkları DNA motifleri elde edildi. Bu olası transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon düzeyleri RNAseq sonuçlarından kontrol edildi. Ekspresyon farklılığı görülen transkripsiyon faktörleri seçildi. *S. cerevisiae* ve *S. bayanus* için seçilen Gln3, Msn2, Msn4, Rph1, Gis1, Gcr1, Fkh2 ve YER130C transkripsiyon faktörlerinin promotor bölgeleri SGD içerisinde elde edildi. Böylece bu faktörlerin promotor bölgelerine bağlanan diğer transkripsiyon faktörlerine Yeastract üzerinden ulaşıldı.

3.2.6 *Mus Musculus Domesticus* için RNAseq Analizi

Mus musculus domesticus için referans genom datası UCSC üzerinden ftp://igenome:G3nom3s4u@ussd-ftp.illumina.com/Mus_musculus/UCSC/mm10/Mus_musculus_UCSC_mm10.tar.gz

link kullanılarak indirildi. Bundan sonraki aşamalar için mayalarda kullanılan protokolün aynısı uygulandı. Her bir farklı dokunun farklı bireyler için ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı. Böylece iki farklı popülasyona ait bireylerde dokulara özgü TOR1 ekspresyon düzeyleri elde edildi.



4. BULGULAR

4.1. İnsan *mTOR* Sekansının Diğer Canlılarla Karşılaştırılması

İnsan *mTOR* mRNA sekansının UCSC veri tabanında bulunan referans primat genomları üzerine BLAT ile hizalanmasıyla elde edilen bulgular aşağıdaki gibidir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1: İnsan *mTOR* sekansının primatlar üzerine BLAT ile hizalanması.

Referans canlı	Nükleotid eşleşme sayısı	Benzerlik yüzdesi (%)
İnsan	8725	100
Bonobo	8725	99,7
Şempanze	8725	99,7
Goril	8725	99,7
Orangutan	8725	99
Gibon	8720	99
Makak	8721	98,2
Babun	8614	98,2
Marmoset	8721	97,2
Sincap maymunu	8721	97,2
Fare lemuru	8716	94,4
Tarsier	8721	94
Galago	8711	94

İnsan *mTOR* mRNA sekansının UCSC veri tabanında bulunan primat dışındaki memeli referans genomları üzerine BLAT ile hizalanmasıyla elde edilen bulgular aşağıdaki gibidir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2: İnsan *mTOR* sekansının primat dışındaki memeliler üzerine BLAT ile hizalanması.

Referans canlı	Nükleotid eşleşme sayısı	Benzerlik yüzdesi (%)
Alpaka	8712	93,1
Armadillo	8718	93,1
At	8716	94
Büyük yarasalar	4450	93,3
Köpek	8715	92,6
Koyun	8714	92,2
Küçük yarasalar	8601	93,6
Küçük yarasalar	2887	94,6
Çin hamsteri	8619	91,5
Çıplak kör fare	8714	92,8
Dağ gelinciği	8714	91,7
Domuz	8714	91,6
Fare	8711	91,1
Fil	8714	93,4
Gergedan	8714	94,4
Gine domuzu (kobay)	8714	92,1
İnek	8714	92,7
Islıklı tavşan	8714	91,6
Kanguru	8708	92,4

Çizelge 4.2 (devam): İnsan *mTOR* sekansının primat dışındaki memeliler üzerine BLAT ile hizalanması.

Referans canlı	Nükleotid eşleşme sayısı	Benzerlik yüzdesi (%)
Kedi	8713	92,3
Keseli sıçan	7919	88,33
Kır sıçanı	4104	92,1
Kır sıçanı	2619	92,9
Kirpi	8565	90,1
Manati (denizayısı)	8714	93,5
Minke balinası	8714	93,1
Ornitorenk	8422	88,1
Panda	8710	92,4
Sıçan	8716	91,7
Sincap	8716	93,2
Sivri fare	8581	88,7
Sivri sincapçık	6525	93,5
Tavşan	8714	92
Tazmanya canavarı	8076	88,4
Tembel hayvan	2494	93,2
Tenrek	8714	91,6
Wallaby	4610	88,5
Wallaby	3216	89,4
Yunus	5825	93,8

İnsan mTOR mRNA sekansının UCSC veri tabanında bulunan memeliler dışındaki omurgalıların referans genomları üzerine BLAT ile hizalanmasıyla elde edilen bulgular aşağıdaki gibidir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3: İnsan *mTOR* sekansının memeliler dışındaki omurgalılara BLAT ile hizalanması.

Referans canlı	Nükleotid eşleşme sayısı	Benzerlik yüzdesi (%)
Hint bülbülü	7404	86,3
Galapagos orta boy ispinozu	7111	86,7
Hindi	8278	85,9
Tavuk	7386	86,3
Kahverengi kivi	7662	86,1
Muhabbet kuşu	7662	85,9
Boyalı kaplumbağa	7671	87,5
Amerikan aligatoru	7322	86,4
Kertenkele	6968	86,6
Balon balığı	5984	85,4
Zebra balığı	6373	85,5
Atlantik morinası	5963	84,7
Medaka	6781	85,4
Nil tilapia	7084	84,4
Dikenli balık	6760	85,5
koelakant	7093	86,3
Fil köpek balığı	7057	85,3

İnsan mTOR sekansının omurgasızlara BLAT ile hizalanması ile elde edilen bulgular aşağıdaki gibidir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4: İnsan *mTOR* sekansının omurgasızlara BLAT ile hizalanması.

Referans canlı	Nükleotid eşleşme sayısı	Benzerlik yüzdesi (%)
Sivrisinek (anofel)	5498	71
Deniztavşanı	5921	83,8
<i>Drosophila sechellia</i>	5156	69,2
<i>Drosophila simulans</i>	4496	69,1
<i>Drosophila grimshawi</i>	2298	68
<i>Drosophila erecta</i>	4687	64,1
<i>Drosophila melanogaster</i>	5525	70,7
<i>Drosophila mojavensis</i>	2295	72,1
<i>Drosophila persimilis</i>	4970	70,4
<i>Drosophila yakuba</i>	2873	73,6
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	2018	75,6
<i>Xenopus tropicalis</i>	4550	83
<i>Xenopus tropicalis</i>	2605	87,9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	---*	---
<i>Pristionchus pacificus</i>	---	---
<i>Apis mellifera</i> (bal arısı)	---	---
<i>Ciona intestinalis</i>	---	---
<i>Caenorhabditis elegans</i>	---	---
<i>Caenorhabditis japonica</i>	---	---
<i>Drosophila ananassae</i>	---	---
<i>Drosophila pseudoobscura</i>	---	---
<i>Drosophila virilis</i>	---	---
Bufa balığı	---	---

---*: Veri tabanındaki problem nedeni ile eşleştirme yapılamamıştır.

4.2. *S. cerevisiae* TOR1 ve TOR2 Genlerinin Fungi Aleminde Karşılaştırılması

S. cerevisiae TOR1 ve TOR2 mRNA sekanslarının *S. cerevisiae* suşları üzerine BLAST ile hizalanması sonucu her iki genin de suşlar arasında en az %99 oranında korunduğu bulunmuştur (Çizelge 4.5). Ayrıca her bir suş için TOR1 ve TOR2 genlerinin birbirine benzerliği için %67 bulunmuştur.

Çizelge 4.5: *S. cerevisiae* TOR1 ve TOR2 sekansının farklı *S. cerevisiae* suşları üzerine BLAST ile hizalanması.

