



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ



***SACCHAROMYCES CEREVISIAE* MAYA TÜRÜNDE
GIS1 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN *NTH1* GEN
EKSPRESYONUNA ETKİSİNİN ANALİZİ**

Burak SERVİLİ

Biyoloji Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

***SACCHAROMYCES CEREVISIAE* MAYA TÜRÜNDE
GIS1 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN *NTH1* GEN
EKSPRESYONUNA ETKİSİNİN ANALİZİ**

Burak SERVİLİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 21/08/2017

Tez Danışmanı:

Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ

ÇANAKKALE

Burak SERVİLİ tarafından Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ yönetiminde hazırlanan ve **21/08/2017** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “*Saccharomyces cerevisiae* Maya Türünde Gı1 Transkripsiyon Faktörünün *NTH1* Gen Ekspresyonuna Etkisinin Analizi” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ

Başkan

Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR

Üye

Doç. Dr. Burhan ŞEN

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

Bu tez çalışması, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyonu tarafından FYL-2016-805 numaralı projeden desteklenmiştir.

Bu tez çalışması TÜBİTAK-2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yüksek Lisans Burs Programı 2015/2 ile desteklenmiştir. Başvuru Numarası: 1649B021502527

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Burak SERVİLİ

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek-lisans dönemlerimde maya genetiği alanında beni yetiştiren, bilgilerini ve deneyimlerini benimle paylaşan, kıymetli hocam Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ'e;

Çalışmalarına yaptığı yorumlarla farklı pencerelerden bakmamı sağlayan ve beni meslektaş olarak görerek onore eden Prof. Dr. Sezai TÜRKEL'e;

Laboratuvarda çalıştığım zamanlar yardımlarını ve desteklerini eksik etmeyen değerli TTG Yeast Lab® ekibinde bulunan Arş. Gör. Nihan AKINCI, Melih GÜNAY, Mehmet Şerafeddin SOLAK, Selen ÇAKAS ve Gamze DOĞAN'a;

Bu çalışmayı 1649B021502527 başvuru numarası ile destekleyen TÜBİTAK 2210/C Yurt İçi Lisansüstü Burs Programına ve bu programda emeği olan bütün GÖREVLİ ve ÇALIŞANLARINA;

Bu çalışmayı FYL-2016-805 numaralı proje kapsamında destekleyen Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na;

“Sana destek olmayacağız da kime destek olacağız?” diyerek benim yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen Dr. Çiğdem ÖZKARA BİLGİLİ ve Dr. Fuat BİLGİLİ'ye;

Tekrar Dünya'ya gelecek olsaydım ve ailemi seçebilecek olsaydım yine annemin, babamın ve kardeşim olmasını isteyeceğim annem Mürvet SERVİLİ, babam Murat SERVİLİ ve kardeşim Salih SERVİLİ'ye daima yanımda olduğunuz ve beni desteklediğiniz için;

Ebedi saygı, sevgi ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

Burak SERVİLİ
Çanakkale, Ağustos 2017

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde Oranı
°C	Santigrat Derece
g	Gravity (santrifuj birimi)
α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta, Delesyon
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molar
nmol	Nanomol
pH	Hidrojen İyonu Konsantrasyonu
OD	Optik Densite
CO ₂	Karbondioksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
GFP	Green Fluorescent Proteine
<i>lacZ</i>	β Galaktozidaz Geni
Leu	Lösin
LiOAc	Lityum Asetat
ONPG	O-Nitro-Fenil- β -D- Galaktosidaz
PEG	Polyetilen Glikol
Pro	Prolin
TE	Tris-EDTA
TF	Transkripsiyon Faktörü
Ura	Urasil
Val	Valin

ÖZET

SACCHAROMYCES CEREVISIAE MAYA TÜRÜNDE GIS1 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN *NTH1* GEN EKSPRESYONUNA ETKİSİNİN ANALİZİ

Burak SERVİLİ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ

21/08/2017, 60

Saccharomyces cerevisiae maya hücrelerinde trehaloz miktarı hücre içerisinde belirli bir seviyede tutulmaktadır. Bu nedenle trehalozun sentezinden sorumlu trehaloz fosfat sentaz enzim kompleksinin (TPS) ve yıkımından sorumlu nötral trehalaz enziminin (Nth1p) ve ilgili genlerinin sıkı bir şekilde kontrol edilmesi gerekmektedir. Gis1 proteininin promotorlarında PDS/STRE elementi taşıyan genlere bağlanmaktadır. *NTH1* promotor bölgesinde 3 adet STRE bölgesi bulunmaktadır. Gis1p, çevresel koşullara göre üremenin farklı aşamalarında farklı fonksiyonlara sahiptir. Araştırmamızda Gis1 transkripsiyon faktörünün *NTH1* gen ekspresyonu üzerindeki etkisi belirlenmeye çalışıldı. Bu amaçla *NTH1* promotor bölgesini içeren plazmid yaban tip ve *GIS1* delesyonu taşıyan *S. cerevisiae* maya hücrelerine transform edildi. Logaritmik, post-diauxic ve durağan aşamaya kadar üretilen transformant hücrelerden örnekler alınarak *NTH1* promotor aktivasyon seviyesi ve hücre içerisinde biriktirilen trehaloz miktarı enzimatik metodlarla belirlendi. Yapılan çalışmalar sonucunda Gis1p yokluğunda logaritmik aşamada *NTH1* ekspresyonunun arttığı belirlendi. Biriktirilen trehaloz miktarları karşılaştırıldığında ise Δ *gis1* suşunda post-dioksik aşamada daha az trehaloz biriktiği, yaban tip suşa göre ilerleyen fazlarda trehalozun çok düşük olduğu belirlendi. Gis1 transkripsiyon faktörünün *NTH1* geninin regülasyonunda logaritmik aşamada represör olarak durağan aşamada ise aktivatör olarak görev yaptığı belirlendi. Ayrıca farklı veri tabanları ve biyoinformatik araçlar kullanılarak yaptığımız çalışmalarla Gis1 proteininin *NTH1* promotor bölgesindeki STRE bölgelerinde yakınlaştığı gözlemlendi.

Anahtar sözcükler: Trehaloz, *NTH1*, Gis1p, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

ANALYSIS OF THE EFFECT OF GIS1 TRANSCRIPTION FACTOR ON *NTH1* GENE EXPRESSION IN YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Burak SERVİLİ

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Biology Science

Advisor : Assist. Prof. Dr. Tülay TURGUT GENÇ

21/08/2017, 60

In *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells, the trehalose amount is maintained at a certain level within a cell. Therefore, the trehalose phosphate synthase complex (TPS) responsible from trehalose synthesis and the neutral trehalase enzyme (Nth1p) responsible from trehalose degradation and their related genes must be tightly controlled. Gis1p binds to PDS/STRE elements in the promoters of target genes. *NTH1* gene includes 3 STRE elements in its promoter region. Gis1p has different functions in growth stages of growth depending on the environmental conditions. In our research we aimed to identify effects of Gis1p on *NTH1* gene expression. For this purpose, the plasmid containing the *NTH1* promoter region was transformed into wild-type and *GIS1* deleted *S. cerevisiae* yeast cells. The amount of accumulated trehalose and the level of *NTH1* gene expression were determined by enzymatic methods. The yeast samples were collected from logarithmic, post-dioxic and stationary stages of growth. We found that *NTH1* gene expression increased in logarithmic phase in the absence of Gis1p. When the amounts of accumulated trehalose were compared, it was observed that accumulation of trehalose in the post dioxic stage of the Δ *gis1* strain was lower as compared to wild type, and the amount of trehalose was observed very low in the following stages of growth as compared to the wild type strain. It was determined that the Gis1 transcription factor acts as a repressor at the logarithmic stage and as an activator in the stationary phase of growth in the regulation of the *NTH1* gene expression. In addition, studies using different databases and bioinformatic tools showed that Gis1 protein converges the STRE sequences in the *NTH1* promoter.

Keywords: Trehalose, *NTH1*, Gis1p, *Saccharomyces cerevisiae*.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. <i>S. cerevisiae</i> ile İlgili Genel Bilgiler ve Genom Yapısı	3
2.2. <i>S. cerevisiae</i> Maya Hücrelerinin Glikoz Kullanımı ve Üreme Aşamaları	6
2.3. <i>S. cerevisiae</i> Maya Hücrelerinin Logaritmik Aşamadan PDS/Durağan Aşamaya Geçişinde Rol Alan Sinyal Yolakları ve Transkripsiyonel Regülasyonu	8
2.3.1. Protein Kinaz A Sinyal Yolağı	9
2.3.2. TOR Sinyal Yolağı	10
2.3.3. Rim15 Kinaz Sinyal Yolağı.....	12
2.3.4. Snf1 Kinaz Sinyal Yolağı	13
2.3.5. Msn2p/Msn4p ve Gis1p Transkripsiyon Faktörleri	15
2.4. <i>S. cerevisiae</i> Maya Hücrelerinde Trehalozun Görevi ve Metabolizması.....	16
2.5. <i>S. cerevisiae</i> Maya Hücrelerinde <i>GIS1</i> Geni ve Fonksiyonu	20
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE METOT	23
3.1. Çalışmada Kullanılan Maya Suşları.....	23
3.2. Çalışmada Kullanılan Maya Suşlarının Üreme Ortamları	23
3.3. Çalışmada Kullanılan Plazmitlerin Yapısı	23
3.4. Plazmit Amplikasyonu ve Maya Hücrelerine Transformasyonu	24
3.5. Transformant Maya Hücrelerinin Üretilmesi ve Örnek Alımı.....	25
3.6. Beta-galaktozidaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	25
3.7. Trehalaz Enzim Aktivitesinin Saptanması	26
3.8. Çalışmada Kullanılan Veri Tabanları.....	26

3.8.1. <i>Saccharomyces</i> Genome Database (SGD) Veri Tabanı	26
3.8.2. Yeasttract Veri Tabanı	27
3.8.3. Transkripsiyon Faktörü Bağlanma Profili Veritabanı - JASPAR	27
3.8.4. Chromatin Folding V2 Programı	27
3.8.5. VMD - Visual Molecular Dynamics Programı	27
3.8.6. UCSF Chimera Programı	28
3.8.7. Megasoftware 7.0 Programı	28
3.8.8. Web Tabanlı 3 Boyutlu Protein Modelleme Serverları	28
BÖLÜM 4	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	30
4.1. Çalışmada Kullanılan Maya Suşlarının İkilenme Süreleri	30
4.2. Gis1p Transkripsiyon Faktörünün <i>NTH1</i> Gen Ekspresyonuna Etkisi	30
4.3. Gis1p Transkripsiyon Faktörünün Trehaloz Birikimine Etkileri	37
4.2. <i>NTH1</i> – Gis1p 3D Bağlanma Modellemesi	39
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	51
EKLERİ	I
EK 1. <i>NTH1</i> Geni Hakkında Bazı Bilgiler	II
EK 2. <i>GIS1</i> Geni Hakkında Bazı Bilgiler	III
ÖZGEÇMİŞ	IV

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. <i>S. cerevisiae</i> maya türünün petri ve ışık mikroskobu fotoğrafları.....	4
Şekil 2.2. <i>S. cerevisiae</i> maya hücresine ait genomik veriler.....	5
Şekil 2.3. Glikoz içeren ortamda üretilen <i>S. cerevisiae</i> maya hücrelerinin üreme aşamaları	7
Şekil 2.4. Post-dioksik kayma safhasından durağan aşamaya geçişte transkripsiyonu kontrol eden sinyal yolları	10
Şekil 2.5. <i>S. cerevisiae</i> maya hücresinde TORC1 ve TORC2 yapıları.....	12
Şekil 2.6. <i>S. cerevisiae</i> maya hücresinde Rim15p regülasyonu.....	13
Şekil 2.7. <i>S. cerevisiae</i> maya hücresinde Snf1 kinaz sinyal yolağı ve transkripsiyonel regülasyonu	15
Şekil 2.8. Trehaloz molekülü.....	17
Şekil 2.9. Trehaloz metabolizması.....	18
Şekil 2.10. Nth1p, Nth2p ve Tps1p proteinlerinin hücresel lokalizasyonları.....	19
Şekil 2.11. <i>NTH1</i> promotörü ve potansiyel Gis1p bağlanma bölgeleri (3'-GGGGA-5')....	22
Şekil 3.1. <i>NTH1</i> promotor bölgesini içeren Yep plazmitinin yapısı.....	24
Şekil 4.1. Yaban tip maya suşunun LogA hücre sa yısı olarak üreme eğrisi.....	31
Şekil 4.2. Yaban tip maya suşunun ln hücre sayısı olarak üreme eğrisi.	32
Şekil 4.3. <i>Agis1</i> maya suşunun LogA hücre sayısı olarak üreme eğrisi.	33
Şekil 4.4. <i>Agis1</i> maya suşunun ln hücre sayısı olarak üreme eğrisi.	34
Şekil 4.5. Yaban tip ve <i>Agis1</i> mutant maya hücrelerinde <i>NTH1</i> gen ekspresyon seviyesi..	36
Şekil 4.6. Yaban tip ve <i>Agis1</i> mutant maya hücrelerinin farklı üreme aşamalarında biriktirdikleri trehaloz miktarı	38
Şekil 4.7. <i>NTH1</i> promotöründe bulunan Stress Response Element (STRE) dizileri.....	41
Şekil 4.8. Gis1proteininin JASPAR TF bağlanma bölge profili (ID: MA0306.1).	41
Şekil 4.9. Chromatin Folding v2 Programı kullanılarak elde edilen <i>NTH1</i> promotörünün nükleozom enerji seviyesi diyagramı.	42
Şekil 4.10. Chromatin Folding v2 Programı kullanılarak elde edilen <i>NTH1</i> promotörü.....	42
Şekil 4.11. MEGA Software 7.0 Programı kullanılarak elde edilen Rph1, Hs_JMJD2A, Gis1 proteinlerinin aminoasit dizilerinin hizalaması.	43
Şekil 4.12. PDBsum server kullanılarak oluşturulan I-TASSER, Swiss-model ve Robetta Ramachandran haritaları.	44
Şekil 4.13. PDBsum server kullanılarak oluşturulan I-TASSER, Swiss-model ve Robetta Topology haritaları.	45
Şekil 4.14. PDBsum server kullanılarak oluşturulan I-TASSER, Swiss-model ve Robetta Secondary Structure sonuçları.	47
Şekil 4.15. Gis1 proteini ile <i>NTH1</i> promotor DNA fragmentinin <i>in silico</i> bağlanma modeli.	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 2.1. <i>S.cerevisiae</i> maya türünün taksonomik sınıflandırılması.	4
Çizelge 4.8. Üç boyutlu model tahmin programı verilerinin karşılaştırılması.	46
Çizelge 4.9. I-TASSER - Eylül-Şubat 2016 Gis1p model yapılarının verilerinin karşılaştırılması.	46



BÖLÜM 1

GİRİŞ

Saccharomyces cerevisiae maya hücreleri değişken çevre koşullarına cevap olarak trehaloz metabolitini sentezleyerek depolamaktadır. Ayrıca trehalozun hücre içindeki miktarı hücrelerin bulunduğu üreme aşamasına göre farklılıklar göstermektedir. Trehaloz alfa 1-1 glikosidik bağ içeren bir disakkarit olup mikroorganizmaların çoğunda, bazı bitkilerde ve bazı omurgasız hayvanlarda stres metaboliti olarak sentezlenmektedir (Singer ve Lindquist, 1998; François ve Parrou, 2001). *S. cerevisiae* maya türünde trehalozun sentezinden Trehaloz Fosfat Sentaz (TPS) enzim kompleksi hücre dışından alınan ya da hücre içinde depolanan trehalozun yıkımından ise trehalaz enzimleri sorumludur. Trehalozun hücre içerisindeki miktarı bu iki enzimin sıkı bir şekilde regulasyonu ile belirli seviyede tutulmaktadır.

S. cerevisiae maya türünde *NTH1* geni tarafından kodlanan nötral trehalaz ve *ATH1* geni tarafından kodlanan asit trehalaz olmak üzere iki farklı trehalaz enzimi bulunmaktadır. Ayrıca *NTH1* geni ile yüksek homoloji gösteren bir diğer *NTH2* geni bulunmaktadır. Nth2 proteininin hücre içerisindeki görevi henüz net bir şekilde bilinmemektedir. Farklı stres koşullarında trehaloz biyosentezinde yer alan *TPS1* geni ve yıkımından sorumlu *NTH1* geni aynı anda transkripsiyona uğramaktadır. Aktisleştirilen transkripsiyon ile sentezlenen Tps1p hücre içerisinde aktif bir şekilde görevini yaparken, sentezlenen Nth1p stres koşulları bitene kadar inaktif olarak sitoplazmada beklemektedir. Nth1p aktivasyonu PKA bağımlı fosforilasyon ile gerçekleşmektedir.

Gliserol veya etanol gibi fermente edilemeyen karbon kaynağında üretilen *S. cerevisiae* maya hücrelerinin glikoz gibi fermente edilebilir karbon kaynağına geçirilmesi sonrasında hücredeki gen ekspresyon seviyeleri farklı oranlarda değişmektedir (DeRisi ve ark., 1997; Wang ve ark., 2004). Maya hücreleri tarafından öncelikli karbon kaynağı olarak tercih edilen glikoz hücre içinde farklı sinyal iletim yollarını aktive etmektedir (Belinchon ve Gancedo, 2007). Maya hücrelerinin logaritmik safhadan post-dioksik kayma (Post-diauxic shift, PDS) ve durağan aşamaya geçmesi farklı sinyal yolları tarafından koordineli bir şekilde regüle edilmektedir. Bu yollardan en önemlileri cAMP bağımlı Protein kinaz A yolağı, rapamisin veya azot açlığı ile baskılanan TOR sinyal yolağı, üreme ortamındaki besin miktarına göre düzenlenen Snf1 kinaz sinyal yolağıdır. Besin miktarına ve stres koşullarına göre bu yollar farklı şekilde regüle edilmektedir. Bu yollardan TOR ve PKA sinyal yolağının hedef proteini Rim15 kinazdır. Rim15 kinaz STRE dizilerine bağlanarak

stres genlerini aktive eden Msn2p ve Msn4p transkripsiyon faktörlerinin ve PDS elementlerine bağlanarak hücrenin logaritmik aşamadan Post-dioksi kayma ve durağan aşamaya geçişini kontrol eden Gis1p transkripsiyon faktörünün aktivasyonundan sorumludur.

Gis1p besin açlığında gerekli olan genlerin promotor bölgelerinde bulunan post-dioksik-kayma elementlerine (PDS) (5'-T[AT]AGGGAT-3') bağlanır. Gis1 transkripsiyon faktörü dioksik kayma aşamasında 100'den fazla genin regülasyonundan sorumludur (Cameroni ve ark., 2004). Ayrıca Gis1p histon dimetilaz aktivitesine sahip olduğu için transkripsiyonel represör/aktivatör olarak ta görev yapmaktadır (Jang ve ark., 1999). Gis1 transkripsiyon faktörü *SSA3*, *HSP12* ve *HSP6* gibi stres genlerin aktivatörü, *DPP1* ve *PHR1* genlerinin transkripsiyonel repressörü olarak görev yapar (Jang ve ark., 1999; Pedruzzi ve ark., 2000; Oshiro ve ark., 2003). Msn2p/ Msn4p gibi Gis1 proteini çinko parmak DNA bağlanma motifine sahiptir. Rph1 proteini, Gis1p ile %34 homoloji gösteren, benzer çinko parmak DNA bağlanma motifine sahip histon dimetilaz aktivitesi olan diğer bir transkripsiyon faktörüdür. Bu nedenle biyoinformatik tabanlı yaptığımız çalışmalarda referans olarak kullanıldı.

Araştırmamızda Gis1 transkripsiyon faktörünün *NTH1* transkripsiyonuna etkisi ni belirlemek için *NTH1* promotor bölgesini içeren plazmid yaban tip ve *GIS1* delesyonu taşıyan *S. cerevisiae* maya hücrelerine transform edildi. Farklı üreme aşamalarından, logaritmik, post-diauxic ve durağan aşama, transformant hücre kültürlerinden örnekler alınarak *NTH1* promotor aktivasyon seviyesi ve hücre içerisinde biriktirilen trehaloz miktarı enzimatik metodlarla belirlendi.

Gis1p yokluğunda *NTH1* ekspresyonunun logaritmik aşamada ve post-dioksik kayma aşamasında arttığı durağan aşamada ise azaldığı belirlendi. Bu durum Gis1 transkripsiyon faktörünün logaritmik aşamada *NTH1* geninin represörü durağan aşamada ise aktivatörü olarak görev yaptığını göstermektedir. Genel olarak Gis1p yokluğunda hücrede biriktirilen trehalozun azaldığı tespit edildi. Biyoinformatik araçlar kullanılarak yaptığımız çalışmalarda ise *NTH1* promotor bölgesindeki STRE bölgelerine Gis1 proteininin yakınlaştığı gözlemlendi.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. *S. cerevisiae* ile İlgili Genel Bilgiler ve Genom Yapısı

En çok bilinen ve en önemli maya türü olan *Saccharomyces cerevisiae* eski tarihlerden beri kullanılmakta ve zamanla “Baker’s Yeast” olarak anılmaktadır. Mayalar, oksijen miktarının azaldığı ortam koşullarında fermantasyon yaparak glikozdan CO₂ ve alkol oluşturmaktadır. Bu nedenle, çok fazla şeker tükettiğinden dolayı Latince “şeker fungusu” anlamına gelen *Saccharomyces* adını almıştır. *S. cerevisiae* maya türü, fungi alemi içerisinde, Ascomycota şubesinin Saccharomycetales sınıfında bulunan, tek hücreli ökaryotik mikroorganizmalar olup güncel sınıflandırması Çizelge 2.1.’de verilmiştir (<http://www.indexfungorum.org>). Genellikle, tomurcuklanarak çoğalan mayalar, farklı ortam koşullarında ve farklı besin kaynaklarında üreyebilmektedir. *S. cerevisiae* maya türünün petri ve ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 2.1.’de gösterilmiştir (<http://www.uwyo.edu>). *S. cerevisiae*, haploid ve diploid olmak üzere 2 farklı yaşam döngüsüne sahiptir. Haploid durumdayken mitoz bölünme ile çoğalan maya hücreleri ortam şartları değiştiğinde diploid yaşam döngüsüne geçerek mayoz bölünme geçirir ve spor oluşturur.

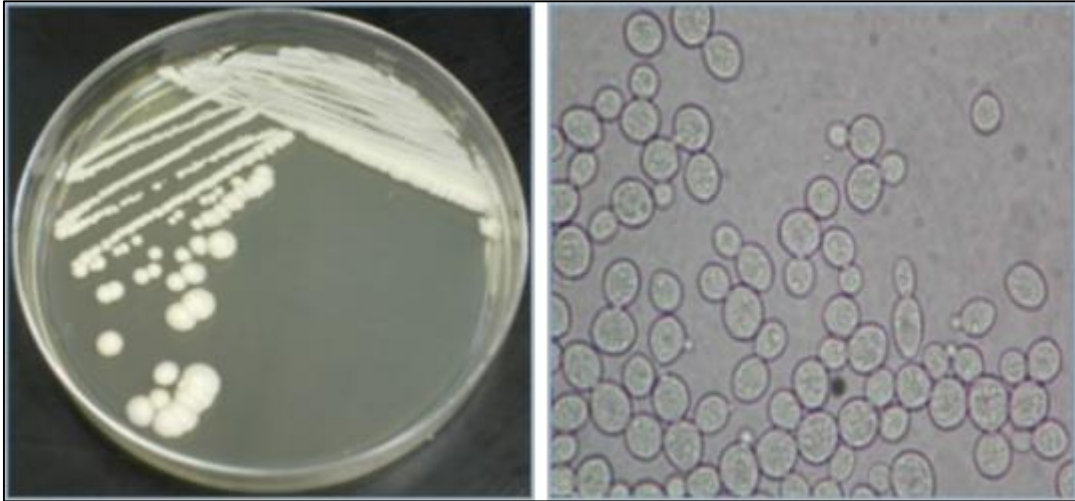
Genetik çalışmalarda yaygın kullanılan *S. cerevisiae* maya türü gen haritası çıkarılan ilk ökaryotik mikroorganizmadır. *S. cerevisiae*’da yapılan genetik çalışmalar, diğer ökaryotik organizmalar için model olarak kullanılmaktadır. 2001 yılında *S. cerevisiae* maya türünün mitotik genleri ile yapılan çalışmalar sonucunda kansere karşı mücadelede önemli sayılabilecek buluşlar yapılmıştır. Araştırmacılar bu çalışma ile tıp alanında Nobel ödülünü almışlardır (Hartwell, 2001). Elizabeth Blackburn, Carol W. Greider ve Jack W. Szostak, *S. cerevisiae* maya hücrelerini kullanarak, telomer yapılarının aydınlatılması ve telomerazlar ile ilgili yaptıkları çalışmalardan dolayı, 2009 yılında Nobel Tıp ödülü almışlardır (Szostak ve Blackburn, 1982). Yoshinori Ohsumi *S. cerevisiae* maya türünü kullanarak yaptığı otofaji ile ilgili çalışmalardan dolayı 2016 Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülünü almıştır (Frake ve Rubinstein, 2016).

S. cerevisiae maya türü 16 kromozoma sahip olup genom büyüklüğü 12.1248 mb olarak belirlenmiştir (Engel ve ark., 2014). NCBI (The National Center for Biotechnology Information) veri tabanında bulunan veriler kullanılarak, *S. cerevisiae* maya türüne ait nükleer kromozomlarda ve mitokondri genomunda bulunan nükleotid dizileri, gen sayıları, pseudogen sayıları, protein sayıları, GC içerikleri, rRNA ve tRNA sayıları ile diğer bazı

genomik bilgiler Şekil 2.2.'de verilmiştir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/15>). *S. cerevisiae* maya hücresinde 6445 gen, 6002 protein, 18 pseudogen, 14 rRNA, 299 tRNA ve 112 diğer (non-coding) RNA moleküllerini içermektedir. Mitokondriyel DNA büyüklüğü 0.085779 mb olup 46 gen içermektedir. Ayrıca maya genomunda 2 mikron plazmit, RNA virüsleri ve Ty elementleri (Transposon Yeast) bulunmaktadır (Goffeau, 1996).

Çizelge 2.1. *S.cerevisiae* maya türünün taksonomik sınıflandırılması. (<http://www.indexfungorum.org>).

ÖKARYOTLAR	
Alem	Fungi
Şube	Ascomycota
Takım	Saccharomycetes
Sınıf	Saccharomycetales
Aile	Saccharomycetaceae
Cins	Saccharomyces
Tür	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>



Şekil 2.1. *S. cerevisiae* maya türünün petri ve ışık mikroskobu fotoğrafları (magnifikasyon 1000X) (http://www.uwyo.edu/virtual_edge/lab13/fungi_results.htm).

Loc	Type	Name	RefSeq	INSDC	Size (Mb)	GC%	Protein	rRNA	tRNA	Other RNA	Gene	Pseudogene
Nuc	Chr	I	NC_001133.9	BK006935.2	0.230218	39.3	94	-	4	2	101	1
Nuc	Chr	II	NC_001134.8	BK006936.2	0.813184	38.3	415	-	13	4	432	-
Nuc	Chr	III	NC_001135.5	BK006937.2	0.31662	38.5	168	-	10	4	184	2
Nuc	Chr	IV	NC_001136.10	BK006938.2	1.53	37.9	766	-	28	4	799	1
Nuc	Chr	V	NC_001137.3	BK006939.2	0.576874	38.5	287	-	20	9	317	1
Nuc	Chr	VI	NC_001138.5	BK006940.2	0.270161	38.7	128	-	10	4	143	1
Nuc	Chr	VII	NC_001139.9	BK006941.2	1.09	38.1	539	-	36	10	585	-
Nuc	Chr	VIII	NC_001140.6	BK006934.2	0.562643	38.5	290	-	11	4	305	-
Nuc	Chr	IX	NC_001141.2	BK006942.2	0.439888	38.9	213	-	10	3	232	6
Nuc	Chr	X	NC_001142.9	BK006943.2	0.745751	38.4	362	-	24	6	392	-
Nuc	Chr	XI	NC_001143.9	BK006944.2	0.666816	38.1	317	-	16	5	338	-
Nuc	Chr	XII	NC_001144.5	BK006945.2	1.08	38.5	519	12	21	18	572	2
Nuc	Chr	XIII	NC_001145.3	BK006946.2	0.924431	38.2	469	-	21	15	505	-
Nuc	Chr	XIV	NC_001146.8	BK006947.3	0.784333	38.6	398	-	14	6	418	-
Nuc	Chr	XV	NC_001147.6	BK006948.2	1.09	38.2	546	-	20	11	579	2
Nuc	Chr	XVI	NC_001148.4	BK006949.2	0.948066	38.1	472	-	17	6	497	2
MT	Chr	MT	NC_001224.1	KP263414.1	0.085779	17.1	19	2	24	1	46	-

Şekil 2.2. *S. cerevisiae* maya hüresine ait genomik veriler (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/15>).

S. cerevisiae maya genomunda oldukça az intron bulunmaktadır. Protein kodlu genlerde intron oranı yaklaşık olarak %3,8 olarak tespit edilmiştir. Maya genomundaki genler arası mesafenin 200 ile 1000bp arasında olduğu ve insan genomundaki genler arası mesafeden daha kısa olduğu belirlenmiştir. Bu nedenlerden dolayı, *S. cerevisiae* maya hücreleri oldukça yoğun kompakt bir genom yapısına sahiptir (Goffeau ve ark., 1996).

Genetik ve moleküler çalışmalar sonucu oluşturulmuş veri bankası olan SGD (*Saccharomyces* Genome Database) *S. cerevisiae* ve çeşitli fungi suşlarıyla ilişkili genlerin, proteinlerin, yolların vb. özelliklerin kaydedildiği geniş bir veri tabanıdır (Cherry ve ark., 2012). *S. cerevisiae* maya hücresinin genetik işleyişi, fizyolojik yapısı ve regülasyonu ile ilgili temel bilgilerin öğrenilmesi ve geliştirilmesi için SGD veri tabanı oldukça büyük bir öneme sahiptir (Winzeler ve ark., 1999; Cherry ve ark., 2012). SGD veri tabanına benzer *S. cerevisiae* maya türü ile ilgili farklı işlevlere sahip ulaşılabilir başka veri tabanları da yine internet üzerinde mevcuttur.

2.2. *S. cerevisiae* Maya Hücrelerinin Glikoz Kullanımı ve Üreme Aşamaları

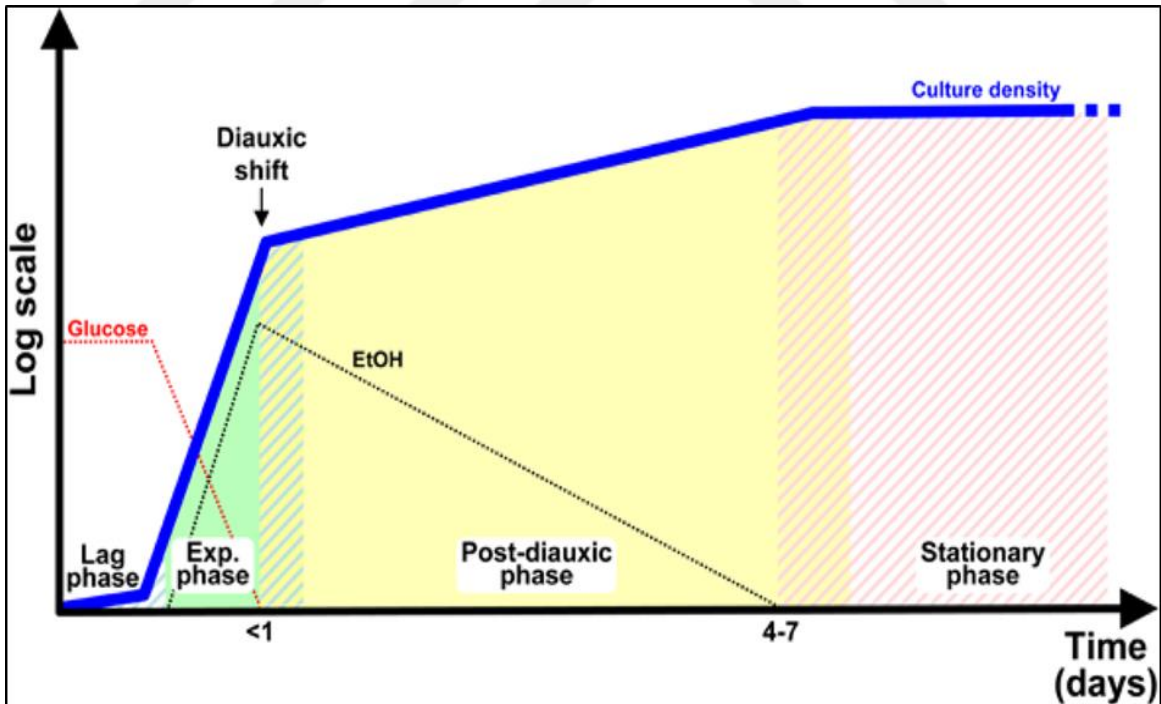
S. cerevisiae maya hücreleri tarafından öncelikli karbon kaynağı olarak tercih edilen glikozun, farklı konsantrasyonları hücre içinde farklı sinyal iletim yollarını aktive etmektedir (Belinchon ve Gancedo, 2007). Üreme ortamında yüksek glikoz bulunması sukroz, etanol ve gliserol gibi farklı karbon kaynaklarının kullanılmasını baskılar, bu olay glikoz baskılaması (Glucose Repression) olarak bilinir (Gancedo, 1998). Gliserol gibi fermente edilemeyen karbon kaynağında üretilen *S. cerevisiae* maya hücrelerinin üreme ortamına glikoz eklenmesi, genlerin gen ekspresyonunu %30 oranında değiştirmektedir (DeRisi ve ark., 1997; Wang ve ark., 2004).

Yaban tip maya hücreleri ortam koşulları uygun olduğunda ve besin sıkıntısı olmadığında, mitoz bölünme geçirerek bir hücre döngüsünü yaklaşık olarak 120 ± 30 dakikada tamamlamaktadır. Hücre süspansiyonunun absorbansı (Optical Density, OD_{600}) spektrofotometreyle ölçülerek maya kültüründeki üreme belirlenebilir. Herhangi bir mutasyon taşımayan maya suşunda absorbans (OD_{600}) değeri 1,0 ise bu kültürün mililitresinde yaklaşık olarak 10^7 maya hücresi bulunmaktadır ($OD_{600} = 1,0$ ise 1×10^7 hücre/ml). Bu şekilde zamana bağımlı ölçüm yapılarak maya hücrelerinin üreme aşamaları belirlenmektedir.

Glikoz gibi fermente edilebilen karbon kaynağında üretilen *S. cerevisiae* maya hücrelerinin üreme grafiği ve üreme aşamaları Şekil 2.3.'te verilmiştir. Maya hücreleri glikoz içeren taze üreme ortamına geçirildiklerinde öncelikli olarak üremelerinde bir kaç

saatlik bir gecikme gerçekleşmektedir. Bu nedenle bu aşama 'Lag' aşaması veya gecikme evresi olarak bilinmektedir. Bu aşamada hücreler yeni ortamdaki besin çeşidini ve miktarını sensor-sinyal sistemlerini kullanarak belirler ve buna bağlı olarak hücre içi genetik ve metabolik düzenlemelerini yapar. Örneğin, üreme ortamında glikozun bulunması -üreme ortamında olsa dahi- diğer karbon kaynaklarının kullanımı ile ilgili genlerin tümünü baskılar. Glikozun kullanımı ve metabolize edilebilmesi için gerekli olan diğer tüm genlerinde aktivasyonu sağlar. Böylece fermentatif üreme için gerekli tüm genler aktifleştirilir.

Lag aşamasında gerçekleşen bu hazırlıkların arkasından hücre glikozu kullanarak logaritmik olarak üremeye başlar. Bu aşamada hücreler glikozu kullanarak fermentatif olarak çoğalır ve alkol üretmeye başlarlar. Bu aşama ayrıca predioksik aşama olarak da bilinmektedir. *S. cerevisiae* maya hücrelerinin logaritmik üremesi sonucunda üreme ortamındaki glikoz miktarı yavaş yavaş azalırken buna bağlı olarak alkol miktarı da yavaş yavaş artmaktadır. Glikozun tamamen bitmesi ile logaritmik üreme aşaması sonlanır. Logaritmik ile ekponensiyel aşama, *S. cerevisiae* maya suşunun genetik yapısına bağlı olarak değişmekle beraber, mutasyon içermeyen maya hücrelerinde 24 saatten daha az bir süreyi kapsamaktadır.



Şekil 2.3. Glikoz içeren ortamda üretilen *S. cerevisiae* maya hücrelerinin üreme aşamaları (Busti ve ark., 2010).

Glikozun tükenmesi ile birlikte maya hücreleri fermentatif üreme sonucunda ürettikleri alkolü karbon kaynağı olarak kullanarak respiratif olarak üremeye başlarlar ve karbondioksit üretirler. Logaritmik aşamada glikoz kullanarak çoğalan maya hücrelerinin (fermentatif üreme) alkol kullanarak çoğalmaya (respiratif üreme) geçişleri dioksik kayma (Diauxic shift) olarak adlandırılır. Bu süre kısa olup üreme aşaması olarak adlandırılmamaktadır. Dioksik kayma sırasında maya hücreleri alkolü kullanabilmek için gerekli olan hücre içi genetik ve metabolik düzenlemeleri yaparlar. Alkolün metabolize edilmesi glikoza oranla daha uzun sürede (4-7 gün) gerçekleşmektedir. Bu nedenle alkolün tamamının tüketilmesi için geçen bu süre post-dioksik aşama (Post-diauxic phase) olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca logaritmik çoğalma aşamasından sonraki ikinci ve son mitotik bölünerek çoğalma aşamasıdır.

Alkolün tükenmesi ile maya hücreleri bölünmeden beklemeye başlar ve üreme durdurulur. Hücreler canlı olmakla beraber metabolik faaliyetlerini ve gen ekspresyonlarını yavaşlatarak hayatta kalmaya devam ederler. Böylece maya hücreleri durağan aşamaya (Stationary phase) ve G0 (quiescent phase) safhasına girmiş olurlar (Busti ve ark., 2010). Eğer maya hücreleri diploid ise G0 (quiescent phase) safhasına geçmek yerine mayoz bölünme geçirerek spor oluştururlar. Diploid maya hücreleri asetat gibi nonfermentatif karbon kaynağı içeren üreme ortamında (besin açlığı) veya azot açlığında üretilirse yine spor oluşturmaktadır (Kupiec ve ark., 1997). Durağan aşamada bulunan maya hücrelerinin gösterdiği bazı genetik ve metabolik değişiklikler stres altındaki maya hücrelerinin gösterdiği değişikliklere benzemektedir. *HSP26* (Heat Shock Protein), *HSP12*, *HSP104* ve *SSA3* (Stress-Seventy subfamily A) gibi ısı şoku (heat-shock) genlerinin aktivasyonu ve hücre içi trehalozun biriktirilmesi buna örnek olarak verilebilir (Werner-Washburne ve ark., 1993; Herman, 2002; Gray ve ark., 2004;). *S. cerevisiae* maya hücrelerinin genel olarak bu aşamalarda gerçekleştirdiği bazı genetik ve metabolik düzenlemeler: ribozomal proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonunun artması/azalması, strese duyarlı genlerin aktivasyonu, depo karbonhidratlarının biriktirilmesi, hücre duvarının kalınlaştırılması, stres direncinin artırılması, kromozomların yoğunlaşması, otofajinin başlaması, transkripsiyon ve protein sentez hızlarının azalması şeklinde özetlenebilir (Gray ve ark., 2004).