Referans Canlı	TOR1		TOR2	
	Nükleotid eşleşme sayısı	Benzerlik yüzdesi (%)	Nükleotid eşleşme sayısı	Benzerlik yüzdesi (%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	7413	100	7425	100
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303	7413	100	7423	99
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> EC1118	7405	99	7402	99
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JAY291	7402	99	7403	99
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Vin13	7406	99	7403	99
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK113-7D	7396	99	7424	99

Çizelge 4.5 (devam): *S. cerevisiae* TOR1 ve TOR2 sekansının farklı *S. cerevisiae* suşları üzerine BLAST ile hizalanması.

Referans Canlı	TOR1		TOR2	
	Nükleotid eşleşme sayısı	Benzerlik yüzdesi (%)	Nükleotid eşleşme sayısı	Benzerlik yüzdesi (%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> FostersB	7372	99	7405	99
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZTW1	7384	99	7413	99
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> FostersO	7370	99	7405	99
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IR-2	7369	99	7416	99
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NAM34-4C	7368	99	7408	99
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> M3836	7365	99	7415	99
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NY1308	7365	99	7402	99
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> M3839	7365	99	7415	99
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> M3707	7365	99	7415	99
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Sigma1278b	7365	99	7425	100

S. cerevisiae TOR1 ve TOR2 referans sekanslarının diğer *Saccharomyces* ve Fungi suşları üzerine BLAST ile hizalanmasıyla elde edilen bulgular aşağıdaki gibidir (Çizelge 4.6).

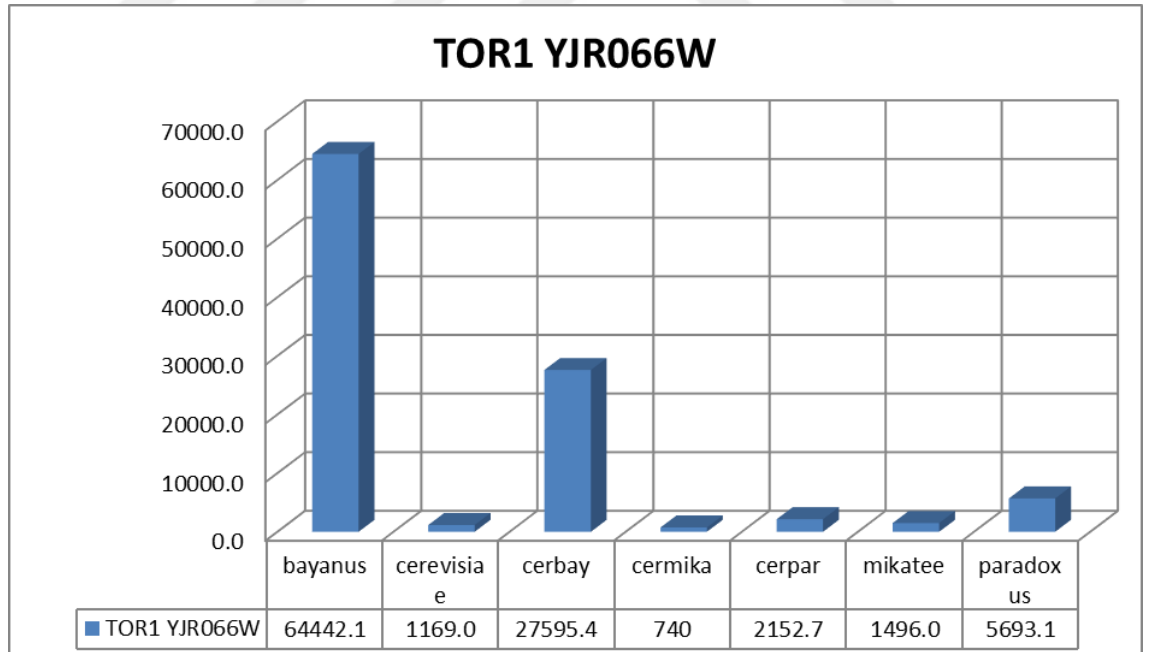
Çizelge 4.6: *S. cerevisiae* TOR1 ve TOR2 sekansının farklı *Saccharomyces* ve fungi suşları üzerine BLAST ile hizalanması.

Referans Canlı	TOR1		TOR2	
	Nükleotid eşleşme sayısı	Benzerlik yüzdesi (%)	Nükleotid eşleşme sayısı	Benzerlik yüzdesi (%)
<i>Saccharomyces bayanus</i> 623-6C	6130	82	6142	82
<i>Saccharomyces bayanus</i> MCYC 623	6130	82	6142	82
<i>Saccharomyces mikatae</i> IFO 1815	5450	86	6393	86
<i>Saccharomyces paradoxus</i> NRRL Y-17217	6757	91	6780	91
<i>Saccharomyces pastorianus</i> CCY48 – 91	7363	99	7403	99
<i>Candida albicans</i> WO-1	3942	65	3793	66
<i>Candida albicans</i> A155	3987	65	3791	66
<i>Saccharomyces (lachancea) kluyveri</i> NRRL Y-12651	5312	68	5162	70

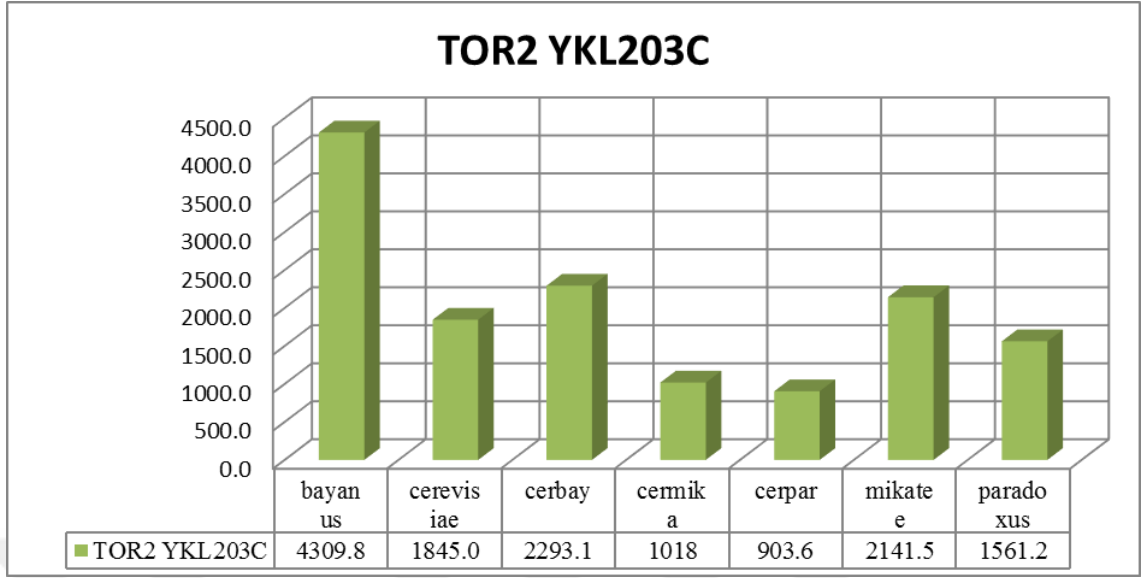
4.3. Mayalarda RNAseq Analizi

TopHat2 ve NGM programlarını test etmek için, *S. cerevisiae* ve *S. bayanus* RNAseq dataları *S. cerevisiae* referans genomu üzerine her iki programla da haritalandırıldı. NGM *S. cerevisiae* için %92,78, *S. bayanus* için ise %69,14 oranında başarılı haritalandırma gerçekleştirdi. Tophat2 ise *S. cerevisiae* için %86,67, *S. bayanus* için ise %28,78 başarı oranı ile haritalandırma gerçekleştirdi. Bu sonuçlara göre NGM'in özellikle farklılık oranı daha fazla olan türler arasındaki haritalandırma için Tophat2'den çok daha başarılı bir araç olduğu görüldü. Bu sebeple çalışmada kullanılmak üzere NGM seçildi.