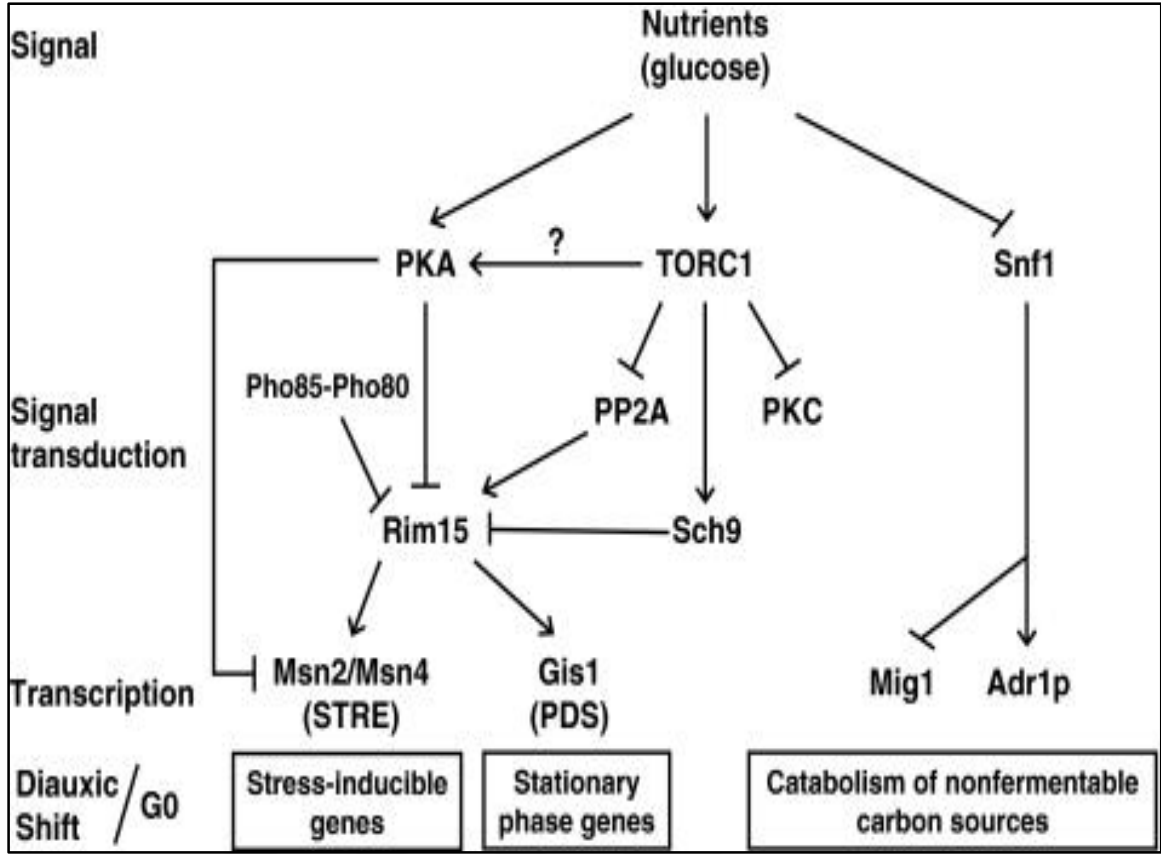
2.3. *S. cerevisiae* Maya Hücrelerinin Logaritmik Aşamadan PDS/Durağan Aşamaya Geçişinde Rol Alan Sinyal Yolakları ve Transkripsiyonel Regülasyonu

Maya hücrelerinin eksponensiyel aşamadan post-dioksik kayma (Post-diauxic shift, PDS) ve durağan aşamaya geçmesi farklı sinyal yolakları tarafından koordineli bir şekilde

regüle edilmektedir. Bu yollardan en önemlileri Protein kinaz A (PKA), TOR (Target of Rapamycine), Snf1 kinaz (Sucose Nonfermenting 1) ve Rim15 kinaz (Regulator of IME2 (Inducer of Meiosis 2) sinyal yolağıdır (Şekil 2.4.). Hücrelerin PDS safhasından durağan aşamaya geçişinde PKA ve TOR sinyal yollarının pozitif etkisine karşılık, Snf1p ve Rim15p kinaz sinyal yolları negatif etkiye sahiptir.

2.3.1. Protein Kinaz A Sinyal Yolağı

S. cerevisiae maya hücresinde PKA'nın katalitik alt ünitesini *TPK1*, *TPK2* ve *TPK3* (Takashi's Protein Kinase) genleri, düzenleyici alt ünitesini *BCY1* (Bypass of Cyclic-AMP requirement) geni kodlamaktadır. Bcy1p düzenleyici alt ünite katalitik alt ünitelere bağlanarak tetramer yapısını oluşturur ve PKA aktivitesini baskılar. Bu nedenle Bcy1p inhibitör alt ünite olarak adlandırılmaktadır. İnhibitör alt üniteye cAMP molekülünün bağlanması ile Bcy1p tetramer yapısından ayrılır ve PKA aktif hale geçer. *S. cerevisiae* maya hücresinde cAMP sentezi, *GPA1* geni (G Protein Alpha subunit) tarafından kodlanan Gpa1 proteinini içeren yolak ve Ras1p/Ras2p GTPaz enzimlerini içeren yolak olmak üzere iki farklı yolak üzerinden gerçekleşir (Santangelo, 2006; Zaman ve ark., 2008). Hücre dışındaki besin miktarına göre, örneğin glikozun varlığında, hücre içi cAMP miktarı artar ve PKA aktif hale geçer.



Şekil 2.4. Post-dioksik kayma safhasından durağan aşamaya geçişte transkripsiyonu kontrol eden sinyal yolları (Galdieri ve ark., 2010).

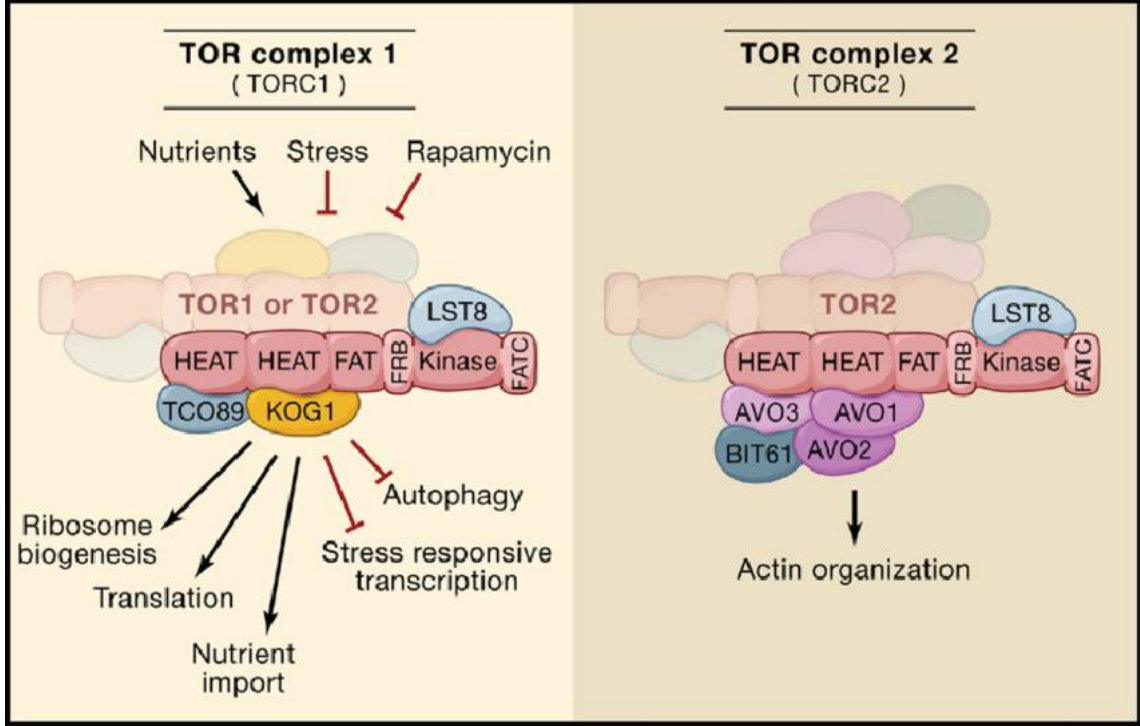
2.3.2. TOR Sinyal Yolağı

S. cerevisiae maya hücresinde *TOR1* ve *TOR2* olmak üzere iki farklı TOR geni bulunmaktadır. *TOR1* ve *TOR2* genlerinin ürünü olan Tor1 ve Tor2 proteinlerinin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 280 kDa olup %67 oranında dizi benzerliğine sahiptir. Tor1p ve Tor2p, çevresel koşullara bağlı olarak hücre döngüsünün ilerlemesinin ve metabolizmasının düzenlenmesinde rol alan Ser/Thr kinazlardır (Helliwell ve ark., 1994; Inoki ve ark., 2005). Ayrıca hücre döngüsünün ilerlemesi sırasında, Tor2p enzimi sitoplazmik iskelettaki aktinlerin polarizasyonunun regülasyonundan spesifik olarak sorumludur (Schmidt ve ark., 1996; Wullschleger ve ark., 2006).

S. cerevisiae maya hücresinde TORC1 (TOR Complex 1) ve TORC2 (TOR Complex 2) olmak üzere iki farklı TOR kompleksi bulunmaktadır. TORC1 kompleksi 4 alt üniteden oluşmakta olup bunlar: Tco89p (Tor Complex One), Kog1p (Kontroller of Growth), Lst8p (Lethal with Sec Thirteen), Tor1p veya Tor2p kinazlardan bir tanesini içermektedir. TORC2 kompleksi ise Avo1p (Adheres Voraciously to Tor2), Avo2p, Avo3p, Bit61p (Binding Partner of Tor2p), Lst8p ve Tor2p olmak üzere 6 alt ünitenden oluşmaktadır (Şekil 2.5.)

(Wullschleger ve ark., 2006). TORC1 kompleksi rapamisine duyarlı olup rapamisin ile bloke edilebilirken, TORC2 kompleksi inhibe edilememektedir. TORC1 kompleksi ribozom biyogenezinde, translasyonda, besin alımında ve otofajide görevli olup, stres ve rapamisin ile bloke edilirken, uygun ve yeterli besin varlığında aktive olmaktadır. Rapamisin uygulaması veya azot açlığı gibi çevresel stresler TORC1 baskılanmasıyla birlikte hücredeki stres genleri ile NDP (Nitrogen Discrimination Pathway) ve RTG (Retrograde Response Pathway) yollarında görevli tüm genlerin aktivasyonuna neden olur.

TORC1 kompleksinin hedef proteinleri, Tap42p (Two A phosphatase Associated Protein) ve Sch9p (Ser/Thr Protein Kinase Sch9) dir. Tap42p, protein fosfataz 2A (PP2A) enziminin regülatörü olup TORC1 kompleksi tarafından fosforlanarak aktive edilir. Aktif Tap42p, PP2A enziminin katalitik bölgesine bağlanır ve aktivitesini bloke eder. TORC1 kompleksinin diğer hedef proteini olan Sch9p Ser/Thr protein kinaz olup TORC1 kompleksi tarafından fosforlanarak aktive edilir (Düvel ve ark., 2003). Aktif Sch9p, Rim15p kinazı fosforlayarak nükleustan sitoplazmaya geçmesine ve burada inaktif olarak kalmasına neden olur (Cameroni ve ark., 2004; Swinnen ve ark., 2006). Besin açlığı, farklı stresler veya rapamisin TORC1 kompleksini baskılar. Tap42p, TORC1 tarafından fosforlanmadığı için PP2A enzime bağlanamaz ve böylece PP2A aktif hale geçer. Aktif PP2A, Msn2p/Msn4p (Multicopy suppressor of SNF1 mutation) transkripsiyon faktörlerinin defosforile ederek sitoplazmadan nükleusa translokasyonuna ve böylece aktif hale geçmesine neden olur. Aktif Msn2p/Msn4p transkripsiyon faktörleri stres koşullarına cevap oluşturmada görev alan genlerin STRE dizilerine bağlanarak ekspresyonunu sağlar. İnaktif TORC1 kompleksi Sch9p kinazı fosforlayamadığı için Sch9p inaktif olur ve Rim15p kinazı fosforlayamaz. Böylece aktive edilen Rim15p kinaz Msn2p/Msn4p ve Gis1p (Gig1-2 Suppressor (Gig1-Alias SRB8 (Suppressor of RNA polymerase B)) transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Gis1p transkripsiyon faktörü promotorlarında PDS dizisi bulunduran genlere bağlanarak transkripsiyonunu aktive eder.



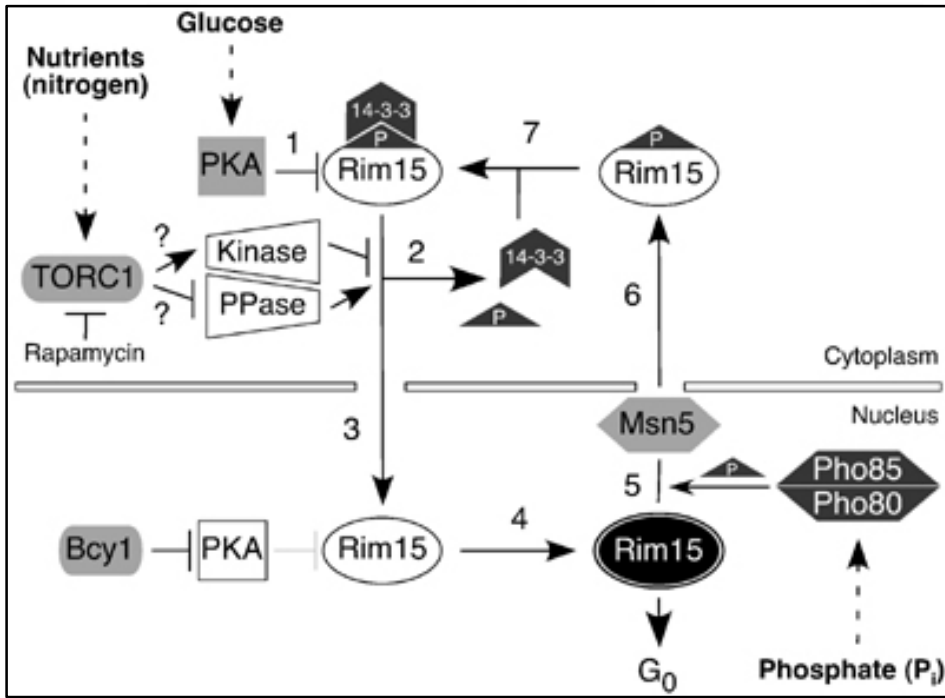
Şekil 2.5. *S. cerevisiae* maya hücresinde TORC1 ve TORC2 yapıları (Wullschleger ve ark., 2006).

2.3.3. Rim15 Kinaz Sinyal Yolağı

Rim15 kinazın aktivitesi fosforilasyon-defosforilasyon mekanizması ve buna bağımlı olarak hücrel lokasyonu ile belirlenmektedir. Rim15p fosforlandığında inaktif olur ve sitoplazmada lokalize olur. Rim15 kinazın defosforile olmasıyla ise Rim15p nükleusa geçer ve aktifleşir. Rim15 kinaz STRE dizilerine bağlanarak stres genlerini aktive eden Msn2p ve Msn4p transkripsiyon faktörlerinin ve hücrenin PDS/durağan aşamaya geçişini kontrol eden Gis1p transkripsiyon faktörünün aktivasyonundan sorumludur. Glikoz varlığında aktifleşen PKA, Rim15 kinazı bloke ettiği için Msn2p/Msn4p/Gis1p transkripsiyon faktörleri aktifleştirilemez. Ayrıca PKA, Msn2p ve Msn4p transkripsiyon faktörlerinin fosforlanmasında görev alan Yak1p (Yet Another Kinase) kinazı baskılayarak Msn2p ve Msn4p transkripsiyon faktörlerinin inaktif halde kalmasını sağlar (Galdieri ve ark., 2010). Rim15 kinazın baskılanması hücrelerin logaritmik olarak üremesine neden olmaktadır. Aktif Rim15 kinaz Gis1p transkripsiyon faktörünü aktive ederek, promotorlarında PDS dizisi bulunduran genlere bağlanmasını ve ilgili genlerin ekspresyonunu sağlar (Şekil 2.6.) (Reinders ve ark., 1998; Görner, 2002).

Rim15 kinaz hücrelerin G_0 safhasına geçmesini pozitif etkilemektedir. Rim15 kinazın Aktivitesi, PKA yolağına ilave olarak TOR yolağı ve Pho80/Pho85 siklin/siklin-bağımlı

kinaz yolağı tarafından da inhibe edilmektedir. Rim15 kinazın sitoplazmada kalması Pho80p/Pho85p (Phosphate metabolism) kinaz bağımlı fosforilasyon ile gerçekleşmektedir (Wanke ve ark., 2005). Rim15 kinazın sitoplazmada tutulmasında 14-3-3 proteini olan Bmh2 (Brain Modulosignalin Homolog) proteininin rolü vardır. Rim15p üzerindeki Bmh2p bağlanma bölgesinde yer alan Thr1075 amino asitinin Pho80p/Pho85p kinaz tarafından fosforlanması sonucu Rim15p sitoplazmada tutulur (Pedruzzi ve ark., 2003; Wanke ve ark., 2005). TORC1 kompleksinin inhibisyonu Thr1075 amino asitinin defosforilasyonuna neden olur ve böylece Rim15p nukleusa geçerek aktif olur. Ayrıca TORC1p bağımlı Sch9p, Rim15 kinazı Thr1075 amino asitinden farklı bir Ser/Thr amino asitinden fosforlayarak sitoplazmada kalmasını sağlamaktadır (Wanke ve ark., 2005).



Şekil 2.6. *S. cerevisiae* maya hücresinde Rim15p regülasyonu (Wanke ve ark., 2005).

2.3.4. Snf1 Kinaz Sinyal Yolağı

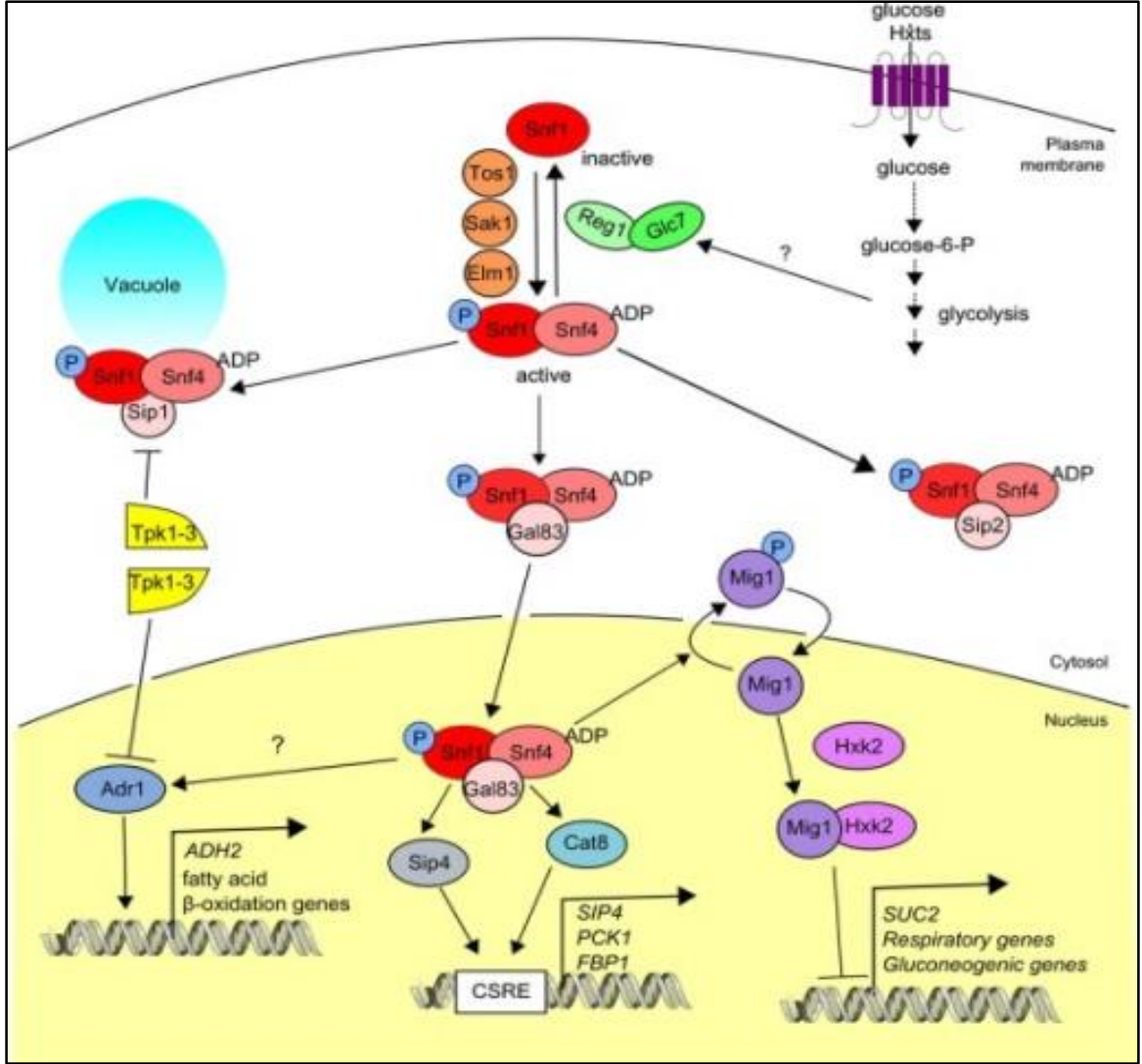
S. cerevisiae maya hücreleri fermente edilebilir karbon ve enerji kaynağı olarak öncelikli olarak glikozu tercih etmektedir. Glikoz varlığında diğer fermente edilebilir karbon kaynaklarının (sukroz, galaktoz, maltoz vb.gibi) kullanımı ile ilgili genler (*SUC*, *GAL*, *MAL*) baskılanmaktadır. Bu durum mayalarda glikoz baskılaması (Glucose repression) olarak bilinmektedir. Glikozun azalması durumunda veya yokluğunda ise bu karbon kaynaklarının kullanımı ile ilgili genler çalışmaktadır. Bu durum ise glikoz baskısının kaldırılması (Glucose derepression) olarak adlandırılmaktadır. Snf1p kinaz (Sucrose Nonfermenting 1)

kompleksi glikoz represyonunu-derepresyonunu kontrol eden en önemli proteindir. Snf1p kinaz ayrıca glikoneogenesis ve respirasyonda görevli proteinleri kodlayan enzimlerin de regülasyonundan sorumludur.

Snf1p kompleksi katalitik alt üiteden (Snf1p), regülatör veya stimülatör alt üiteden (Snf4p) ve lokalizasyon (β -subunit) alt ünitesinden oluşan heterotrimerik bir proteindir. Beta alt üite Snf1p kompleksinin hücrel lokasyonunu belirlemekte olup, Gal83p (Galactose Metabolism), Sip1p (SNF1-Interacting Protein) veya Sip2p proteinlerinden birisi olabilir. Eğer Snf1p/Snf4p dimerik proteine Gal83p bağlanırsa Snf1p kompleksi nükleusta; Sip1p bağlanırsa vakuol membranında ve Sip2p bağlanırsa sitoplazmada lokalize olmaktadır. Snf1p kinaz kompleksinin aktivitesi fosforilasyon-defosforilasyon mekanizması ile glikoz miktarına göre kontrol edilmektedir. Düşük glikoz varlığında Snf1p kompleksi Sak1 (Snf1 Activating Kinase)/Tos3 (Target of Sbf)/ Elm1 (Elongated Morphology) kinazlar tarafından fosforlanarak aktif hale geçmektedir. Yüksek glikoz konsantrasyonunda ise Snf1p kompleksi Glc7-Reg1 protein fosfataz tarafından defosforile edilerek inaktif hale geçmektedir (Şekil 2.7.) (Hedbacker ve Carlson, 2008).

Glikozun tükenmesi durumunda aktifleşen Snf1p kinaz kompleksi (Snf1p-Snf4p-Gal83p) nükleusa geçerek Adr1p (Alcohol Dehydrogenase II synthesis Regulator), Sip4p ve Cat8p (Catabolite repression) transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna, Mig1p (Multicopy Inhibitor of GAL gene expression) transkripsiyon faktörünün ise inaktivasyonuna neden olmaktadır. Mig1p transkripsiyon faktörü glikoz varlığında alternatif karbon kaynaklarının kullanımı ile ilgili genlerin, respirasyon ve glikoneogenetik genlerin baskılanmasında görev almaktadır. Mig1 proteinin Snf1 kinaz kompleksi ile fosforlanması, Mig1 proteininin Hxk2p (Hexokinase) transkripsiyon faktöründen ayrılmasına ve nükleustan sitoplazmaya geçmesine neden olur. Böylece Mig1p tarafından baskılanan tüm genler derepres olurlar. Ayrıca Snf1p kinaz bağımlı Adr1p, Sip4p ve Cat8p aktivasyonu etanol ve yağ asiti metabolizmasında görevli genlerin aktivasyonuna neden olmaktadır (Conrad ve ark., 2014). Aktif Snf1p kinaz kompleksi Msn2p ve Hsfp (Heat Shock transcription Factor) transkripsiyon faktörlerini özellikle glikoz yokluğunda kontrol etmektedir (Sanz, 2003).

Ayrıca, glikoz yokluğunda Snf1 kinaz kompleksi hedef genlerin promotorlarındaki kromatin yapılarını SAGA kompleksi aracılığıyla değiştirerek transkripsiyonu aktifleştirmektedir (Lo ve ark., 2001).



Şekil 2.7. *S. cerevisiae* maya hücresinde Snf1 kinaz sinyal yolağı ve transkripsiyonel regülasyonu (Conrad ve ark., 2014).

2.3.5. Msn2p/Msn4p ve Gis1p Transkripsiyon Faktörleri

Dioksik kayma sırasında önemli role sahip olan Rim15 kinazın aktivitesi çevre koşullarına bağlı olarak TOR ve PKA sinyal yolları üzerinden kontrol edilmektedir. Rim15 kinazın hedef proteinleri ise Msn2p, Msn4p ve Gis1p transkripsiyon faktörleridir. Bu transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonları birbirleri ile örtüşmekle beraber, her üç genin delesyonunda maya hücreleri nonfermentatif karbon kaynağında üreyememektedir (Roosen ve ark., 2005).

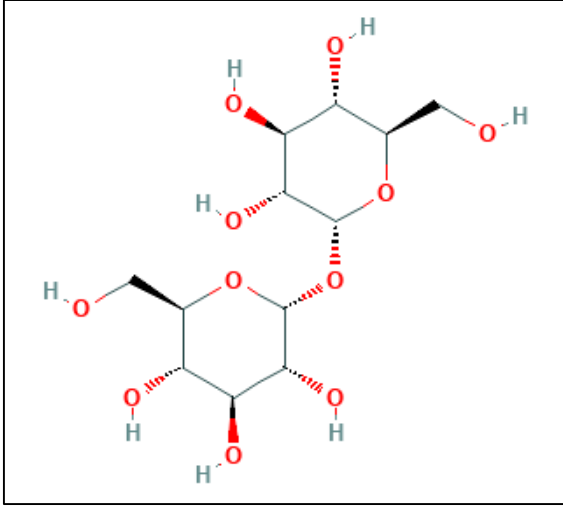
Msn2p ve Msn4p, çinko-parmak DNA bağlanma motifine sahip transkripsiyon faktörleri olup açlık ve farklı çevresel stres koşullarına karşı oluşturulan cevapta görev alan genlerin transkripsiyonları için gereklidirler (Estruch ve Carlson, 1993; Martinez-Pastor ve ark., 1996; Estruch, 2000). Msn2p/Msn4p aktivitesi nükleer translokasyonu ile belirlenir.

Aktif nükleer Msn2p/Msn4p ilgili genlerin promotorlarında bulunan STRE dizilerine bağlanarak transkripsiyonlarını sağlar. Msn2p/Msn4p aktivitesi PKA, TOR, Rim15 kinaz ve Snf1 kinaz yolları ile kontrol edilmektedir. PKA, Msn2p/Msn4p transkripsiyon faktörlerini fosforlayarak nükleustan sitoplazmaya geçmesini sağlar. İlave olarak 14-3-3 proteini olan Bmh2p, TOR yolağı üzerinden Msn2p/Msn4p transkripsiyon faktörlerine bağlanarak, bu faktörlerin nükleusa geçişini engeller. PKA ve TOR sinyal yolları Msn2p/Msn4p aktivitesini negatif olarak kontrol eder. Benzer şekilde nükleer Snf1 kinaz kompleksi (Snf1p-Snf4p-Gal83p) Msn2p/Msn4p transkripsiyon faktörlerinin besin azlığında fosforlanarak nükleustan çıkışını sağlamaktadır.

Gis1p, Msn2p/Msn4p transkripsiyon faktörlerinden farklı olarak, yalnızca Rim15p bağımlı regülasyona uğramaktadır. Bu nedenle Gis1p regülasyonunda PKA ve TOR sinyal yolları birlikte görev almaktadır. Üreme ortamında glikozun tükenmesi sonrasında maya hücrelerinde Rim15 kinaz aktive olur ve Gis1p transkripsiyon faktörünü aktive eder. Aktif Gis1p PDS elementlerine bağlanarak ilgili genlerin transkripsiyonu sağlar (Zhang ve ark., 2009).

2.4. *S. cerevisiae* Maya Hücrelerinde Trehalozun Görevi ve Metabolizması

Trehaloz maya hücreleri tarafından sentezlenen depo karbonhidratlardan birisi olup iki glikoz molekülünün α -1-1 glikozidik bağ ile bağlanmasıyla oluşan bir disakkarittir (Şekil 2.8.) (François ve ark., 1997). İndirgen olmayan trehalozun kararlılık ve hidrofilite gibi özelliklere sahip olması trehalozun stres durumunda görev yapabilmesi için gerekli temel özelliklerdir (Arguelles, 2000). *S. cerevisiae* maya hücrelerinde trehaloz, enerji kaynağı ve stres metaboliti olarak görev yapar. Maya hücrelerinin fizyolojik koşulları, üreme basamakları ve üreme ortamlarına göre trehalozun hücredeki seviyesi farklılık gösterir (Lillie ve Pringle, 1980). Trehaloz, çevre şartlarına ve hayat döngüsü basamaklarına göre hücrelerin kuru ağırlıklarının dörtte birini oluşturabilmektedir (Lillie ve Pringle, 1980). Trehaloz, *S. cerevisiae* hücrelerinin üremesinin yavaşlayıp durma noktasına geldiği durumlarda (biotin, fosfor, sülfür, azot vb. eksikliğinde) ve maya hücrelerinin logaritmik aşamasının bitiminde depolanmaktadır (Lillie ve Pringle, 1980; François ve ark., 1987, 1997, 2000). Ayrıca trehaloz molekülü maya hücresinde glikoz geçişini regüle ederek glikolizi kontrol etmektedir (Thevelein ve Hohmann, 1995). *TPS1* (trehaloz-fosfat sentez) gen mutasyonu taşıyan *S.cerevisiae* suşlarının glikoz içeren ortamda üreyemedikleri, gliserol-laktat ve galaktoz bulunan besiyerlerinde ise normal maya hücreleri gibi üreyebildikleri bilinmektedir (Thevelein ve Hohmann, 1995).

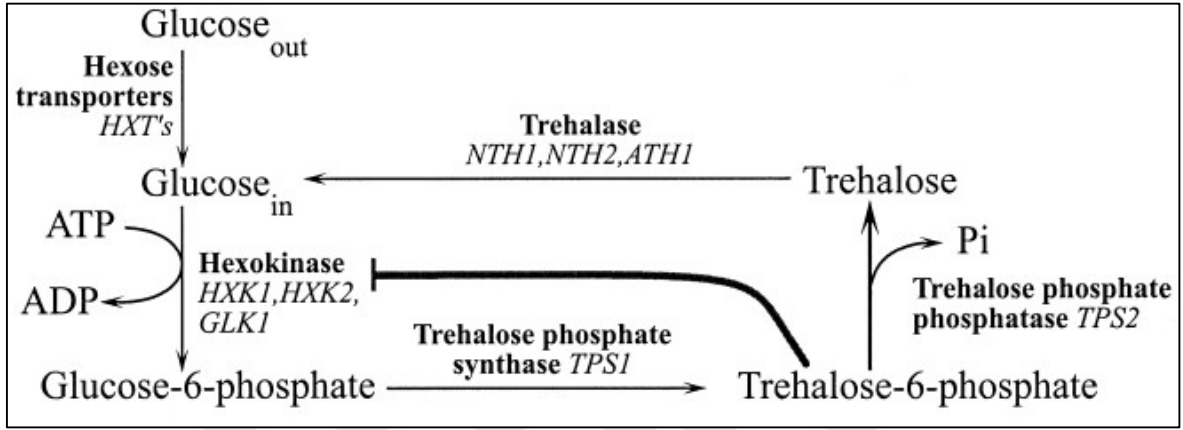


Şekil 2.8. Trehaloz molekülü (C₁₂H₂₂O₁₁) (PubChem CID: 7427).

S. cerevisiae maya hücreleri değişken çevre koşullarının oluşturduğu stresten dolayı depoladığı trehalozu stres koşulları sona erdiğinde hızlıca yıkarak glikoza parçalar. Trehaloz molekülü maya hücrelerinin farklı fizyolojik streslere (sıcaklık veya soğukluk, oksidasyon, kuruma, organik bileşikler, ağır metaller vb.) karşı hayatta kalmasını sağlamaktadır (Attfield, 1987; Riberio ve ark., 1999; Elbein ve ark., 2003). Hücre içerisinde sentezlenen trehaloz miktarı belli bir düzeyde tutulmaktadır. Bu nedenle trehalozun sentezinde ve yıkımında görevli genlerin kontrollü olarak çalışması gerekmektedir. *S. cerevisiae* maya hücresinde trehaloz molekülü Tps1 (Trehalose-6-Phosphate Synthase) enzimi aracılığıyla sentezlenmektedir (Elbein ve ark., 2003). Stres koşullarında biriktirilen trehalozun yıkımından ise nötral trehalaz enzimi sorumludur (Şekil 2.9.). *TPS1* geni, değişken sıcaklıklarda, kuruma durumlarında, ağır metaller veya organik bileşiklerin oluşturmuş olduğu stres koşullarında aktive olmaktadır (Parrou ve ark., 1997, 1999).

Trehaloz biyosentezi Tps1p, Tps2p, Tps3p ve Tsl3p olmak üzere 4 alt birimden oluşan Trehaloz Fosfat Sentaz (TPS) enzimi üzerinden gerçekleştirilmektedir (Bell ve ark., 1998; Kwon ve ark., 2003; Elbein ve ark., 2003; Avonce ve ark., 2006). İlk kez mayalarda tanımlanan trehaloz biyosentezi iki aşamada meydana gelmektedir. Sentezin başlaması üridin-di-fosfo-glikozdan glikoz-6-fosfata glikozil birimlerinin aktarılması ile olmaktadır. trehaloz-fosfat sentaz (Tps1p) enzimi glikozil birimlerinin aktarımı sağlar ve sonuçta UDP + trehaloz-6-fosfat oluşmaktadır (Şekil 2.9.). İkinci aşamada trehaloz-6-fosfattan fosfat grubu defosforile olarak serbest inorganik fosfat döngüsüne katılır ve böylece trehaloz molekülü oluşmaktadır (Cabib ve Leloir, 1958). Trehaloz-6-P fosfataz (Tps2p) enzimi trehaloz-6-fosfatın defosforilasyonunu sağlarken, düzenleyici alt birimler olan Tsl3p ve

Tps3p ise TPS kompleksinin kararlı halde kalmasını sağlamaktadır (Thevelein ve Hohmann, 1995; Bell ve ark., 1998). Trehaloz-6 fosfat, heksokinazları etkileyerek glikozun kontrollü bir şekilde hücreye alınmasını sağlar ve böylelikle glikolizi kontrol etmektedir (Blazquez ve ark., 1993; Eastmond ve Graham, 2003). Ancak TPS kompleksinin ve/veya Trehaloz-6-fosfatın glikolizi ve enerji metabolizmasını tam olarak nasıl kontrol ettiği henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Isı artışı Tps1 ve Tps2 proteinlerinin gen ifadesini arttırmaktadır (Singer ve Lindquist, 1998).

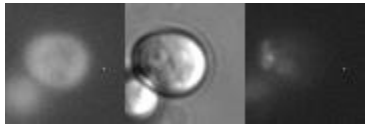

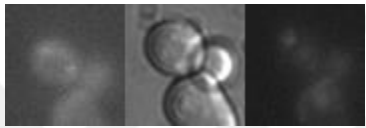





Şekil 2.9. Trehaloz metabolizması (De Silva-Udawatta ve Cannon, 2001).

Trehalozun hidrolizi trehalaz enzimlerinin katalitik aktiviteleriyle gerçekleşmektedir. Trehalaz enzimleri hücre içi lokalizasyonuna göre Ath1p ve Nth1p/Nth2p olmak üzere 2 farklı gruba ayrılmaktadır. Aynı zamanda bu trehalazlar pH değeri ve fonksiyon bakımından da farklılıklar göstermektedir. Nth1p ve Nth2p nötral trehalaz, Ath1p ise asit trehalaz olarak isimlendirilmektedir (Londesborough ve Varimo, 1984). Ath1 asit trehalaz enzimi vakuolde ve hücre zarında bulunmaktadır. Hücre membranında bulunan Ath1p, hücre dışı trehalozun yıkımından sorumludur, vakuolde bulunan trehalozun ise görevi henüz bilinmemektedir. Nth1 nötral trehalaz enzimi sitoplazmada, Nth2p nötral trehalaz proteini ise hem sitoplazmada hemde mitokondride lokalize olmaktadır (Şekil 2.10.). Stres koşulları altında sitoplazmada depolanan trehalozun yıkımı nötral trehalaz enzimi ile gerçekleştirilmektedir ve bu nötral trehalaz enzimi *NTH1* geni tarafından kodlanmaktadır (Elbein ve ark., 2003).

S. cerevisiae maya türünde *NTH1* (YDR001) geni IV. kromozom üzerinde, 2256 kb uzunluğunda nükleotid dizisine sahip intron bulundurmeyen gendir. Nth1p, 751 aminoasitten oluşmaktadır. *S. cerevisiae* maya hücresi ısı stresine maruz kaldığında *NTH1* geninin ifadesi artmaktadır. Isı stresi aynı zamanda Nth1p'nin enzimatik aktivitelerini de yükseltmektedir. *NTH1* promotörü üzerinde STRE (5'-CCCCT-/AGGGG-3) dizileri

bulunmaktadır. Bu STRE bölgelerinin ısı stresinde görev aldığı bilinmektedir (Nwaka ve ark., 1995a, 1995b). Benzer şekilde, metal ve oksidatif stres durumunda *NTH1* gen transkripsiyonu aktif hale geçmektedir. Glikoz miktarının yine *NTH1* geninin ekspresyonunu etkilediği bilinmektedir (Zahringer ve ark., 2000).