Her bir replika NGM ile haritalandırılıp, TOR1 ve TOR2 gen bölgeleri için isabet eden sekans okumaları sayıldı. Sonuçlar housekeeping genlere göre normalize edildi. Böylece TOR1 ve TOR2 genlerinin farklı türlerdeki ekspresyon seviyeleri tespit edildi (Şekil 4.1, Şekil 4.2).



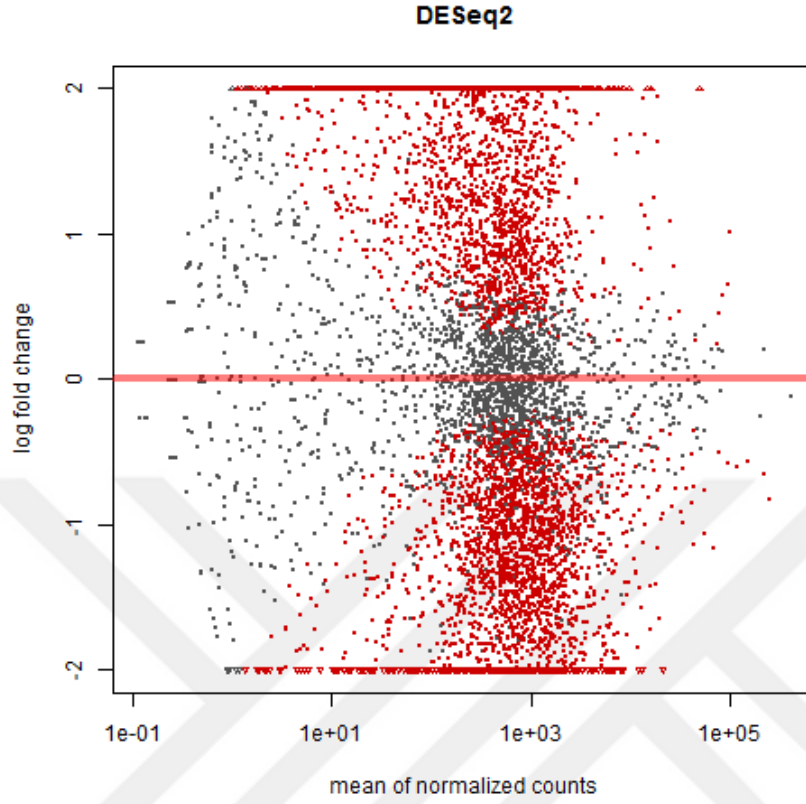
Şekil 4.1: TOR1 geninin farklı *Saccharomyces* türlerindeki ekspresyon seviyesi



Şekil 4.2: TOR2 geninin farklı *Saccharomyces* türlerindeki ekspresyon seviyesi

4.4. Mayalarda RNAseq Sonuçlarının Deseq2 Analizi

Deseq2 analizi sonucunda %5 fdr ile *S. bayanus* genomundaki genlerin ekspresyon düzeylerinin *S. cerevisiae*'ye göre büyük oranda farklılık gösterdiği görüldü (Şekil 4.3). *TOR1* geni, ekspresyonu görece en yüksek 25'inci gen olarak bulundu. Ayrıca TORC1 ile ilişkili KSP1 ve Cdc42 regülatörü olan *BUD3* genlerinin de *S. cerevisiae*'ye göre fazla eksprese edildiği saptandı. Ayrıca *RGT2* (yüksek glikoz sensörü), *DED1* (RNA helikaz), *Hxt14* (düşük glikozda aktive olan transport proteini), *HOF1* (aktin organizasyonu ve sitokinez), *TIP1* (ısı şokuyla transkripsiyonu uyarılan hücre duvarı proteini), *OSWI* (sporlaşmada dış spor duvarındaki protein) gibi çeşitli genlerin de *S. cerevisiae*'ye göre daha fazla eksprese olduğu görüldü.



Şekil 4.3: Deseq2 log2 değişim grafiği

4.5 Mayalarda TOR1 Geni Promotor Bölgesi Karşılaştırılması

Ekspresyon düzeylerindeki farklılığı daha iyi anlayabilmek için *S. cerevisiae* ve *S. bayanus* için TOR1 geni promotor bölgesi sekansları çoklu hizalama yapıldı. *S. bayanus*' da *S. cerevisiae*'ye göre promotor bölgesinin 3' ucunda önemli bir kısmın silindiği görüldü (Şekil 4.3).

```

BAYANUS      1  -GGATGCTGCTTTCTTGCTCAATGGGAGGCCTTGCACTGAGGGCATAT-CTTGATTAA
CEREVISIAE   1  TGAATCTAATTCTTGCTCAATCGTGAGGCCTTAC-GGTAGGGCCAATTCTTGATTAA

BAYANUS      59 CCTCTCTCATGT-TCTT-GTTGAAACTTTTGAAAAGGGGTTTCGCC-TTTGAAAGCCG
CEREVISIAE   60 CTACTCTCATATATTTTGTGTTGAAACTTTTGAAAAGGGGTTTCGCCATTTGAGCCG

BAYANUS     116 CGGAGAGCCGGGTGACGCTTGAAAAAGTCCTTATCGAAGGAG-TTGA--AGCCT--GT-A
CEREVISIAE  120 CGGACAGCCGGGTGACTACTGAAAG--TCCTTATCGAAGGCTCTTCTTGAGCTTACGTTA

BAYANUS     170 ATAGAGAGCCCAATCATGAACTT-ACGAGAGC-T-ATTAGGAG-GAGCAAAC---AGA--
CEREVISIAE  178 AAAAAAGAGCCATAGTAGCTTCA---CGAGAGAGTCATTGGTAAAGTGAACATACATCAA

BAYANUS
CEREVISIAE  235 -----
          CCGGCTAGCAGGTTGCATTGATA

```

Şekil 4.4: *S. cerevisiae* ve *S. bayanus* TOR1 promotor bölgesi çoklu hizalama

Bu sekans farklılığının gen ekspresyonuna nasıl etki ettiğinin daha iyi anlayabilmek için her iki sekansa bağlanabilecek olası transkripsiyon faktörleri ve bu faktörlerin bağlandığı DNA motiflerinin listesi çıkarıldı (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7: *S. cerevisiae TOR1* promotör bölgesi için olası transkripsiyon faktörleri.

Transkripsiyon Faktörü	DNA Motifi	Pozisyon	Strand
Ash1p	YTGAT	-207	F
Ash1p	YTGAT	-5	F
Ash1p	YTGAT	-23	R
Bas1p, Gcn4p	TGACTC	-47	R
Gat1p, Gln3p, Gzf3p	GATAAG	-105	R
Gcn4p	TGACTMT	-47	R
Gcn4p	RRTGACTC	-45	R
Gis1p, YER130C	AGGGG	-163	F
Hap2p, Hap3p, Hap4p, Hap5p	TNATTGGT	-50	F
Mot3p	TAGGAT	-248	R
Msn2p, Msn4p, Nrg1p, Rph1p	CCCCT	-158	R
Rtg1p, Rtg3p	GTCAC	-122	R
Stb5p	CGGNS	-138	F
Ste12p	TGAAACA	-38	F