Protein	GFP Görüntüsü	Lokasyon Görüntüsü	Hücresel Lokasyon
Nth1p			Sitoplazma
Nth2p			Sitoplazma Mitokondriyon
Tps1p			Sitoplazma

Şekil 2.10. Nth1p, Nth2p ve Tps1p proteinlerinin hücresel lokalizasyonları. Nth1p SET ID: 5964; Nth2p SET ID: 5785; Tps1p SET ID: 1964. (yeastgfp.yeastgenome.org).

Trehaloz molekülünün, *NTH1* aracılığıyla yıkımı ile TPS aracılığıyla sentezi glikolizin regülasyonu ve trehaloz metabolizması için önemlidir (Elbein ve ark., 2003). Hekzokinaz aktivitesini ve glikoz transportörlerini kontrol eden TPS, glikolize gelen şeker miktarını azaltır (Thevelein, 1992; Blazquez ve ark., 1993). Hekzokinaz aktivitesini inhibe eden trehaloz-6-fosfat, glikozun glikolitik yol yerine alternatif yollara girmesini sağlar (Şekil 2.9.) (François ve Parrou, 2001; Elbein ve ark., 2003). Bu sayede, hücresel koşullara göre, trehaloz metabolizması glikolizin fazla çalışmasını inhibe eder. Ek olarak, *tps1* mutantlarında yapılan bir çalışmada, glikolizde hücre içi inorganik fosfat (P_i) miktarında azalma ve fruktoz-1,6-bisfosfata kadar ara ürünlerde birikme saptanmış olup, glikoz eklenmesinin ardından ATP'nin hızlıca yıkılması trehaloz metabolizmasının bir tür glikolitik koruma vanası olarak çalıştığını ortaya koymaktadır (François ve Parrou, 2001).

2.5. *S. cerevisiae* Maya Hücrelerinde *GIS1* Geni ve Fonksiyonu

GIS1 geni 4. kromozom üzerinde olup, 2685 kb uzunluğundadır. Gis1p, 894 aminoasitten oluşan JmjC/JmjN ailesine ait monomerik bir proteindir. Gis1 proteini, Msn2p/Msn4p transkripsiyon faktörleri gibi, C₂H₂-tip çinko parmak DNA bağlanma motifine sahip, sürekli olarak nukleusta lokalize olan bir transkripsiyon faktörüdür. Gis1p ayrıca histon dimetilaz aktivitesine sahip olduğu için transkripsiyonel represör/aktivatör olarak da görev yapmaktadır (Jang ve ark., 1999). Klasik genetik yöntemler ile yapılan çalışmalarda, Gis1 proteininin yokluğunda, hücrelerin kimyasallara karşı direncinde azalma, spor duvarı oluşumunda anormallikler ve kronolojik yaşam uzunluğunda azalma tespit edilmiştir (Coluccio ve ark., 2004; Suda ve ark., 2009; Kapitzky ve ark., 2010; Schroeder ve ark., 2013; Gaupel ve ark., 2014). *GIS1* geninin normalden fazla ekspresyonunun ise hücre morfolojisinde ve büyüklüğünde anormalliklere neden olduğu belirlenmiştir (Sopko ve ark., 2006).

Gis1p besin açlığında gerekli olan genlerin promotor bölgelerinde bulunan post-dioksik-kayma elementlerine (PDS) (5'-T[AT]AGGGAT-3') bağlanır. Gis1 transkripsiyon faktörü *SSA3* (Stress-Seventy subfamily A), *HSP12* ve *HSP6* gibi stres genlerinde transkripsiyonel aktivatör olarak, *DPP1* (Diacylglycerol Pyrophosphate Phosphatase) ve *PHR1* (Photoreactivation Repair deficient) gibi genlerde ise transkripsiyonel represör olarak görev yapar (Jang ve ark., 1999; Pedruzzi ve ark., 2000; Oshiro ve ark., 2003). Ayrıca yapılan bir mikroarray çalışmasında dioksik kayma aşamasında 100'den fazla genin Gis1p tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (Cameroni ve ark., 2004). Gis1p sporulasyonun indüklenmesinde görev alan bazı genlerin de regülasyonundan sorumludur.

Gis1p, Msn2p ve Msn4p transkripsiyon faktörleri gibi, C₂H₂-tip çinko parmak DNA bağlanma motifine sahip diğer bir transkripsiyon faktörü Rph1 (regulator of PHR1) proteini olup, Gis1p ile %34 sekans benzerliğine sahiptir. Rph1p ve Gis1p çinko parmak yapılarının birbirine çok benzer olmasından dolayı benzer DNA motifine bağlandıkları düşünülmektedir. Rph1p ayrıca STRE motiflerine de bağlanabilmektedir. Her iki proteinde *DPP1* ve *PHR1* genlerinin baskılanmasında görev almaktadır (Oshiro ve ark., 2003).

Yapılan çalışmalarda Rph1 ve Gis1 proteinlerinin Jumonji N ve C yapılarına sahip olduğu belirlenmiştir. Jumonji yapısı iki parçalı bir domain olup JmjN ve JmjC olmak üzere iki subdomain'den oluşmaktadır. Eukaryotik birçok transkripsiyon faktörünün yapısında bulunan bu domainlerden JmjC histon demetilaz aktivitesine sahiptir. Birçok histon demetilazın yapısında JmjC yapısı bulunmaktadır. Histon demetilaz enzimleri H3 histonunda bulunan farklı lizin (K4, K9, K36, K27) ve arjinin (R2) amino asitlerinden metil

gruplarını koparmaktadır (Tsukada ve ark., 2005; Yamane ve ark., 2006; Agger ve ark., 2007; Chang ve ark., 2007; Tahiliani ve ark., 2007). Rph1p, H3 histonun di- ve tri-metillenen 36. Lizin amino asitindeki (H3K36me2 ve H3K36me3) ve mono-metillenen 9. Lizin amino asitindeki (H3K9me1) metilleri koparmaktadır. Gis1p ise mono- ve di-metillenen 36. Lizin amino asitinden (H3K36me1 ve H3K36me2) metilleri koparmaktadır (Klose ve ark., 2007; Westholm ve ark., 2012). Metilasyon-demetilasyon nükleozomların mobilizasyonuna ve dolayısıyla kromotinin yeniden modellenmesine sebep olmaktadır.

Gen aktivasyonunda ve represyonunda promotora ilgili transkripsiyon faktörlerinin ve regülatörlerinin bağlanabilmesi için, nükleozomların kapattığı bağlanma bölgelerinin açılması gerekmektedir. Promotorlarında nükleozomlar tarafından kapatılan STRE veya PDS elementlerinin öncelikle farklı kromatin açma yöntemleri ile açılması gerekmektedir. Bu yöntemlerden biri olan demetilasyon, Gis1 proteininin JmjC yapısında bulunmaktadır. Gis1 proteini hem transkripsiyon faktörü olarak hem de transkripsiyon regülatörü olarak iki farklı göreve sahiptir. Benzer özellik mayalarda daha önce belirlenmiş olup (örneğin Hxk2p), bu şekilde birbirinden farklı iki biyolojik aktiviteye sahip olan proteinlere ‘Moonlighting Proteins’ adı verilmiştir. Gis1 proteininin de bu grupta bir protein olma ihtimali yüksektir. Birbirinden bağımsız olan iki aktiviteden hangisinin hangi gende hangi koşullarda kullanılacağı ise henüz Gis1p için bilinmemektedir.

Değişik stres şartlarında aktivasyonu yükselen *NTH1* geninin transkripsiyonel düzenlenmesi ve bu düzenlenmede görev alan proteinler tam olarak bilinmemektedir. *NTH1* promotor bölgesinde 3 tane olası Gis1 proteini bağlanma bölgesi bulunmaktadır (Şekil 2.11.). Ayrıca *NTH1* promotorunda bulunan Gis1p proteini bağlanma elementlerinin (PDS) nükleozomlar tarafından kapatıldığı belirlenmiştir. Bu yüzden bu çalışmada önceden *NTH1* geni ile alakası araştırılmamış fakat potansiyel olarak transkripsiyonel düzenleyicisi olabileceğini düşündüğümüz Gis1 transkripsiyon faktörünün *NTH1* geninin transkripsiyonuna olan etkisi belirlenmiştir.

1 ATAAGACCTCGTTACTACACCAATCGTGTTTAGAAATTCCAGAACAGAGAA
52 GAGTAGTTATAAGATTGGAACAATCAGAAAAACAAGAAGTTCTTGAATGTC
103 AGTGGTCATGGAGAAAGAAAGGTAAGGAACCGTAGCCGTAGCTTAGACTTT
154 TCGAACCGAGACTGGAACATTTCTTGAAGAAGCAGAAGAAGGTAACAGAAT
205 TGTAGATGGAAAAGGTCCACTTGGTGACCAAGTTTTACCTATAGACCACTA
256 AGACCTCGTAGTAGTGGAAGGAAGAACC AAAGGAGGAACCATAGAAGAAGC
307 AGAAAGAACCAAAGACCGAAAAGCCGGAAGAATGGTGGTTTTGTACCTCTTC
358 TGTCGTCTCCTACCACCGAAACCTCGTCGGAGAAGGAAGAACAGCTGCTGT
409 CCAAAGAATAGAAGCGATCTGTAAGAAAAAGATATCAACACAAATAGAAGA
460 ACGAAAATAAAGTTTAATTTGTTCTAGAAAGAAGAAAGAGGTTAACTTATA
511 GTTAAAGTAGTAGTCTAAAATCAAAGACAAAATAAAAAATAAAAAATAAAA
562 AAAAAACAAAGAACAAAAGGCGCATGAAGGGCGACCCGCTTTTTTTCTTTA
613 CTTTTTTTCTTTGCTGTCCTCGTAGCACATCCTGCTTC **GGGGAATA** **GGGGA**
664 TCAATGGCTTCTCCGGTGGTTAGAATTCAAACATCTCGTCATGAATATA
715 TTCCGATATATATCTGACCAAGTGTTCCAATAGTTATACTTTGAACGCGCT
766 AGTGGCTAAATGCCCTAAAAAGTCCTCGCTCCATGTTCTAAACAACCGGAC
817 TTTTCTAGCGTTTTGTAATCGATCTTTAAAAG **GGGGA** TAGCAAAAGGCATC
868 TCATTTATATTATAGTTCTTCTATCAAATATAACTGACTAAAGTGTTGGT
919 TGACGTATCTATATTCCTCTAATGATCTATGTTCTTGCGGACTATTTGTTT
970 TTTTCTTTTTAATTGTTTTTTTTAGTCATCT

Şekil 2.11. *NTH1* promotoru ve potansiyel Gis1p bağlanma bölgeleri (3'-GGGGA-5') (<http://www.yeasttract.com/view.php?existing=locus&orfname=YDR001C>).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışmada Kullanılan Maya Suşları

Araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* maya suşları BY4741 (Yaban tip) ve Y04031 (*Δgis1* mutant) maya suşları olup EUROSCARF (European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis) *S. cerevisiae* maya koleksiyonundan temin edilmiştir. Maya suşlarının genotipleri BY4741 (*MATa, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0*) ve *Δgis1* (*MATa, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YDR096w::kanMX4S*) şeklinde olup *Δgis1* maya suşu BY4741 suşu ile izogeniktir. BY4741 maya suşu standart haploid *S. cerevisiae* maya suşudur ve genomu tamamen sekanslanmış olup metabolik yollarında görevli genlerde mutasyon içermeği bilinmektedir.

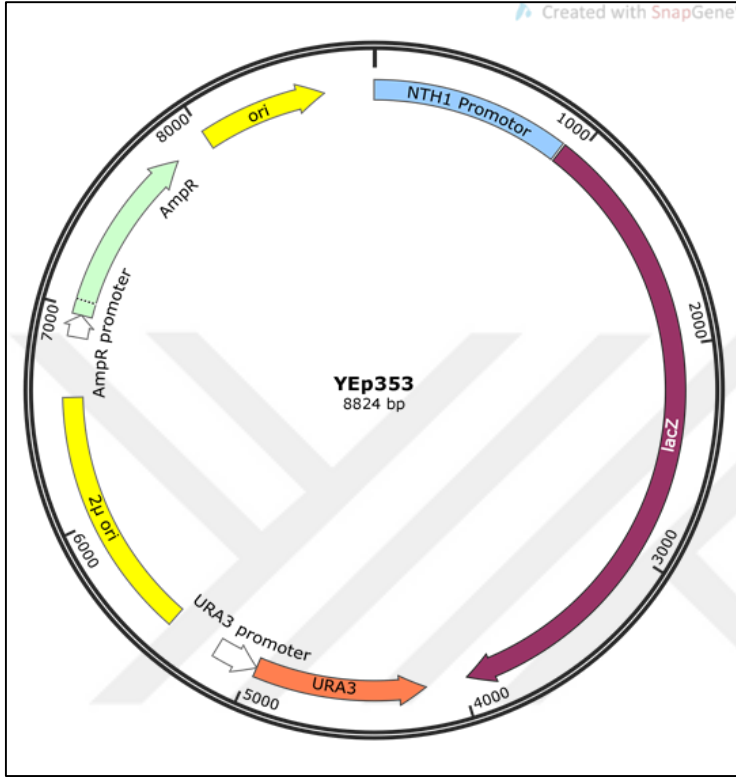
3.2. Çalışmada Kullanılan Maya Suşlarının Üreme Ortamları

Yaban tip ve *Δgis1* mutant maya suşları sıvı minimal üreme ortamında (YNBD-HLMU: %0,16 Yeast Nitrogen Base; %0,5 Amonyum sülfat; %2Dekstroz; %0,2 Histidin; %0,3 Lösin; %0,2 Metiyonin; %0,5 Urasil) 30 °C’de 120 rpm çalkalama ile bir gece üretildi. Bu kültürlerden maya hücreleri taze sıvı YNBD-HLMU üreme ortamlarına OD₆₀₀ değeri yaklaşık 0,1-0,2 olacak şekilde geçirildi. Her 2 saatte sıvı hücre kültürlerinden 1ml örnek alınarak spektrofotometre de (Shimadzu UV-1201) OD₆₀₀ değeri ölçüldü. Elde edilen sonuçlar zamana karşı absorbans (OD₆₀₀) değerleri yerleştirilerek grafikleri çizildi. Bu grafiklerden maya suşlarının ikilenme süreleri (dt; doubling time) hesaplandı.

3.3. Çalışmada Kullanılan Plazmitlerin Yapısı

Çalışmada *SUC2-LacZ* ile *NTH1-lacZ* gen füzyonlarını bulunduran plazmitler kullanıldı. *SUC2-LacZ* gen füzyonunu içeren plazmid Tülay TURGUT GENÇ’ten temin edilirken, *NTH1-LacZ* gen füzyonu içeren plazmid ise Uludağ Üniversitesi (Bursa), Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde bulunan Prof. Dr. Sezai TÜRKEL’den temin edilmiştir. Kullanılan plazmitler selektif besin ortamında *S. cerevisiae* maya hücresi içerisinde stabil olarak kalabilen Yeast Episomal plazmitlerdir (Liao ve ark., 1993). Plazmitlerin yapısında AmpR (Ampisiline resistance), Ori (Escherichia coli replication origin), LacZ (Beta-galactosidase reporter gene), URA3 (Selection marker for Yeast), 2μ ori (*S. cerevisiae* replication origin) bölgelerini içermektedir (Şekil 3.1.) (Rose ve ark., 1990). Ayrıca *NTH1* ve *SUC2* promotor bölgelerini içermektedir. *NTH1-LacZ* gen füzyonu içeren

plazmitlerin promotor bölgesi yaklaşık olarak 770bp uzunluğundadır ve transkripsiyonu düzenleyen kontrol bölgelerini kapsamaktadır (Parrou ve François, 1997). *SUC2* geni stres ile aktive olmayan bir gen olduğu için *SUC2-LacZ* gen fizyonu içeren plazmit çalışmada kontrol olarak kullanıldı.



Şekil 3.1. *NTH1* promotor bölgesini içeren Yep plazmitinin yapısı.

3.4. Plazmit Amplikasyonu ve Maya Hücrelerine Transformasyonu

Çalışmada kullanılan plazmitler XL1-Blue *E. coli* bakteri hücrelerine $MgCl_2$ - $CaCl_2$ yöntemiyle transform edildi (Ausubel ve ark., 1993). *E. coli* transformantları ampisilin (35 mg/ml) antibiyotigini bulunduran petrilere (Ty^{amp}) aktarıldı. Petrilere üreme gösteren transformant bakteri hücrelerinden tek koloni alınarak ampisilin içeren NB (Nutrient Broth) sıvı ortama geçirildi. Bakteri hücreleri 37 °C’de 16-18 saat inkübe edildi. Daha sonra plazmit purifikasyonu için GeneJet Plasmid Kiti (#K050-Fermentas) kullanıldı. Ayırıştırılan plazmidler son hacim 100 μ L olacak şekilde TE içerisinde -20 °C de muhafaza edildi.

Amplife edilen plazmitler yaban tip (BY4741) ve *Δgis1* mutant maya hücrelerine, polietilen glikol-lityum asetat (PEG + LiOAC) yöntemi kullanılarak transform edildi. (Rose ve ark., 1990). Maya hücreleri urasil içermeyen katı minimal seçici üreme ortamına YNBD-HLM (+ %2 Agar) transfer edilerek 30 °C sıcaklıkta 3 ile 5 gün inkübe edildi. Petrilere

üreme gösteren transformant maya kolonilerinden tek koloniler taze YNBD-HLM petrilere aktararak 30 °C’de üretilerek taze olarak çalışmalarda kullanıldı.

3.5. Transformant Maya Hücrelerinin Üretilmesi ve Örnek Alımı

Transformant maya hücreleri sıvı YNBD-HLM üreme ortamlarında 30 °C’de 120 rpm çalkalamalı inkübatörde bir gece üretildi. Taze sıvı YNBD-HLM üreme ortamlarına bir gecelik kültürlerden maya hücreleri OD₆₀₀ değeri 0,2 olacak şekilde aktarıldı ve aynı şartlarda üremeye bırakıldı. Daha önce üreme eğrilerinde belirlenen üreme aşamalarına gelen kültürlerden (logaritmik aşamada yaklaşık OD₆₀₀ 1,0-1,2 değerinde (8-10 saat); dioksik kayma aşamasında (~24 saat); post-dioksik kayma aşamasında (~48 saat) ve durağan aşamada (~100 saat) hücre örnekleri alınarak, gen ekspresyon seviyesi Beta-galaktozidaz enzimatik yöntemi ile hücredeki total protein miktarı Lowry yöntemiyle ve hücre içi biriktirilen trehaloz miktarı trehalaz enzimatik yöntemi ile belirlendi. Tüm deneyler en az 3 tekrarlı olarak yapıldı ve standart sapmaları hesaplandı.