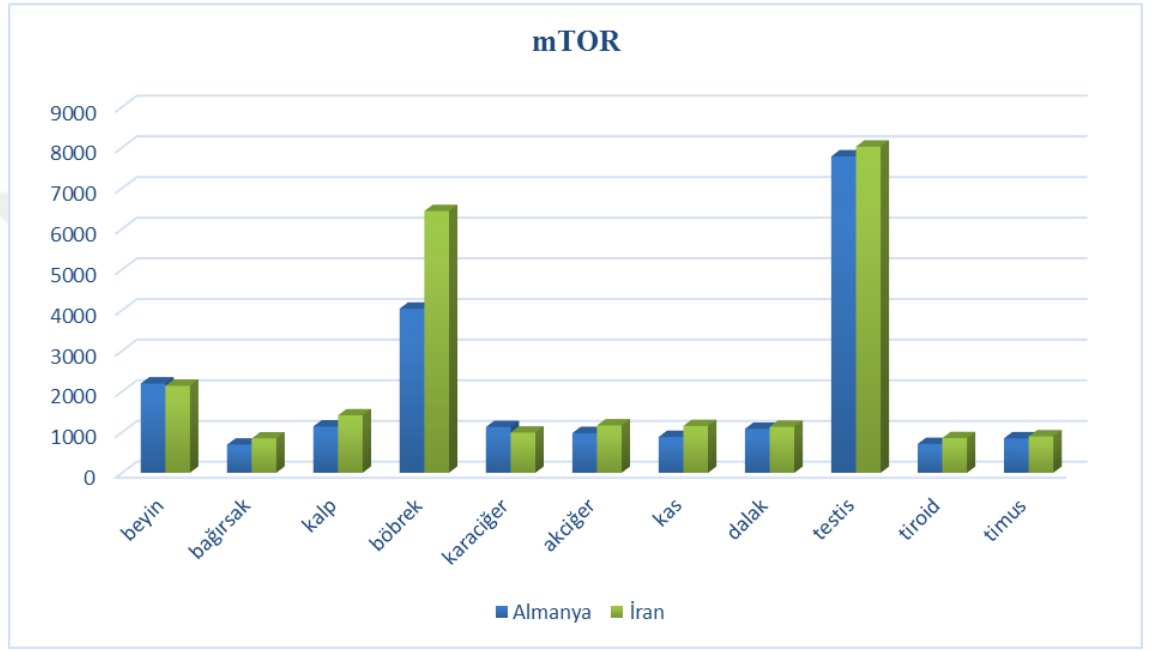
Çizelge 4.8: *S. bayanus TOR1* promotor bölgesi için olası transkripsiyon faktörleri.

Transkripsiyon Faktörü	DNA Motifi	Pozisyon	Strand
Ash1p	YTGAT	-171	F
Crz1p	GAGCCC	-46	F
Fkh1p, Fkh2p	RYMAAYA	-9	F
Gat1p, Gln3p, Gzf3p	GATAAG	-70	R
Gcr1p	CWTCC	-215	R
Gis1p, YER130C	AGGGG	-129	F
Mcm1p	DCCYWWNNRG	-193	R
Mcm1p	CCYWWNNRG	-194	R
Msn2p, Msn4p, Nrg1p, Rph1p	CCCCT	-124	R
Nrg1p	CCCTC	-177	R
Rtg1p, Rtg3p	GTCAC	-89	R
Stb5p	CGGNS	-105	F
Stp1p, Stp2p	CGGCTC	-95	R

S. bayanus ve *S. cerevisiae* için transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde *S. bayanus* için *Gln3*, *Msn2*, *Msn4*, *Rph1*, *Gis1*, *Fkh2*, *Gcr1* ve *YER130C* faktörlerinin belirgin şekilde fazla eksprese olduğu görüldü. Ayrıca Yeasttract sitesinden olası transkripsiyon faktörleri incelendiğinde bu faktörlerin birbirlerinin transkripsiyonunu etkileyebileceği görüldü.

4.6. *Mus Musculus Domesticus* için RNAseq Analizi

İki farklı popülasyona ait bireylerin RNAseq sonucunda böbrek dışındaki mTOR ekspresyon düzeyleri benzer olduğu görüldü. Ancak böbrek için İran popülasyonuna ait bireyde ekspresyon belirgin şekilde daha fazla çıktı (Şekil4.6).



Şekil 4.5: *Mus musculus domesticus* İran ve Almanya popülasyonlarına ait iki bireyde farklı dokularda mTOR ekspresyon düzeyi karşılaştırılması

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İlk aşama olarak insan *mTOR* mRNA sekansının UCSC veri tabanındaki farklı primatların referans genomlarına BLAT ile hizalanması sonucu çıkan sonuçlara göre *mTOR* primatlar arasında çok yüksek oranda korunmuş durumdadır. İnsan, bonobo, şempanze, goril ve orangutanda eşleşen nükleotid sayıları aynıdır. *mTOR* geninde benzerliklerin sıralaması daha önce raporlanan primatların filogenetik ilişkisi ile paralellik göstermektedir (Perelman ve ark. 2011, Rogers ve Gibbs 2014). İnsanın evrimsel olarak en yakın akrabalarında benzerlik oranı maksimumken, görece uzak akrabalarda benzerlik oranı %94'e kadar düşmüştür.

Primatlar dışındaki memelilere hizalanınca çıkan sonuçlar ise memeliler sınıfının genelinde *mTOR* geninin çok yüksek oranda korunduğunu göstermiştir. Alpaka, armadillo, at, koyun, gergedan, fil, sincap gibi memelilerde hem nükleotid eşleşme sayısı hem de benzerlik oranı primatlarla aynı seviyededir. Ayrıca memelilerde bazı canlılarda kısmi gen duplikasyonu olduğu görülmüştür. Küçük yarasada, kır sıçanında, wallaby'de kısmi gen duplikasyonları görülmüştür. Bu gen duplikasyonları veri tabanı hatası da olabileceği gibi doğru da olabilir.

Memeliler dışındaki omurgalılara hizalanması sonucunda eşleşen nükleotid sayılarında düşme gözlemlense de benzerlik oranı %85 civarındadır. *mTOR* geninin farklı türlerde nükleotid sayısının değişmesi evrimsel süreçte beklenen bir sonuçtur. Delesyonlar, insersiyonlar, duplikasyonlar her zaman olasılık dâhilindedir. Memeliler sınıfında *mTOR* geninin nükleotid sayısında değişiklikler görülse de benzerlik oranı çok yüksek seviyededir. Bu da *mTOR* geninin evrimsel süreçte çok iyi korunduğunu göstermektedir.

İnsan *mTOR* sekansının omurgasızlarla karşılaştırılmasında eşleşen nükleotid sayısı doğal olarak düşüş yaşamıştır. Farklı *Drosophila* türlerinde eşleşen nükleotid sayıları değişkenlik göstermektedir. Birbirlerine çok yakın olan bu türlerde sonucun böyle çıkması büyük olasılıkla veri tabanı problemi. Ayrıca bazı türlerde benzerlik bulunamamıştır. Bu da veri tabanı problemi olarak değerlendirilebilir.

Mayalarda bilindiği üzere tüm genom duplikasyonu sebebiyle 2 farklı *TOR* geni bulunmaktadır. *S. cerevisiae* 288c suşuna ait *TOR* sekansı diğer *S. cerevisiae* suşlarına BLAST ile hizalanması sonucunda %99 ve üzerinde benzerlik bulundu. Suşlar arasında nükleotid sayısında çok ufak değişimler vardır. Açıkçası *S. cerevisiae* gibi çok sayıda alt tür barındıran bir tür için bu beklenen bir sonuçtur. Her şeye rağmen her birinde benzerlik oranı %99 sınırını aşmıştır.

Ayrıca *S. cerevisiae* 'da her bir tür için *TOR1-TOR2* benzerliği %67 çıkmıştır. Bu sonuç da daha önce raporlanan benzerlik oranını doğrulamaktadır (Schmelzle ve ark. 2002).