3.6. Beta-galaktozidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Logaritmik aşamada, dioksik kayma aşamasında, post-dioksik aşamasında ve durağan aşamada alınan hücreler santrifüjde (Hettich–Universal 320 R) çöktürülerek steril distile su ile yıkandı. Transformant maya hücreleri 0,2 ml breaking buffer (%20 Gliserol; 4mM PMSF; 1mM DTT; 100mM Tris pH=8.0) içinde resuspend edildi. Hücre süspansiyonlarına 20 µl %0,1 SDS ve 20 µl Kloroform eklenerek maya hücrelerinin lizatları oluşturuldu. 970 ml Z-Buffer (10mM KCl; 1mM MgSO₄; 60mM NaHPO₄; 40mM NaH₂PO₄) üzerine bu hücre lizatlarından 30 µl eklenerek 30 °C’de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra süspansiyon üzerine 20 µl ONPG (Z-Buffer içinde hazırlanmış olan %0,4 2-Nitro-B-D-galactopyranoside) eklendi (Guarente ve Ptashe, 1981; Ausubel ve ark., 1993). Reaksiyonun başlama zamanı kaydedildi. Sarı renk görülünceye kadar 30 °C’de bekletildi. Renk dönüşümü gözlemlendiğinde, 0,5ml Na₂CO₃ (1M) çözeltisi eklenerek reaksiyon bitiş süresi kaydedildi. Reaksiyon sonunda oluşan sarı renkli çözelti spektrofotometrede OD₄₂₀ dalga boyunda ölçüldü. Transformant maya hücrelerinin, hücre içerisindeki toplam protein miktarını ölçmek için Lowry metodu kullandı (Lowry, 1951). Hücre lizatlarından 0,02 ml alınarak 0,18 ml distile suyla resuspend edildi. Daha sonra 1 ml Buffer-C (9,8ml Buffer-A (%2 Na₂CO₃; %0,4 NaOH); 0,1 ml Buffer-B1 (% 1,56 CuSO₄.5H₂O); 0,1 ml Buffer-B2 (%2 KNaC₄H₄O₆) ilave edildi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Reaksiyon 0,1 ml Folin Ciocalteu’s reagent ilave edilerek tekrar 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Reaksiyon

sonunda oluşan mavi renkli çözelti spektrofotometrede OD₇₅₀ dalga boyunda ölçüldü. β -galaktozidaz aktiviteleri dakikada 1 mg protein tarafından hidroliz edilen nmol ONPG (nmol ONPG/dk/ mg protein) olarak hesaplandı. Sonuçların çoğunda standart sapmanın %10'nun altında olduğu belirlendi.

3.7. Trehalaz Enzim Aktivitesinin Saptanması

Parrou ve François (1997) tarafından geliştirilen metot kullanılarak trehalozun enzimatik ölçümü saptandı. Farklı üreme aşamalarında alınan *S. cerevisiae* maya hücreleri çöktürülerek, +4°C steril saf su ile iki defa yıkandı ve hücrelerin yaş ağırlıkları ölçüldü. Daha sonra hücrelerin üzerine 0,25 ml 0,25M Na₂CO₃ çözeltisi, eklenerek 95-100°C'de 2 saat boyunca kaynatıldı. Kaynama sonrasında hücre lizatının üzerine 0,15 ml 1M Asetik asit ve 0,6 ml 0,2M NaOAc eklendi. Hücrelerin içinde biriktirilen trehalozun miktarını ölçmek için hücre lizatının üzerine 1.5mU trehalaz enzimi (Sigma T-8778) eklendi ve 18 saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında trehalaz enzim aktivitesinin sonucunda parçalanmış olan trehalozdan açığa çıkan glikoz miktarları GOD (Glikoz Oksidaz-Peroksidaz) metoduyla hesaplandı (Goldstein ve Lampen, 1975). GOD enzimi ilave edilen hücre lizatları 15dk boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Meydana gelen renk değişimi spektrofotometrede OD₅₄₆ dalga boyunda ölçüldü. Ölçülen glikoz değerleri glikoz-standart çözeltisinin değerlerine göre maya yaş ağırlığı üzerinden normalize yapılarak miligram hücrede depolanan mikro gram glikoz (μ g glikoz/mg yaş maya ağırlığı) şeklinde hesaplandı.

3.8. Çalışmada Kullanılan Veri Tabanları

3.8.1. *Saccharomyces* Genome Database (SGD) Veri Tabanı

SGD, *S. cerevisiae* maya türünün genomu, genleri, proteinleri ve diğer özellikleri hakkında bilgi içeren bir veritabanıdır (yeastgenome.org). Ayrıca bu veri tabanı *S. cerevisiae* maya türü hakkında güncel literatür bilgisini bulduran bir sistemdir. Kullanımı oldukça kolay olan veri tabanına erişim ücretsizdir ve web sayfaları aracılığıyla dünya çapındaki tüm araştırmacılar buradaki verilere kolaylıkla ulaşabilmektedir. Sisteme yüklenen her verinin kendisine ait kimlik numarasıyla araştırmacıları ortak bir noktada buluşturmaktadır. Çalışmamızda *NTH1* geninin promotor bölgesi SGD veri tabanından alındı.

3.8.2. Yeasttract Veri Tabanı

Yeasttract kendi verilerini SGD üzerinden güncelleyen daha sade arayüzü olan bir veri bankasıdır (yeasttract.com). Bu veri bankasında *S. cerevisiae* maya türünün genleri, transkripsiyon faktörleri hakkında bilgiler ve uygulamalar bulunmaktadır. Genlerin promotor bölgelerine bu veribankasından da hızlıca ulaşılabilir. Ayrıca DNA-protein etkileşimleri, protein-protein etkileşimleri yine bu veri tabanı kullanılarak oluşturulabilir. *NTH1* promotor bölgesindeki Gis1 proteinin bağlanma dizileri (DNA-protein intraction / DNA-TF) bu veri tabanı kullanılarak belirlendi.

3.8.3. Transkripsiyon Faktörü Bağlanma Profili Veritabanı - JASPAR

Yüksek kaliteli “transkripsiyon faktörü bağlanma profili” veritabanı olan JASPAR görsel olarak bağlanma profillerini net bir şekilde gösterebilen bir veri bankasıdır (jaspar.genereg.net). 5 farklı grubun (Vertebrata, Nematoda, Insecta, Plantae, Fungi) transkripsiyon faktörlerinin, DNA’ları üzerinde bağlanabildiği bölgelerin profillerine bu veri bankasından ulaşılabilir. Çalışmamızda Gis1 proteinin *NTH1* promotoruna bağlanma ihtimali olan bölgenin dizisini (ID: MA0306.1) bu veri bankası kullanılarak elde edildi. Elde edilen sonuç Yeasttract veri tabanından elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı.

3.8.4. Chromatin Folding V2 Programı

Tom Bishop bilgisayar tabanlı moleküler çalışmalar yapan bir biyologdur. Temel araştırmaları DNA ve kromatin yapısı ve dinamikleri ile genetik işlev ve işlev bozukluğu (örn., Transkripsiyon, düzenleme, kopyalama ve onarım) ile nasıl ilişkili olduğu hakkındadır. Geliştirmiş olduğu uygulamalar bize DNA’nın sarıldığı nükleozomlar hakkında tahmini bilgiler vermektedir (dna.ccs.tulane.edu). Tom Bishop’ın Teorikal Moleküler Biyoloji Laboratuvarının kodlamış olduğu Chromatin Folding v2 programı kullanılarak *NTH1* promotor (~1000bp) bölgesinde bulunan nükleozomların lokasyonları belirlendi.

Chromatin Folding v2 program aracılığıyla *NTH1* promotorundaki nükleozomların sayısı ve yerleri belirlendikten sonra, daha önce hazırlanan *NTH1* promotorundaki üzerindeki URS_{STRE/PDS} bölgeleri ile nükleozomların yerleri görselleştirildi.

3.8.5. VMD - Visual Molecular Dynamics Programı

Bu programı Theoretical and Computational Biophysics Group kodlamış olup, erişimi ücretsizdir. Proteinlerin 3 boyutlu yapısını görselleştirmemize yarayan (*.pdb) bir

programdır (www.ks.uiuc.edu/Research/vmd). VMD programı aracılığıyla Gis1 proteininin üzerindeki aktif bölgeler belirlenerek görselleştirildi.

3.8.6. UCSF Chimera Programı

RBVI tarafından geliştirilen, moleküler yapıların ve biyolojik bilgilerin görselleştirme ve analizlerini sağlayan ücretsiz bir programdır (www.cgl.ucsf.edu/chimera). VMD 'ye alternatif olarak daha kolay bir arayüzü olan programın aynı zaman da VMD 'ye göre çok daha iyi görselleştirme seçenekleri mevcuttur. VMD kullanılarak yapılan çalışmalar UCSF Chimera programı kullanılarak daha iyi bir görsel elde edilmede kullanıldı.

3.8.7. Megasoftware 7.0 Programı

Sürekli bir şekilde güncellenen bu ücretsiz uygulama Sudhir Kumar ve arkadaşları tarafından yazılmıştır ve 2016 yılında 7.0 versiyonuyla bilgisayarlardaki yerini almıştır. DNA ve protein hizalama, çok fazla sayıda benzerlik, uzaklık, atasallık ve evrimsel ağaçlar oluşturmak gibi birden fazla özelliği olan bir uygulamadır (www.megasoftware.net). Hs_JMJD2A, Rph1 ve Gis1 proteinlerinin amino asid sekansı Megasoftware 7.0 hizalanarak Gis1 proteininin histon peptid bağlanma bölgesi tahmin edilmeye çalışıldı.

3.8.8. Web Tabanlı 3 Boyutlu Protein Modelleme Serverları

Zhang Lab'ın geliştirmiş olduğu I-TASSER (zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER) programı, Swiss Institute of Bioinformatics bölümünün geliştirmiş olduğu swiss-model (swissmodel.expasy.org) ve Baker Lab'ın geliştirmiş olduğu Robetta protein modelleme programları (rosetta.bakerlab.org) aracılığıyla Gis1 transkripsiyon faktörünün 3 boyutlu modelinin tahmini şekli ortaya çıkarılmaya çalışıldı.

Tahminler sonucu oluşturulan pdb dosyaları Visual Molecular Dynamics (VMD) programında multiseq analizi sonucu QH, RMSD ve identity değerleri karşılaştırıldı. Gelen modelleme dosyaları EMBL-EBI'nin geliştirmiş olduğu PDBsum programına yüklenilerek 3 farklı modelin ramachandran, topology ve secondary structure verileri karşılaştırıldı. Visual Molecular Dynamics (VMD) programı kullanılarak gerçeğine en yakın 3 boyutlu modeli görselleştirildi.

VMD programı aracılığıyla hidrojen atomları uzaklaştırılarak, 13704 atomu bulunan 3 boyutlu Gis1 proteininin yapısından, hidrojeniz 6990 atomlu Gis1 proteininin 3 boyutlu modeli elde edildi ve "Gis1-No-Hidro.pdb" şeklinde kaydedildi. *In silico* ortamlardaki hesaplamaların gecikmesini önlemek amacıyla atom sayısı azaltıldı ve docking olarak

adlandırılan programlarda kullanılmak üzere Gis1 proteininin 3 boyutlu yapısı hidrojeniz olarak hazırlandı.

Tom Bishop'ın Teorikal Moleküler Biyoloji Laboratuvarının oluşturdukları DNA Maker adlı program vasıtasıyla, üzerinde 5'-CCCCT-/AGGGG-3' bölgesinin bulunduğu *NTH1* promotorundan 60kb fragment kesildi ve 3 boyutlu hale getirilen bu DNA parçacığı "STRE-PDS60kb_NTH1.pdb" şeklinde kaydı yapıldı.

International Institute of Molecular and Cell Biology - Laboratory of Bioinformatics and Protein Engineering'in geliştirmiş olduğu bir program aracılığıyla (NPDock) Nükleik asit-Protein Dock çalışması yapıldı.



BÖLÜM 4

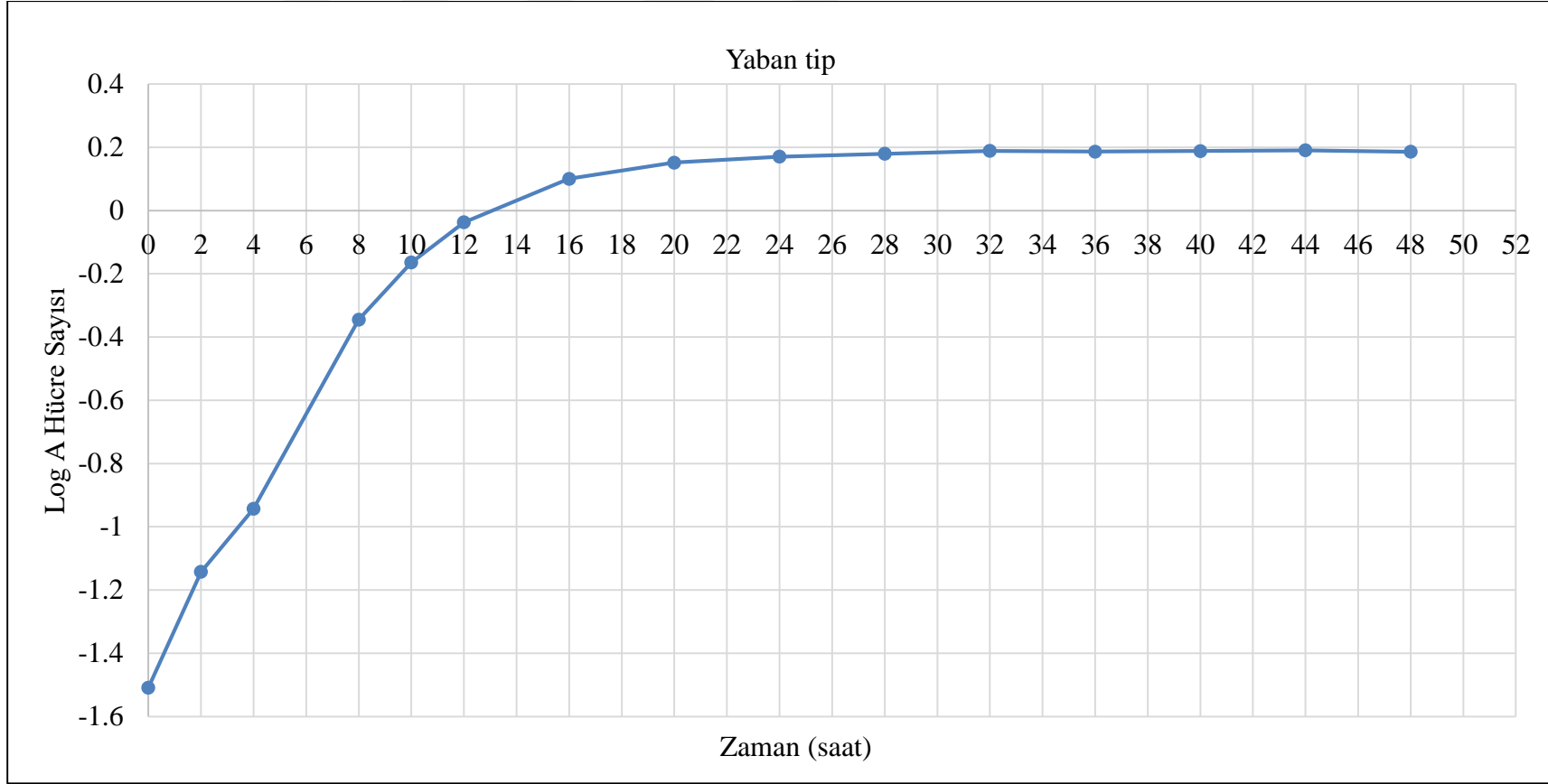
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Çalışmada Kullanılan Maya Suşlarının İkilenme Süreleri

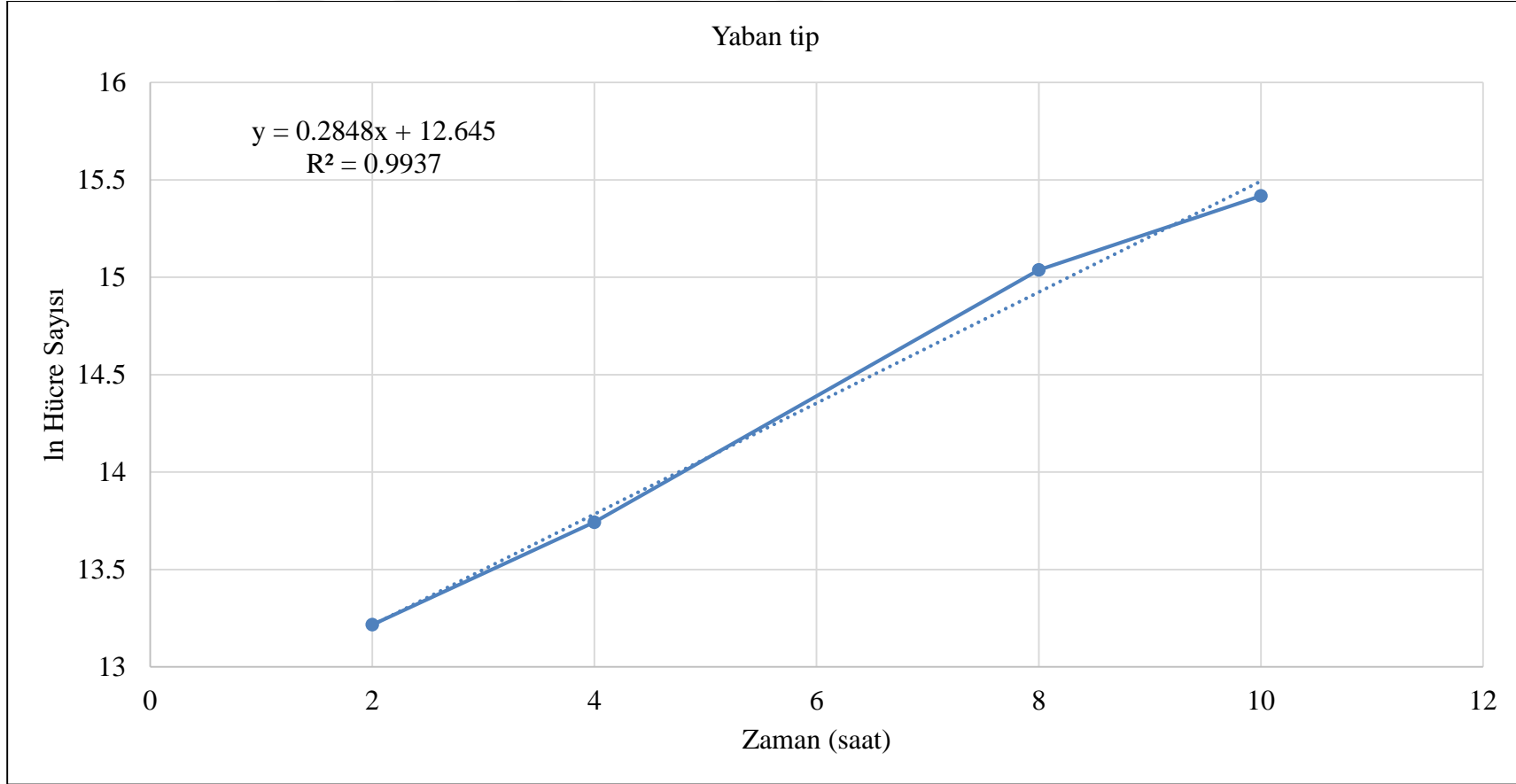
Yaban tip ve *Δgis1* mutant maya suşları sıvı minimal üreme ortamında (YNBD-HLMU) 30 °C’de 120 rpm çalkalama ile 100 saat üretildi. Bu kültürlerden her 2 saatte 1ml örnek alınarak spektrofotometre de OD₆₀₀ değeri ölçüldü. Elde edilen sonuçların zamana karşı OD₆₀₀ değerleri yerleştirilerek grafikleri çizildi. Yaban tip maya suşunun LogA hücre sayısı olarak üreme eğrisi Şekil 4.1.’de, ln hücre sayısı olarak üreme eğrisi Şekil 4.2.’de verildi. *Δgis1* mutant maya suşunun ise LogA hücre sayısı olarak üreme eğrisi Şekil 4.3.’te, ln hücre sayısı olarak üreme eğrisi Şekil 4.4.’te verildi. Bu grafiklerden maya suşlarının ikilenme süreleri (dt; doubling time) hesaplandı. Yaban tip maya suşunun ikilenme süresi yaklaşık olarak 2 saat 40 dakika olarak, *Δgis1* mutant maya suşunun ikilenme süresi ise yaklaşık 4 saat olarak hesaplandı.