S. cerevisiae diğer *Saccharomyces* türleriyle karşılaştırıldığında, *S. bayanus* ile benzerlik oranı %82, *S. mikatae* ile %86, *S. paradoxus* ile %91 çıkmıştır. Bu sonuçlar da *Saccharomyces* türlerinin raporlanan filogenetik ilişkisi ile paralellik göstermektedir (Scannell ve ark. 2011). Diğer fungi türlerinde de benzerlik oranı düşüş yaşamıştır. Ancak bu sonuçlar veri tabanındaki referans genomların %100 birleştirilmiş olmaması sebebiyle gerçekten daha düşük çıkmış olabilir.

RNAseq sonucunda *S. bayanus* 'da *TOR1* ve *TOR2* ekspresyonu diğer türlere göre çok daha fazla bulunmuştur. Ayrıca *S. bayanus* hibritinde de diğerlerine göre daha fazla *TOR1* ekspresyonu görüldü. Fakat *TOR1* için *S. bayanus* ile diğer türler arasındaki fark çok bariz iken; *TOR2* için o kadar da büyük fark olmadığı görüldü.

RNAseq sonuçlarını daha istatistiksel olarak yorumlamak için Deseq2 kullanıldı. *S. bayanus* ve hibritlerinin gen ekspresyonları *S. cerevisiae*'ye göre değerlendirildi. Buna göre *TOR1* geni görece en çok eksprese edilen 25'inci gen olarak bulundu. Ayrıca TORC1 aracılığıyla otofajiyi baskılayan *Ksp1* geni ve *Cdc42* regülatörü olan *Bud3* geni de en çok eksprese edilen genlerden çıktı.

S. bayanus ve *S. cerevisiae* için *TOR1* geninin promotor bölgeleri karşılaştırıldı. *S. bayanus* 'da promotor bölgesinde ciddi miktarda delesyonu olduğu görüldü. Elde edilen promotor bölge sekanslarına göre hem *S. bayanus* hem de *S. cerevisiae* için

transkripsiyon faktörleri listelendi. Hem daha önce raporlanmış faktörler hem de promotor bölgesi bağlanma motifleri bulunan olası transkripsiyon faktörleri listelendi. İki tür çoğu transkripsiyon faktörünü paylaşırken kendilerine özgü faktörler de taşımaktadırlar. Bu transkripsiyon faktörlerinden *S. bayanus*' da *S. cerevisiae*'ye göre daha fazla eksprese olan faktörler *Gln3*, *Msn2*, *Msn4*, *Rph1*, *Gis1*, *Fkh2*, *Gcr1* ve *YER130C* olarak belirlendi.

Gln3, *Msn2*, *Msn4*, *Rph1*, *Gis1* ve *YER130C* genleri stres sinyalleri ile ilişkili genlerdir. Ancak bu canlılar 25⁰C'de (optimum sıcaklığa çok yakın) YPD zengin besi yerinde 600 nm'de (0.65 - 0.75 OD) log faza kadar büyütülmüştür (Schraiber ve ark. 2013). Bu sebeple bu hücrelerin strese maruz kalması olasılık dışıdır.

Deseq2 sonuçları tekrar incelendiğinde ayrıca *RGT2* (yüksek glikoz sensörü), *DED1* (RNA helikaz), *Hxt14* (düşük glikozda aktive olan transport proteini), *HOF1* (aktin organizasyonu ve sitokinez), *TIP1* (ısı şokuyla transkripsiyonu uyarılan hücre duvarı proteini), *OSWI*(sporlaşmada dış spor duvarındaki protein) gibi çeşitli genlerin de *S. cerevisiae*'ye göre daha fazla eksprese olduğu görüldü.

S. bayanus 'un özellikle farklı streslerle ilgili alakalı genleri daha çok eksprese etmesi evrimsel süreçteki türleşmeden dolayı olabilir. Bu durumda stres altında olmasa *bile S. cerevisiae*'dan daha fazla eksprese ediyor olabilir. Bu özellikle düşük sıcaklıkta daha iyi yaşamasını açıklayabilir.

Bu sonuçlar *S. bayanus*' da göreceli olarak *TOR1*'in daha çok eksprese edildiğini de açıklayabilir. Eğer *RTG2* ve *Hxt14* gibi genler yük ekspresyon gösteriyorsa, bu *S. bayanus*'un *S. cerevisiae*'ye göre ortamdan daha çok glikoz alabildiğini gösterebilir. Bu da glikoliz aktivitesi için önemlidir. Yani her daim *TORC1*'in daha çok aktif olması için bir avantaj sağlayabilir. Glikoliz aktivitesinden sorumlu *Gcr1*'in fazla ekspresyonu da *mTORC1* ile direkt ilişkilidir. *mTORC1* aktivitesinin artması glikoliz aktivitesini de artırır. Böylece hücre daha çok enerji üretmiş olur ki hücre ATP düzeyi de *TORC1* en önemli düzenleyicilerinden biridir. Ayrıca glikoliz aktivitesinin *S. bayanus*'un *AEP2*

geniyle mitokondri özelinde farklılaşmasıyla oksijenli solunumda daha başarılı olması da etkili olabilir. Bu dolaylı olarak TORC1 aktivitesini olumlu etkileyebilir.

Hücre bölünmesi, sporlaşma, transkripsiyon ile alakalı genlerin yüksek ekspresyonu olması da TORC1 aktivitesi ile açıklanabilir. TORC1 aktivitesi mayoz, hücre bölünmesi, transkripsiyon, transkripsiyon gibi hücrel olayları pozitif olarak etkiler.

Bu transkripsiyon faktörlerinin hem kendilerinin hem de diğer faktörlerin promotör bölgelerine bağlanabiliyor olması da TORC1 aktivitesini artırıcı rol oynuyor olabilir. Farelerdeki RNAseq sonuçları incelendiğinde ise böbrek dışındaki organlarda her iki birey için de *mTOR* ekspresyon düzeyleri benzer çıkmıştır. Böbrekteki farklılık oldukça ilgi çekicidir. Çünkü *mTORC1* aktivitesi böbrek ile oldukça yakından ilişkilidir. Açlık sırasında kandaki glikoz ve aminoasit seviyesi düşer. Böylece insülin dolaşımını zayıflar ve *mTORC1* baskılanır. *mTORC1*'in baskılanması otofajinin uyarılmasına yol açar. Otofaji ile böbrekte mitokondri, sitoplazmik proteinler ve depo glikojenin geri dönüşümü başlar. Bu o kadar etkilidir ki fare böbreği 24 saatli açlık sonucunda 1/3 boyutuna kadar küçülür (Zoncu ve ark. 2011). Ayrıca aşırı beslenme böbrekte ektojik lipogenez ve glikojen sentezini aktifleştirir. Glikoneojenez ise baskılar. Aminoasit ve glikoz miktarındaki artış da *mTORC1*'in aktivitesini artırır (Zoncu ve ark. 2011). Bu verilerin ışığında iki bireyin böbreklerindeki *mTOR* ekspresyonu canlıların beslenmeleri ile alakalı olabilir. Canlıların en son beslenme saati, aç olup olmadıkları, beslenme alışkanlıkları bu farkı açıklayabilir.

Bir diğer dikkat çeken ayrıntı testiste *mTOR* ekspresyonunun her iki bireyde de aynı olmasına rağmen diğer organlara göre çok daha yüksek olmasıdır. Bu da aslında beklenen bir sonuçtur. Testis mayoz ile sperm hücrelerinin üretildiği organdır. *mTORC1* hücre bölünmesi ile çok yakından ilişkilidir. Devamlı hücre bölünmesinin gerçekleştiği bir organda *mTOR* ekspresyonununun yüksek çıkması oldukça doğaldır.

KAYNAKLAR

- Altschul, S.F., Gish, W, Miller, W, Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990.** Basic local alignment search tool. *J. Mol.Biol.*, 215(3): 403-410.
- Arias, C., Fussero, G., Zacharonok, M., Macías, A. 2015.** Dpp-Expressing and Non-Expressing Cells: Two Different Populations of Growing Cells in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 10(3): e0121457.
- Arsham, A.M., Howell, J.J., Simon, M.C. 2003.** A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *J. Biol.Chem.*, 278(32): 29655-60.
- Audhya, A., Loewith, R., Parsons, A.B., Gao, L., Tabuchi, M., Zhou, H., Boone, C., Hall, M.N., Emr, S.D. 2004.** Genome-wide lethality screen identifies new PI4,5P2 effectors that regulate the actin cytoskeleton. *EMBO J.*, 23(19): 3747-57.
- Barbet, N.C., Schneider, U., Helliwell, S.B., Stansfield, I., Tuite, M.F., Hall, M.N. 1996.** TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol Biol Cell*, 7(1): 25-42.
- Bar-Peled, L., Schweitzer, L.D., Zoncu, R., Sabatini, D.M. 2012.** Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell*, 150(6): 1196-208.
- Benjamin, D., Colombi, M., Moroni, C., Hall, M.N. 2011.** Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.*, 10(11): 868-880.
- Berchtold, D., Piccolis, M., Chiaruttini, N., Riezman, I., Riezman, H., Roux, A., Walther, T.C., Loewith, R. 2012.** Plasma membrane stress induces relocalization of Slm proteins and activation of TORC2 to promote sphingolipid synthesis. *Nat Cell Biol.*, 14: 542–547.
- Beugnet, A., Wang, X., Proud, C.G. 2003.** Target of rapamycin (TOR)-signaling and RAIP motifs play distinct roles in the mammalian TOR-dependent phosphorylation of initiation factor 4E-binding protein 1. *J Biol Chem.*, 278(42): 40717-40722.
- Betz, C., Hall, M.N. 2013.** Where is mTOR and what is it doing there? *J Cell Biol.*, 203(4): 563-574.
- Binda, M., Peli-Gulli, M.P., Bonfils, G., Panchaud, N., Urban, J., Sturgill, T.W., Loewith, R., De Virgilio, C. 2009.** The Vam6 GEF controls TORC1 by activating the EGO complex. *Mol Cell.*, 35: 563–573.
- Breitkreutz, A., Choi, H., Sharom, J.R., Boucher, L., Neduva, V., Larsen, B., Lin, Z.Y., Breitkreutz, B.J., Stark, C., Liu, G., Ahn, J., Dewar-Darch, D., Reguly, T., Tang, X., Almeida, R., Qin, Z.S., Pawson, T., Gingras, A.C., Nesvizhskii, A.I., Tyers, M. 2010.** A global protein kinase and phosphatase interaction network in yeast. *Science*, 328(5981): 1043-1046.

- Brugge, J., Hung, M.C., Mills, G.B. 2007.** A new mutational AKTivation in the PI3K pathway. *Cancer Cell*, 12(2): 104-107.
- Brown, E.J., Albers, M.W., Shin, T.B., Ichikawa, K., Keith, C.T., Lane, W.S., Schreiber, S.L. 1994.** A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*, 369(6483): 756-758.
- Bultynck, G., Heath, V.L., Majeed, A.P., Galan, J.M., Haguenaer-Tsapis, R., Cyert, M.S. 2006.** Slm1 and slm2 are novel substrates of the calcineurin phosphatase required for heat stress-induced endocytosis of the yeast uracil permease. *Mol Cell Biol.*, 26(12):4729-4745.
- Cafferkey, R., Young, P.R., McLaughlin, M.M., Bergsma, D.J., Koltin, Y., Sathe, G.M., Faucette, L., Eng, W.K., Johnson, R.K., Livi, G.P. 1993.** Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity. *Mol Cell Biol.*, 13(10): 6012-6023.
- Cankorur-Cetinkaya, A., Dereli, E., Eraslan, S., Karabekmez, E., Dikicioglu, D., Kirdar, B. 2012.** A novel strategy for selection and validation of reference genes in dynamic multidimensional experimental design in yeast. *PLoS One.*, 7(6): e38351.
- Cherry, J.M., Hong, E.L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E.T., Christie, K.R., Costanzo, M.C., Dwight, S.S., Engel, S.R., Fisk, D.G., Hirschman, J.E., Hitz, B.C., Karra, K., Krieger, C.J., Miyasato, S.R., Nash, R.S., Park, J., Skrzypek, M.S., Simison, M., Weng, S., Wong, E.D. 2012.** *Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Res.*, 40(Database issue): D700-5.
- Chiu, M.I., Katz, H., and Berlin, V. 1994.** RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(26): 12574–12578.
- Crespo, J.L., Powers, T., Fowler, B., Hall, M.N. 2002.** The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(10): 6784–6789.
- Cybulski, N., Hall, M.N. 2009.** TOR complex 2: a signaling pathway of its own. *Trends Biochem Sci.*, 34: 620–627.
- DeYoung, M.P., Horak, P., Sofer, A., Sgroi, D., Ellisen, L.W. 2008.** Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev.*, 22(2): 239-2351.
- Dibble, C.C., Elis, W., Menon, S., Qin, W., Klekota, J., Asara, J.M., Finan, P.M., Kwiatkowski, D.J., Murphy, L.O., Manning, B.D. 2012.** TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1. *Mol Cell*, 47(4): 535-546.
- Dickinson, J.R. 2004.** Life Cycle and Morphogenesis. İç: Dickinson JR & Schweizer editors. İç: The Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. New York: CRC Press: 2004, sf. 1-19.

- Di Como C.J., Arndt K.T. 1996.** Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev.*, 10(15): 1904-1916.
- Domingues, L., Dantas, M.M., Lima, N., Teixeira, J.A. 1999.** Continuous ethanol fermentation of lactose by a recombinant flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Biotechnol Bioeng.*, 64(6): 692-697.
- Evans, D.S., Kapahi, P., Hsueh, W.C., Kockel, L. 2011.** TOR signaling never gets old: Aging, longevity and TORC1 activity. *Ageing Res. Rev.*, 10(2): 225-237.
- Fadri, M., Daquinag, A., Wang, S., Xue, T., Kunz, J. 2005.** The pleckstrin homology domain proteins Slm1 and Slm2 are required for actin cytoskeleton organization in yeast and bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and TORC2. *Mol Biol Cell*, 16(4): 1883-1900.
- Feldmann, H. 2012.** Yeast, Molecular and Cell Biology, Second Editin, Wiley-VCH Verlag & Co. Weinheim, Germany.
- Feng, Z., Zhang, H., Levine, A.J., Jin, S. 2005.** The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 8204–8209.
- Foster, D. A. 2007.** Regulation of mTOR by phosphatidic acid? *Cancer Res.*, 67: 1-4.
- Gabardi, S., Baroletti, S.A. 2010.** Everolimus: a proliferation signal inhibitor with clinical applications in organ transplantation, oncology, and cardiology. *Pharmacotherapy*, 30(10): 1044-1056.
- Gan, X., Wang, J., Su, B., Wu, D. 2011.** Evidence for direct activation of mTORC2 kinase activity by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.*, 286: 10998–11002.
- García-Martínez, J.M., Alessi D.R. 2008.** mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J.*, 416(3): 375-385.
- Gaubitz, C., Oliveira, T. M., Prouteau, M., Leitner, A., Karuppasamy, M., Konstantinidou, G., Loewith, R. 2015.** Molecular Basis of the Rapamycin Insensitivity of Target Of Rapamycin Complex 2. *Mol Cell*, 58(6): 977-988.
- Gaubitz, C., Prouteau, M., Kusmider, B., Loewith, R. 2016.** TORC2 Structure and Function. *Trends Biochem Sci.*, 41(6): 532-545.
- Glidden, E.J., Gray L.G., Vemuru, S., Li, D., Harris, T.E., Mayo, M.W. 2012.** Multiple site acetylation of Rictor stimulates mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2)-dependent phosphorylation of Akt protein. *J Biol Chem.*, 287(1): 581-588.
- Guenet, J.L. 2005.** The mouse genome. *Genome Res.*, 15(12):1729-1740.
- Guba, M., von Breitenbuch, P., Steinbauer, M., Koehl, G., Flegel, S., Hornung, M., Bruns, C.J., Zuelke, C., Farkas, S., Anthuber, M., Jauch, K.W., Geissler, E.K. 2002.** Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med.*, 8(2): 128-135.