4.2. Gis1p Transkripsiyon Faktörünün *NTH1* Gen Ekspresyonuna Etkisi

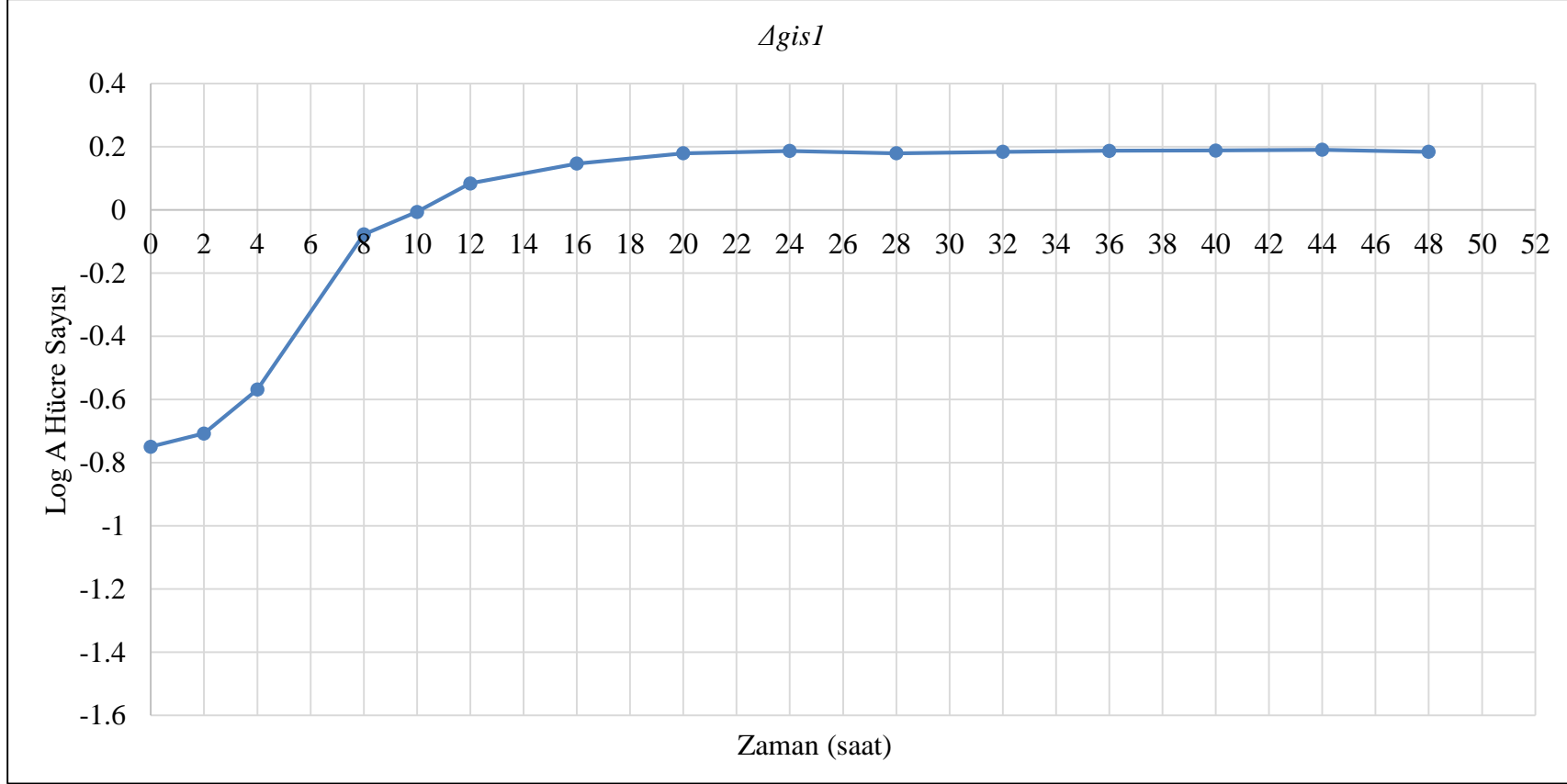
S. cerevisiae maya türü glikoz, galaktoz, maltoz, gliserol, etanol ve asetat birçok farklı moleküllü karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. Glikoz maya hücreleri tarafından öncelikli tercih edilen ve hızlı kullanılan bir karbon kaynağıdır. Maya hücreleri üreme ortamında bulunan glikozu fermente ederek hızlı bir şekilde ATP ve etanol üretmektedir. Hücreler bu şekilde eksponensiyel olarak çoğalırken alternatif karbon kaynaklarının kullanımı ve solunum için gerekli genler bakılanmış durumda bulunmaktadır. Glikozun üreme ortamında tükenmesi ile maya hücrelerinin fermentatif olarak üretilen etanolü karbon kaynağı olarak kullanabilmesi için glikoz tarafından baskılanan genler derepres olurlar. Etanol non-fermentatif karbon kaynağı olup, kullanımı ve ATP üretimi glikoza göre çok daha yavaştır. Hücrelerin alkolü kullanmaya başlamasıyla post-dioksik aşamada başlamış olur ve etanolün tükenmesine kadar devam eder. Üreme ortamında kullanılacak karbon kaynağı kalmadığında ise maya hücreleri durağan aşamaya geçerek bölünmeden beklemektedir. Hücrelerin dioksik kayama ve post-dioksik aşamasında Gis1 transkripsiyon faktörünün önemli görevleri bulunmaktadır. Stres metaboliti olan trehalozun da logaritmik aşamanın sonlarına doğru sentezlendiği bilinmektedir.



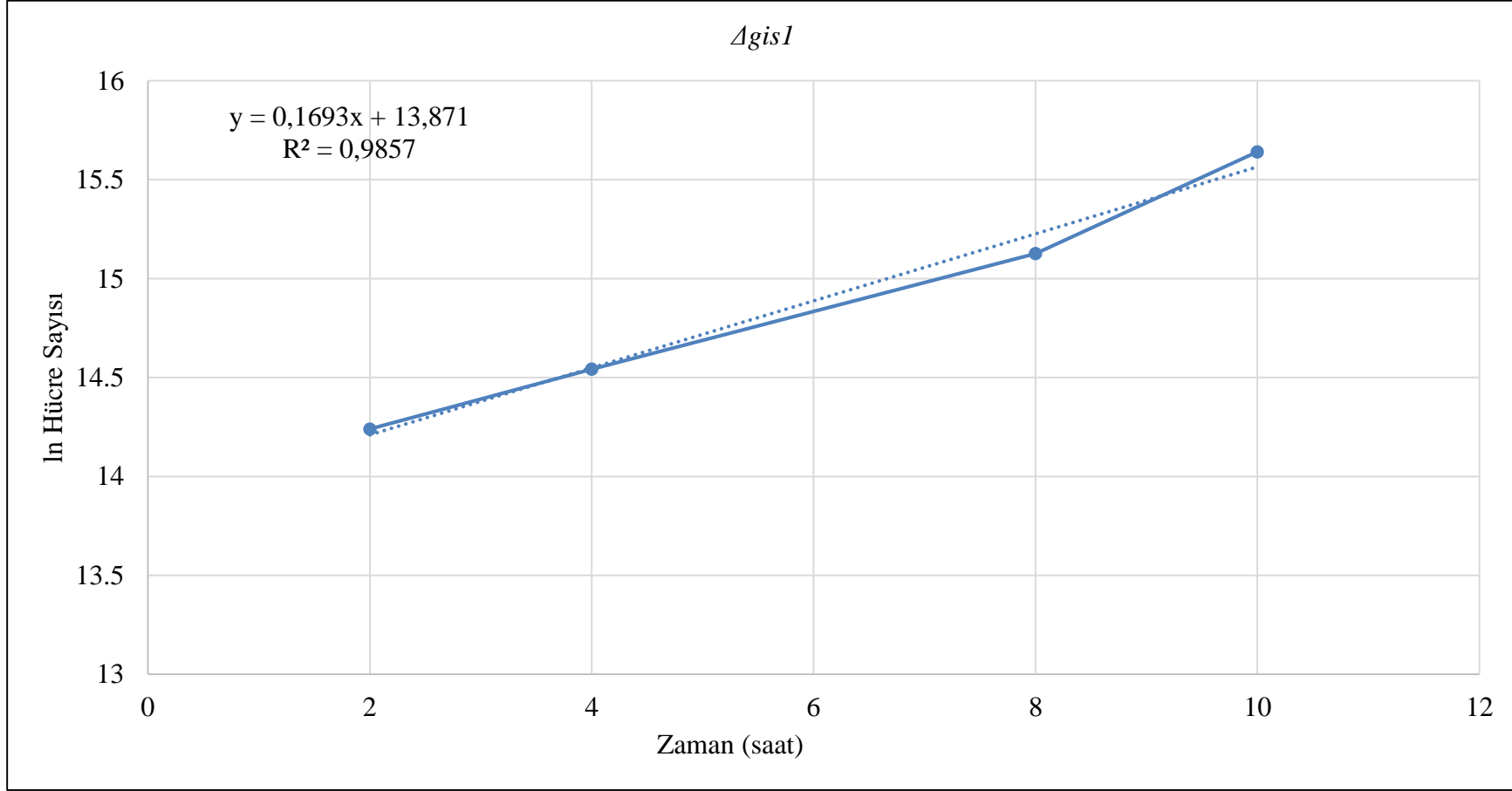
Şekil 4.1. Yaban tip maya suşunun LogA hücre sayısını gösteren üreme eğrisi.



Şekil 4.2. Yaban tip maya suşunun ln hücre sayısı olarak üreme eğrisi.



Şekil 4.3. *Agis1* maya suşunun LogA hücre sayısı olarak üreme eğrisi.



Şekil 4.4. *Δgis1* maya suşunun ln hücre sayısı olarak üreme eğrisi.

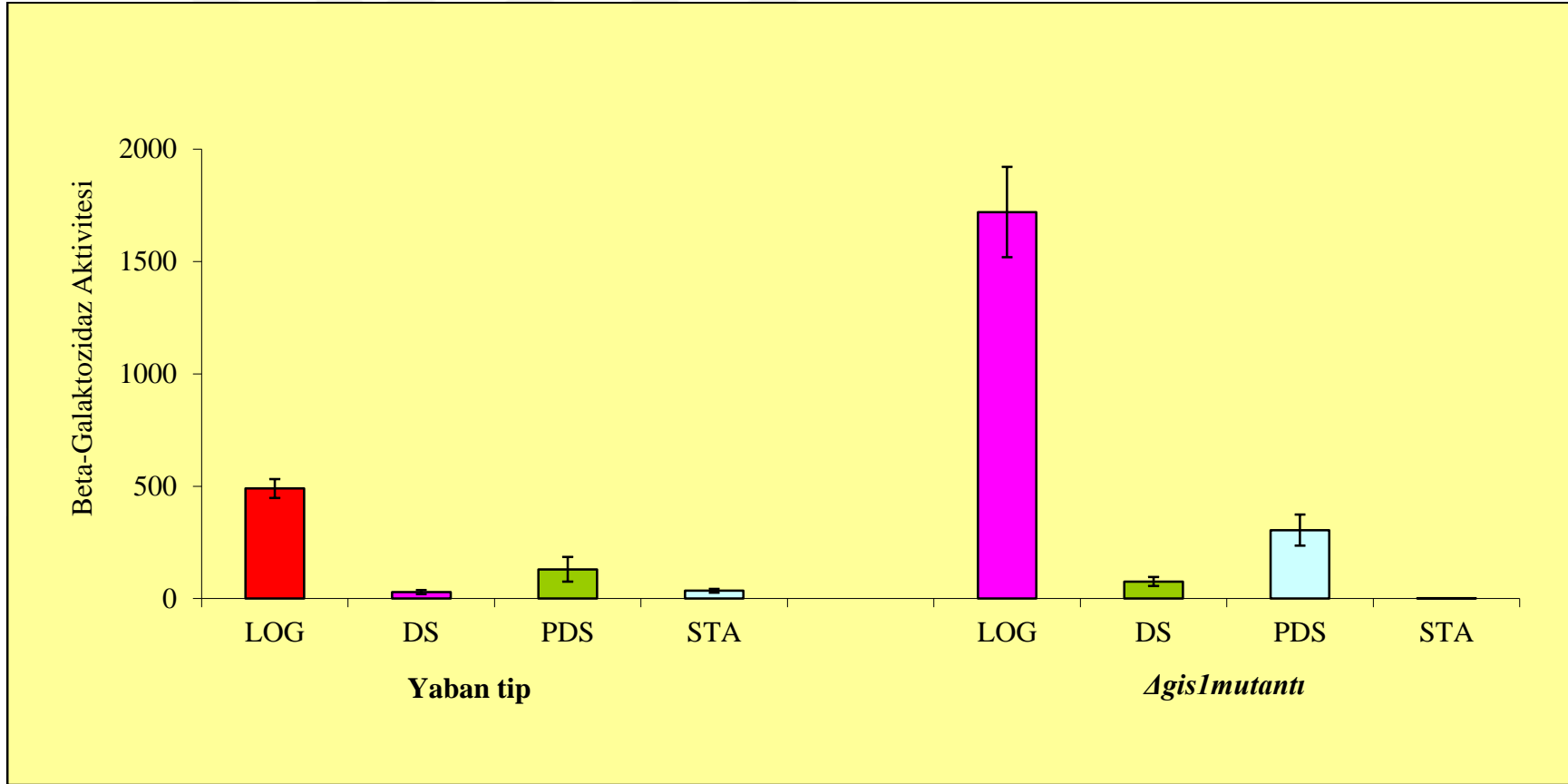
Araştırmamızda Gis1p transkripsiyon faktörünün *NTH1* gen ekspresyonuna etkisi *NTH1-LacZ* gen füzyonu içeren plazmit kullanılarak enzimatik olarak belirlendi. Bu amaçla *NTH1* promotor bölgesinin transkripsiyon düzenleyen kontrol bölgelerini kapsayan yaklaşık olarak 770bp uzunluğundaki bölgesi kullanıldı. Bu bölge Gis1p bağlanma bölgesi olan PDS elementlerini de içermektedir. *NTH1*promotor bölgesini taşıyan plazmit yaban tip ve Δ *gis1* mutant maya hücrelerine transform edildi. Transformant maya suşlarına ait daha önce hazırlanan üreme eğrileri kullanılarak logaritmik aşamada (8 saat sonra), dioksik kayma aşamasında (24 saat sonra), post-dioksik kayma aşamasında (48 saat sonra) ve durağan aşamada (100 saat sonra) hücre kültürlerinden örnekler alınarak bu aşamalardaki *NTH1* transkripsiyon seviyesi belirlendi. Elde edilen sonuçlar şekil 4.5.'te verildi.

S. cerevisiae hücrelerinin yaban tip maya suşunda (BY4741) beta-galaktosidaz aktivitesi logaritmik aşamada 490 ± 42 , dioksik aşamada 29 ± 9 , post-dioksik kayma aşamasında 130 ± 55 , durağan aşamada ise 35 ± 8 seviyelerinde olduğu hesaplandı. Δ *gis1* mutant maya hücrelerinde beta-galaktosidaz aktivitesi logaritmik aşamada 1720 ± 201 , dioksik aşamada 76 ± 20 , post-dioksik kayma aşamasında 305 ± 69 durağan aşamada ise $1,5 \pm 0,5$ seviyelerinde olduğu hesaplandı.

Gis1 proteini logaritmik aşamada repressör olarak PDS ve durağan aşamada aktivatör olarak görev yapmaktadır. Çalışmamızda Δ *gis1* mutant maya suşunda, yaban tip maya suşuna göre *NTH1* transkripsiyonunun logaritmik aşamada yaklaşık 4 kat fazla olduğu görüldü. Benzer şekilde dioksik kayma ve post-dioksik kayma aşamasında da Gis1p yokluğunda *NTH1* gen ekspresyonunda 2-3 kat arttığı belirlendi. Bu durum Gis1 proteininin *NTH1* transkripsiyonun baskılanması için gerekli olduğunu ve Gis1 proteininin *NTH1* geninin negatif regülatörü olarak görev yaptığını göstermektedir.

Daha önce yapılan bir çalışmada Gis1 proteininin baskılayıcı fonksiyonunda Rim15 kinazın etkisi olmadığı, Rim15 kinazdan bağımsız olarak represör aktivitesi olduğu gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2009). Rim15 kinaz Gis1 proteininin aktivasyonundan sorumlu olup glikoz miktarına göre TOR ve PKA yolları üzerinden aktivitesi regüle edilmektedir.

Yapılan bir diğer çalışmada *MSN4* geninin promotorunda iki adet PDS elementinin bulunduğu (AAGGGA; 2700-2695 ve 2276-2271) ve Δ *gis1* mutantlarında *MSN4* transkripsiyonunun arttığı belirlenmiştir. Bu durum hücrelerin aktif olarak ürediği şartlarda, Gis1 proteini direk olarak PDS elementleri aracılığıyla yada indirek olarak Msn4p üzerinden STRE elementleri aracılığıyla stres-cevap genlerinin ekspresyonunu baskılamaktadır (Zhang ve ark., 2009).



Şekil 4.5. Yaban tip ve Δ gis1 mutant maya hücrelerinde *NTH1* gen ekspresyon seviyesi.

LOG: Lagaritmik aşama; DS: Dioksik kayma; PDS: Post-dioksik kayma; STA: Durağan (Stationary) aşama.

β -galaktozidaz aktivitesi nmol ONPG/dk/ mg protein olarak verildi.

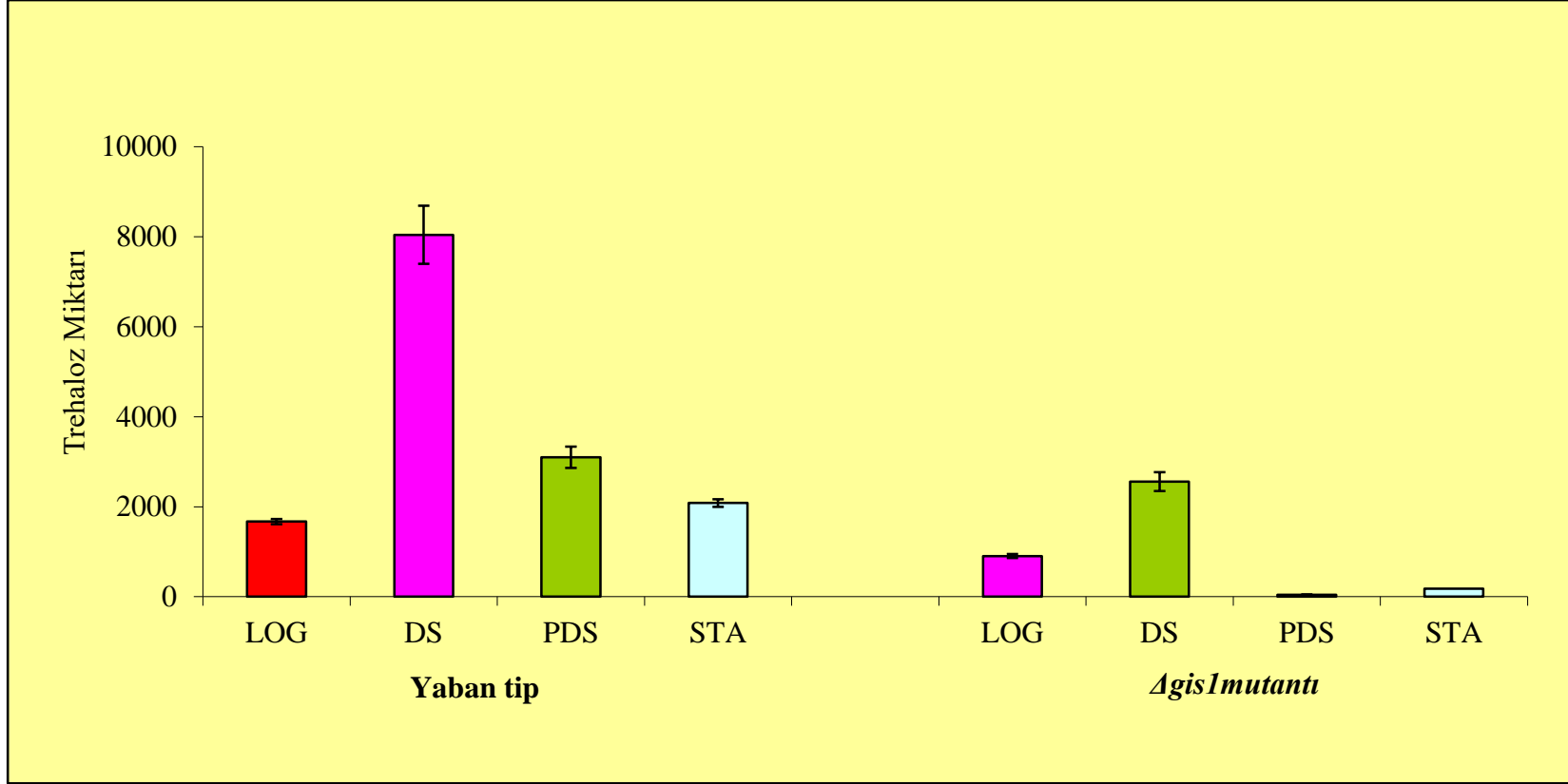
Yaptığımız *NTH1* promotor analizinde PDS elementleri ile STRE elementlerinin üstüste geldiği belirlendi. Dioksik kayma ve post-dioksik kayma aşamasında Gis1p yokluğunda *NTH1* gen ekspresyonunun 2-3 kat artış olduğu tespit edildi. Bu durum Gis1 proteininin logaritmik aşamada, dioksik aşamada ve post-dioksik aşamada, *NTH1* transkripsiyonunu Msn4p üzerinden indirek olarak baskıladığını düşündürmektedir. Gis1p yokluğunda transkripsiyonu artan Msn4 proteininin *NTH1* promotorunda bulunan STRE dizilerine bağlanarak transkripsiyonu artırdığı düşünülmektedir. Durağan aşamada ise *NTH1* transkripsiyonunun Gis1p yokluğunda çok yüksek oranda azaldığı görüldü. Bu durum Gis1 proteininin durağan aşamada *NTH1* transkripsiyonunun aktivasyonu için gerekli olduğunu göstermektedir. Gis1 proteininin logaritmik aşamada represör olarak, post-dioksik ve durağana aşamada aktivatör olarak görev yapmaktadır (Westholm ve ark., 2012). Çalışmamızda da Gis1 proteini logaritmik aşamada ve post-dioksik aşamada represör olarak, durağan aşamada ise aktivatör olarak görev yaptığı belirlendi.