- Guertin, D.A., Stevens, D.M., Thoreen, C.C., Burds, A.A., Kalaany, N.Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K.J., Sabatini, D.M. 2006.** Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1. *Dev Cell*, 11(6): 859-871.
- Guertin, D.A., Sabatini, D.M. 2007.** Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*, 12(1): 9-22.
- Greig, D., Leu, J.Y. 2009.** Natural history of budding yeast. *Curr Biol*, 19(19): R886-890.
- Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q.P., Kozlowski, M.T., Belham, C., Avruch, J. 1998.** Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J Biol Chem*, 273(23): 14484-14494.
- Heitman, J., Movva, N.R., Hiestand, P.C., Hall, M.N. 1991.** FK 506-binding protein proline rotamase is a target for the immunosuppressive agent FK 506 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(5): 1948-1952.
- Herskowitz, I. 1988.** Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*, 52(4): 536-553.
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., Guan, J.L., Oshiro, N., Mizushima, N. 2009.** Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*, 20(7): 1981-1991.
- Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X., Guan, K.L. 2008.** Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J*, 27(14): 1919-1931.
- Inoki, K., Li Y., Zhu, T., Wu, J., Guan, K.L. 2002.** TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*, 4(9): 648-657.
- Inoki, K., Zhu, T., Guan, K.L. 2003.** TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115(5): 577-590.
- Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., Wang, C.Y., He, X., MacDougald, O.A., You, M., Williams, B.O., Guan, K.L. 2006.** TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell*, 126(5): 955-968.
- Jiang, Y., Broach, J.R. 1999.** Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *EMBO J*, 18(10): 2782-2792.
- Johnson, L.J., Koufopanou, V., Goddard, M.R., Hetherington, R., Schafer, S.M., Burt, A. 2004.** Population genetics of the wild yeast *Saccharomyces paradoxus*. *Genetics*, 166: 43-52.
- Kajiwara, M., Masuda, S. 2016.** Role of mTOR Inhibitors in Kidney Disease. *Int J Mol Sci*, 17(6): doi:10.3390/ijms17060975

- Kamada, Y., Fujioka, Y., Suzuki, N.N., Inagaki, F., Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N., Ohsumi, Y. 2005.** Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. *Mol Cell Biol.*, 25(16): 7239-7248.
- Keith, C.T., Schreiber, S.L. 1995.** PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science*, 270(5233): 50-51.
- Kent, W.J. 2002.** BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res.*, 12(4): 656-664.
- Kenyon, C. 2005.** The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell*, 120(4): 449-460.
- Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T.P., Guan, K.L. 2008.** Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol.*, 10 (8): 935–945.
- Kunz, J., Henriquez, R., Schneider, U., Deuter-Reinhard, M., Movva, N.R., Hall, M.N. 1993.** Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell*, 73(3): 585-596.
- Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G., François, J. 2006.** Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol Microbiol.*, 61(5): 1147-1166.
- Laplante, M., Sabatini, D.M. 2009a.** mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci.*, 122 (Pt 20): 3589-3594.
- Laplante, M., Sabatini, D.M. 2009b.** An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr Biol.*, 19(22): R1046-1052.
- Laplante, M., Sabatini, D.M. 2012.** mTOR Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 4(2): a011593.
- Lee, C.H., Inoki, K., Karbowniczek, M., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Henske, E.P., Guan, K.L. 2007.** Constitutive mTOR activation in TSC mutants sensitizes cells to energy starvation and genomic damage via p53. *EMBO J.*, 26: 4812–4823.
- Lempiainen, H., Uotila, A., Urban, J., Dohnal, I., Ammerer, G., Loewith, R., Shore, D. 2009.** Sfp1 interaction with TORC1 and Mrs6 reveals feedback regulation on TOR signaling. *Mol Cell*, 33(6): 704-716.
- Liu, L., Cash, T. P., Jones, R. G., Keith, B., Thompson, C. B. and Simon, M. C. 2006.** Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol. Cell*, 21: 521-531.
- Liu, P., Gan, W., Chin, Y.R., Ogura, K., Guo, J., Zhang, J., Wang ,B., Blenis, J., Cantley, L.C., Toker, A., Su, B., Wei, W. 2015.** Ptd Ins (3,4,5) P3-dependent activation of the mTORC2 kinase complex. *Cancer Discov.*, pp. 1194–1209.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., Hall, M.N. 2002.** Two TOR complexes, only one of which is

rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell*, 10(3): 457-468.

Loewith, R., Hall, M.N. 2011. Target of Rapamycin (TOR) in Nutrient Signaling and Growth Control. *Genetics*, 189(4): 1177–1201.

Loewith, R., Hall, M. N., 2004. TOR signaling in yeast: temporal and spatial control of cell growth, *Cell Growth: Control of Cell Size.*, pp. 139–166.

Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Pandolfi, P. P. 2005. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*, 121(2): 179-193.

Ma, X. M., Blenis, J. 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 10(5): 307-318.

Madigan, M.T., Mertingo, J.M. 2010. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, çev. Prof. Dr. Cumhuriyet Çökmüş, Palme Yayıncılık, Ankara, 2010

Manning, B. D., Tee, A. R., Logsdon, M. N., Blenis, J., Cantley, L. C. 2002. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell*, 10(1): 151-162.

Masui, K., Tanaka, K., Akhavan, D., Babic, I., Gini, B., Matsutani, T., Mischel, P. S. 2013. mTOR complex 2 controls glycolytic metabolism in glioblastoma through FoxO acetylation and upregulation of c-Myc. *Cell Metab.*, 18(5): 726-739.

Matsuo, T., Kubo, Y., Watanabe, Y., Yamamoto, M. 2003. Schizosaccharomyces pombe AGC family kinase Gad8p forms a conserved signaling module with TOR and PDK1-like kinases. *EMBO J.*, 22(12): 3073-3083

Mulet, J. M., Martin, D. E., Loewith, R., Hall, M. N. 2006. Mutual antagonism of target of rapamycin and calcineurin signaling. *J Biol Chem.*, 281(44): 33000-33007.

Naumov, G. I., Naumova, E. S., Lantto, R. A., Louis, E. J., Korhola, M. 1992. Genetic homology between *Saccharomyces cerevisiae* and its sibling species *S. paradoxus* and *S. bayanus*: electrophoretic karyotypes. *Yeast*, 8(8): 599-612.

Niles, B. J., Mogri, H., Hill, A., Vlahakis, A., Powers, T. 2012. Plasma membrane recruitment and activation of the AGC kinase Ypk1 is mediated by target of rapamycin complex 2 (TORC2) and its effector proteins Slm1 and Slm2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(5): 1536-1541.

Perelman, P., Johnson, W. E., Roos, C., Seuanez, H. N., Horvath, J. E., Moreira, M. A., Pecon-Slattery, J. 2011. A molecular phylogeny of living primates. *PLoS Genet.*, 7(3): e1001342.

Peterson, T. R., Laplante, M., Thoreen, C. C., Sancak, Y., Kang, S. A., Kuehl, W. M., Sabatini, D. M. 2009. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*, 137(5): 873-886.

- Phifer-Rixey, M., Nachman, M. W. 2015.** Insights into mammalian biology from the wild house mouse *Mus musculus*. *eLife*, 4. doi:10.7554/eLife.05959
- Potter, C. J., Pedraza, L. G., Xu, T. 2002.** Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol.*, 4(9): 658-665.
- Powers, T. 2007.** TOR signaling and S6 kinase 1: Yeast catches up. *Cell Metab.*, 6(1): 1-2.
- Powers T., Aranova S., Niles B., 2010.** TORC2 and spingolipid biosynthesis and signaling: lessons from budding yeast, pp. 177–197 *The Enzymes: Structure, Function and Regulation of TOR Complexes from Yeast to Mammals*, edited by Hall M. N., Tamanoi F., editors. Academic Press, San Diego
- Reinke, A., Anderson, S., McCaffery, J. M., Yates, J., 3rd, Aronova, S., Chu, S., Powers, T. 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(15): 14752-14762.
- Rini, B. I. 2008.** Temsirolimus, an inhibitor of mammalian target of rapamycin. *Clin Cancer Res.*, 14(5): 1286-1290.
- Rogers, J., Gibbs, R. A. 2014.** Comparative primate genomics: emerging patterns of genome content and dynamics. *Nat Rev Genet.*, 15(5): 347-359.
- Rosenbloom, K. R., Armstrong, J., Barber, G. P., Casper, J., Clawson, H., Diekhans, M., Kent, W. J. 2015.** The UCSC Genome Browser database: 2015 update. *Nucleic Acids Res*, 43(Database issue), D670-681. doi:10.1093/nar/gku1177
- Roux, P. P., Ballif, B. A., Anjum, R., Gygi, S. P., Blenis, J. 2004.** Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 101(37): 13489-13494.
- Rudolf, A., Karhumaa, K., Hagerdal. H.G. 2009.** Ethanol Production from Traditional and Emerging Raw Materials. In: Satyanarayana T & Kunze G editors. In: *Yeast Biotechnology: Diversity & Application*, Springer, sf. 489-515.
- Sabatini, D. M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., Snyder, S. H. 1994.** RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*, 78(1): 35-43.
- Sabers, C. J., Martin, M. M., Brunn, G. J., Williams, J. M., Dumont, F. J., Wiederrecht, G., Abraham, R. T. 1995.** Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem.*, 270(2): 815-822.
- Salvado, Z., Arroyo-Lopez, F. N., Guillamon, J. M., Salazar, G., Querol, A., Barrio, E. 2011.** Temperature adaptation markedly determines evolution within the genus *Saccharomyces*. *Appl Environ Microbiol.*, 77(7): 2292-2302.
- Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A. L., Nada, S., Sabatini, D. M. 2010.** Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell*, 141(2): 290-303.

- Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., Bar-Peled, L., Sabatini, D. M. 2008.** The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*, 320(5882): 1496-1501.
- Sancak, Y., Thoreen, C. C., Peterson, T. R., Lindquist, R. A., Kang, S. A., Spooner, E., Sabatini, D. M. 2007.** PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell*, 25(6): 903-915.
- Scannell, D. R., Zill, O. A., Rokas, A., Payen, C., Dunham, M. J., Eisen, M. B., Hittinger, C. T. 2011.** The Awesome Power of Yeast Evolutionary Genetics: New Genome Sequences and Strain Resources for the *Saccharomyces sensu stricto* Genus. *G3 (Bethesda)*, 1(1): 11-25.
- Schmelzle, T., Hall, M. N. 2000.** TOR, a central controller of cell growth. *Cell*, 103(2): 253-262.
- Schmelzle, T., Helliwell, S. B., Hall, M. N. 2002.** Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Mol Cell Biol.*, 22(5): 1329-1339.
- Schraiber, J. G., Mostovoy, Y., Hsu, T. Y., & Brem, R. B. 2013.** Inferring evolutionary histories of pathway regulation from transcriptional profiling data. *PLoS Comput Biol.*, 9(10): e1003255.
- Schreiber, S. L. 1991.** Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science*, 251(4991): 283-287.
- Serra, A., Strehaiano, P., Taillandier, P. 2005.** Influence of temperature and pH on *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* growth; impact of a wine yeast interspecific hybridization on these parameters. *Int J Food Microbiol.*, 104(3): 257-265.
- Shimada, K., Filipuzzi, I., Stahl, M., Helliwell, S. B., Studer, C., Hoepfner, D., Gasser, S. M. 2013.** TORC2 signaling pathway guarantees genome stability in the face of DNA strand breaks. *Mol Cell*, 51(6): 829-839.
- Solano, E., Castiglia, R., Corti, M. 2007.** A new chromosomal race of the house mouse, *Mus musculus domesticus*, in the Vulcano Island-Aeolian Archipelago, Italy. *Hereditas*, 144(3): 75-77.
- Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., Mak, T. W. 2001.** Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell*, 8(2): 317-325.
- Tee, A. R., Manning, B. D., Roux, P. P., Cantley, L. C., Blenis, J. 2003.** Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol.*, 13(15): 1259-1268.
- Teste, M. A., Duquenne, M., Francois, J. M., Parrou, J. L. 2009.** Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Mol Biol.*, 10, 99. doi:10.1186/1471-2199-10-99

- Thedieck, K., Polak, P., Kim, M. L., Molle, K. D., Cohen, A., Jenö, P., Hall, M. N. 2007.** PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. *PLoS One*, 2(11): e1217.
- Thompson, H. J., Jiang, W., Zhu, Z. 2009.** Candidate mechanisms accounting for effects of physical activity on breast carcinogenesis. *IUBMB Life*, 61(9), 895-901.
- Toschi, A., Lee, E., Xu, L., Garcia, A., Gadir, N., Foster, D. A. 2009.** Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin. *Mol Cell Biol.*, 29(6): 1411-1420.
- Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Loewith, R. 2007.** Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*, 26(5): 663-674.
- Vander Haar, E., Lee, S. I., Bandhakavi, S., Griffin, T. J., Kim, D. H. 2007.** Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol.*, 9(3): 316-323.
- Vezina, C., Kudelski, A., Sehgal, S. N. 1975.** Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*, 28(10): 721-726.
- Wang, L., Harris, T. E., Roth, R. A., Lawrence, J. C., Jr. 2007.** PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J Biol Chem.*, 282(27): 20036-20044.
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M. 2009.** RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.*, 10(1): 57-63.
- Wedaman, K. P., Reinke, A., Anderson, S., Yates, J., 3rd, McCaffery, J. M., Powers, T. 2003.** Tor kinases are in distinct membrane-associated protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 14(3): 1204-1220.
- Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M. N. 2006.** TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124(3): 471-484.
- Wullschleger, S., Loewith, R., Oppliger, W., Hall, M. N. 2005.** Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *J Biol Chem.*, 280(35): 30697-30704.
- Yang, H., Rudge, D. G., Koos, J. D., Vaidialingam, B., Yang, H. J., Pavletich, N. P. 2013.** mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature*, 497(7448): 217-223.
- Zheng, Y., Jiang, Y. 2005.** The yeast phosphotyrosyl phosphatase activator is part of the Tap42-phosphatase complexes. *Mol. Biol. Cell*, 16(4): 2119-2127.
- Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., Hall, M. N. 2011.** Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell*, 144(5): 757-768.
- Zoncu, R., Efeyan, A., Sabatini, D. M. 2011.** mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 12(1): 21-35.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Naci ÖZ
Doğum Yeri ve Tarihi : Manavgat, 05.05.1987
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lise : Manavgat Anadolu Lisesi/ 2005
Lisans : İstanbul Teknik Üniversitesi/ 2013
Yüksek Lisans : Uludag Üniversitesi/ 2016
İletişim (e-posta) : nacioz@yahoo.com