4.3. Gis1p Transkripsiyon Faktörünün Trehaloz Birikimine Etkileri

S. cerevisiae hücrelerinin önemli depo kaynaklarından birisi trehalozdur. Hücrelerin üreme aşamalarına, fizyolojisine ve üreme ortamlarına göre hücredeki seviyeleri farklılık göstermektedir (Lillie ve Pringle, 1980). Bu çalışmada Gis1 proteininin hücre içerisinde bulunan trehaloz miktarına olan etkisine bakıldı. Farklı üreme aşamalarında yaban tip ve *Δgis1* mutant maya suşlarının hücre içerisindeki trehaloz seviyesi enzimatik olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.6.'da verildi.

Yaban tip *S. cerevisiae* maya hücrelerinde trehaloz birikiminin logaritmik aşamada 1671 ± 59 , dioksik aşamada 8045 ± 645 , post-dioksik kayma aşamasında 3098 ± 238 ve durağan aşamada 2083 ± 86 seviyelerinde olduğu hesaplandı. *Δgis1* mutant maya suşlarında ise trehaloz miktarı logaritmik aşamada 903 ± 44 , dioksik aşamada 2561 ± 210 , post-dioksik kayma aşamasında 43 ± 8 ve durağan aşamada 178 ± 16 seviyelerinde bulundu.

Genel olarak Gis1 proteininin yokluğunda hücre içi biriktirilen trehalozun tüm üreme aşamalarında daha az olduğu görülmektedir. Logaritmik aşamada ve dioksik kayma aşamasında trehaloz birikiminin *Δgis1* maya hücrelerinde 2-3 kat azaldığı, durağan aşamada ise yaklaşık olarak 12 kat azalma olduğu belirlendi. Post-dioksik aşamada ise 72 kat trehaloz miktarının azaldığı görüldü. Bu aşamada *NTH1* transkripsiyon da gözlenen 2 katlık artış bu denli yüksek bir trehaloz birikimine sebep olamayacağı düşünüldüğünde, trehalozun sentezinden sorumlu genlerin, *TPS1* gibi, aktivitesinin artmasından kaynaklı olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 4.6. Yaban tip ve Δ gis1 mutant maya hücrelerinin farklı üreme aşamalarında biriktirdikleri trehaloz miktarı.

LOG: Lagaritmik aşama; DS: Dioksik kayma; PDS: Post-dioksik kayma; STA: Durağan (Stationary) aşama.

Trehaloz miktarı μ g glikoz/mg yaş maya ağırlığı olarak verildi.

Maya hücreleri logaritmik aşamanın sonlarında dioksik kayma aşamasına yaklaşırken ve durağan aşamaya girerken glikojen ve trehaloz gibi bazı depo moleküllerini biriktirmeye başlamaktadır (Thevelein, 1984). Glikojenin akümülyasyonu glikozun tükenmesi ve dioksik kaymanın tepe noktasında gerçekleşirken, trehaloz dioksik kayma sonrasında post-dioksik kayma aşamasında ve durağan aşamanın başlangıcında biriktirmeye başlanmaktadır (Lillie ve Pringle, 1980). Çalışmamızda yaban tip maya hücrelerinde trehaloz miktarı dioksik kayma aşamasında çok yüksek iken, PDS ve durağan aşamada 3-4 kat azaldığı gözlemlendi. Benzer profil *Δgis1* maya hücrelerinde de gözlenmesine rağmen trehaloz miktarı dioksik kayma aşamasında yaban tip maya hücrelerinden 2-3 kat daha az olduğu tespit edildi. Yaban tip maya hücrelerinin dioksik kayma aşamasından (8045±645) post-dioksik kayma aşamasına (3098±238) geçerken trehaloz miktarında yaklaşık 3 kat azalma gözlenirken, *Δgis1* maya hücrelerinde yaklaşık 60 kat azalma olduğu belirlendi. Bu durum maya hücrelerinin *Gis1p* yokluğunda trehaloz sentezleyemediklerini göstermektedir. Araştırmamızda *Δgis1* mutant maya hücreleri, yaban tip maya hücrelerinde de gözlemlendiği gibi, dioksik kayma aşamasından post-dioksik kayma aşamasına geçerken *NTH1* transkripsiyonunda 4-5 kat artış göstermektedir. *NTH1* transkripsiyonundaki 4-5 katlık trehaloz miktarında ki 60 katlık azalmaya neden olması mümkün değildir. Bu durum *Gis1* transkripsiyon faktörünün *Msn4p* üzerinden indirek olarak trehaloz sentezinde görevli genlerin (*TPS1* gibi) promotorlarındaki STRE elementleri aracılığıyla ekspresyonlarını baskıladığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak *Gis1* transkripsiyon faktörü *NTH1* geninin transkripsiyonunu logaritmik aşamada baskımlarken durağan aşamada aktive etmektedir. Ayrıca *Gis1* proteininin bu etkisini trehaloz sentez genleri üzerinde de gösterdiği düşünülmektedir.

4.2. *NTH1* – *Gis1p* 3D Bağlanma Modellemesi

Yeastrack veri tabanından elde edilen *NTH1* promotor bölgesinde (~1000bp) 3 adet Stress Response Element (STRE) bağlanma bölgesi (5'-CCCCT-/-AGGGG-3') olduğu belirlendi (Şekil 4.7.). *Gis1* proteininin DNA bağlanma bölgesi, C₂H₂ çinko parmak yapısında olup, BetaBetaAlpha- çinko parmak ailesine aittir. JASPAR veri bankasının MA0306.1 numaralı *Gis1* transkripsiyon faktörünün DNA bağlanma profili Şekil 4.8.'de verildi.

Chromatin Folding v2 Programı aracılığıyla *NTH1* promotorunun üzerinde olası nükleozomların yerleri belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre ~70-220 bp, ~250-400 bp,

~550-700 bp, ~750-900 bp aralıkların da toplam dört adet nükleozomun bulunma olasılığı belirlendi (Şekil 4.9.).

Elde edilen verilere dayanarak *NTH1* promotörü üzerinde STRE bölgeleri işaretlenerek görselleştirildi. Gis1 proteininin bağlandığı STRE/PDS elementlerinin *NTH1* promotorunda nükleozomlara denk geldiği belirlendi (Şekil 4.10.).

RCSB PDB: RCSB Protein Data Bankasında yapılan araştırmada DNA fragmenti + nükleozom araştırılması yapıldı. Araştırılan komplekslerde DNA üzerinde 5'-CCCCT-/-AGGGG-3' dizisinin bulunması amaçlandı (PDB kodları: 4JJN, 4QLC, 4X23). Elde edilen veriler sonucunda 5'-CCCCT-/-AGGGG-3' bölgelerinin hangi nükleozomlara yakın veya arasında olduğu ve nükleozoma denk gelen dizilerin hangi histon proteinine denk geldiği belirlenmeye çalışıldı. VMD (Visual Molecular Dynamics) programı aracılığıyla görselleştirilen çalışma sonrası 5'-CCCCT-/-AGGGG-3' bölgelerinin H3 histonu ve H2A histonunun arasına denk geldiği belirlendi.

Gis1 transkripsiyon faktörünün paraloğu olan Rph1 (Regulator of *PHR1*) transkripsiyon faktörünün spesifik olarak Histon 3 Lys 36 'yı dimetillediği bilinmektedir (Klose RJ, et al., 2006). Chang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Homo sapiens* türünün Hs_JMJD2A proteini ve *S. cerevisiae* maya türünün Rph1 proteini ile yaptıkları karşılaştırma sonucu Histon peptid bağlanma bölgesi tahmin edilmeye çalışılmıştır (Chang ve ark., 2011). Bu çalışmadan yola çıkarak, Gis1 transkripsiyon faktörünün aminoasit dizisi Hs_JMJD2A ve Rph1 proteinlerinin aminoasit dizilerinin karşılaştırma sonuçlarına eklenerek çalışma yapıldı. Yapılan çalışma sonucu Gis1 transkripsiyon faktörünün Histon peptid bağlanma bölgesi tahmin edilmeye çalışıldı. Elde edilen sonuca göre Gis1 proteininin aminoasit dizisinde KKEER bölgesinin histon peptid bağlanma bölgesi olduğu tahmin edilmektedir (Şekil 4.11.).

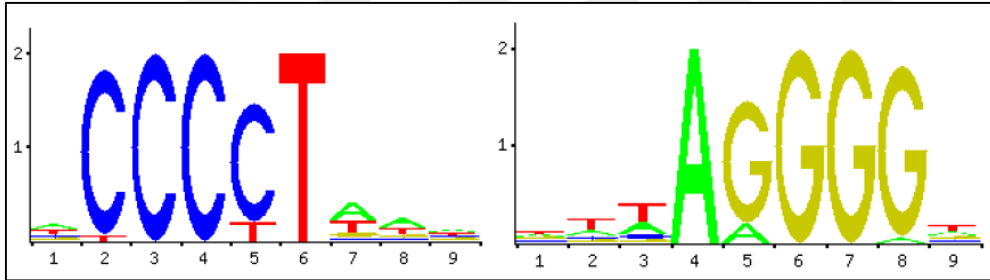
Yapılan çalışmalar sonucu I-TASSER ve Robetta programları kullanılarak 3D protein modellemesi yapıldı. Ancak Swiss-model programı RCSB Protein veri Bankasında bulunan pdb dosyalarıyla ve homology modelleriyle bir sonuç çıkartmaya çalışmasından dolayı proteinin tamamı modellenemedi. Bu yüzden programlar arasında modelleme kalitesini ortaya çıkartmak amacıyla Gis1 proteinini üç farklı bölgeye (domaine) ayırarak, Gis1 transkripsiyon faktörünün katalitik bölgesi olan jmjN ve jmjC domainlerini içeren (1-324 a.a) fragment kullanılarak sırasıyla aynı programlara yüklendi.

```

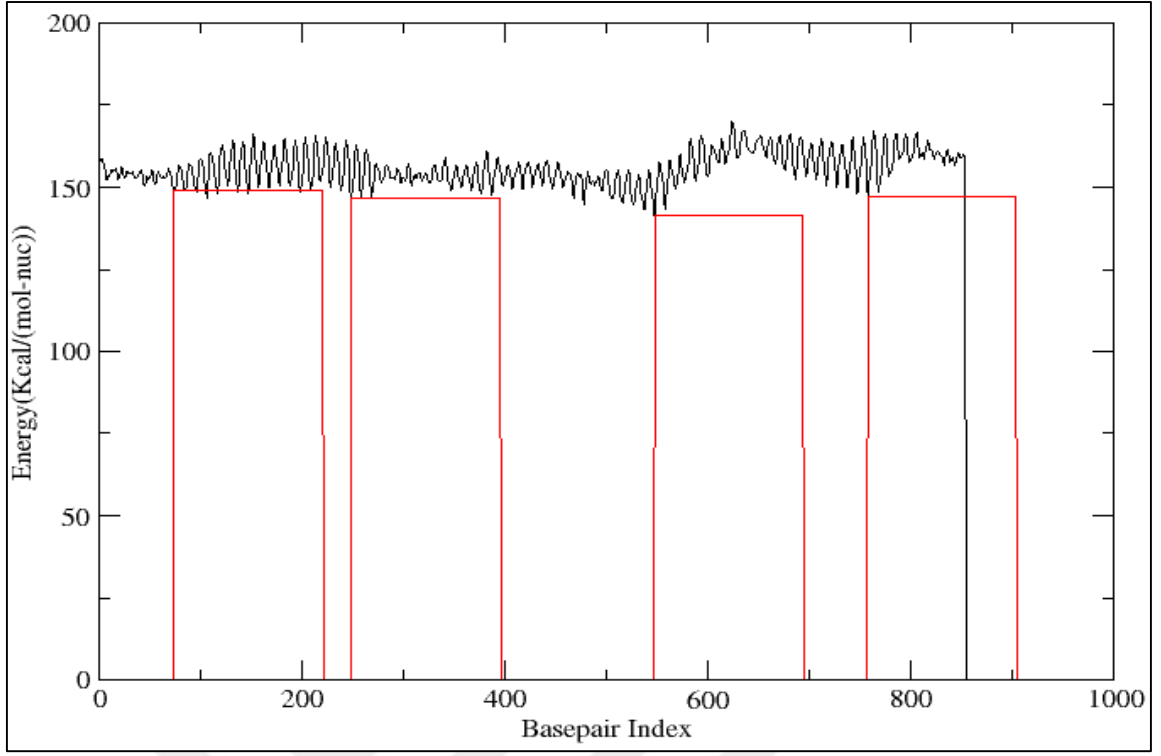
TATTCTGGAGCAATGATGTGGTTAGCACAAATCTTTAAGGTCTTGTCTCTT 51
CTCATCAATATTCTAACCTTGTTAGTCTTTTTGTTCTTCAAGAACTTACAG 102
TCACCAGTACCTCTTTCTTTCCATTCTTGGCATCGGCATCGAATCTGAAA 153
AGCTTGGCTCTGACCTTGTAAGAAGTCTTTCGTCTTCTTCCATTGTCTTA 204
ACATCTACCTTTTCCAGGTGAACCACTGGTTCAAATGGATATCTGGTGAT 255
TCTGGAGCATCATCACCTTCCTTCTTGGTTTCCTCCTTGGTATCTTCTTCG 306
TCTTTCTTGGTTTCTGGCTTTTCGGCCTTCTTACCACCAACATGGAGAAG 357
ACAGCAGAGGATGGTGGCTTTGGAGCAGCCTTTCCTTCTTGTGCGACGACA 408
GGTTTCTTATCTTCGCTAGACATTCTTTTTCTATAGTTGTGTTTATCTTCT 459
TGCTTTTATTTCAAATTAACAAGATCTTTCTTCTTTCTCCAATTGAATAT 510
CAATTTTCATCATCAGATTTTAGTTTTCTGTTTTATTTTTTATTTTTTATTT 561
TTTTTTTGTTCCTTGTTCCTTCCGCGTACTTCCCGCTGGGCGAAAAAAGAAAT 612
GAAAAAAGAAACGACAGGAGCATCGTGTAGGACGAAGCCCCTTATCCCCT 663
AGTTACCGAAGAAGGCCACCAATCTTAAGTTTGATAGAGCAGTACTTATAT 714
AAGGCTATATATAGACTGGTTCACAAGTTATCAATATGAACTTGCGCGA 765
TCACCGATTTACGGGATTTTTTCAGGAGCGAGGTACAAGATTTGTTGGCCTG 816
AAAAGATCGCAAACATTAGCTAGAAATTTTCCCCCTATCGTTTTCCGTAG 867
AGTAAATATAATATCAAGAAGATAGTTTTATATTGACTGATTTCAACAACA 918
ACTGCATAGATATAAGGAGATTACTAGATACAAGAACGCCTGATAAACAAA 969
AAAAGAAAAATTAACAAAAAAATCAGTAGAATG 1003

```

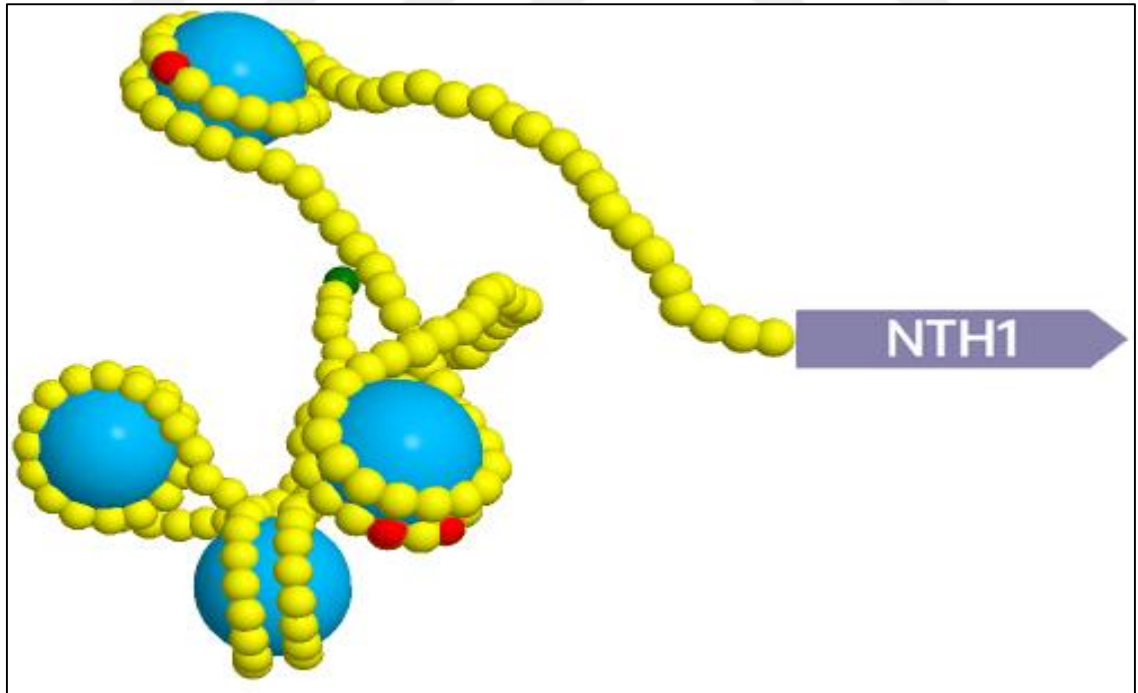
Şekil 4.7. *NTH1* promotorunda bulunan Stress Response Element (STRE) dizileri.



Şekil 4.8. Gisl proteininin JASPAR TF bağlanma bölge profili (ID: MA0306.1).



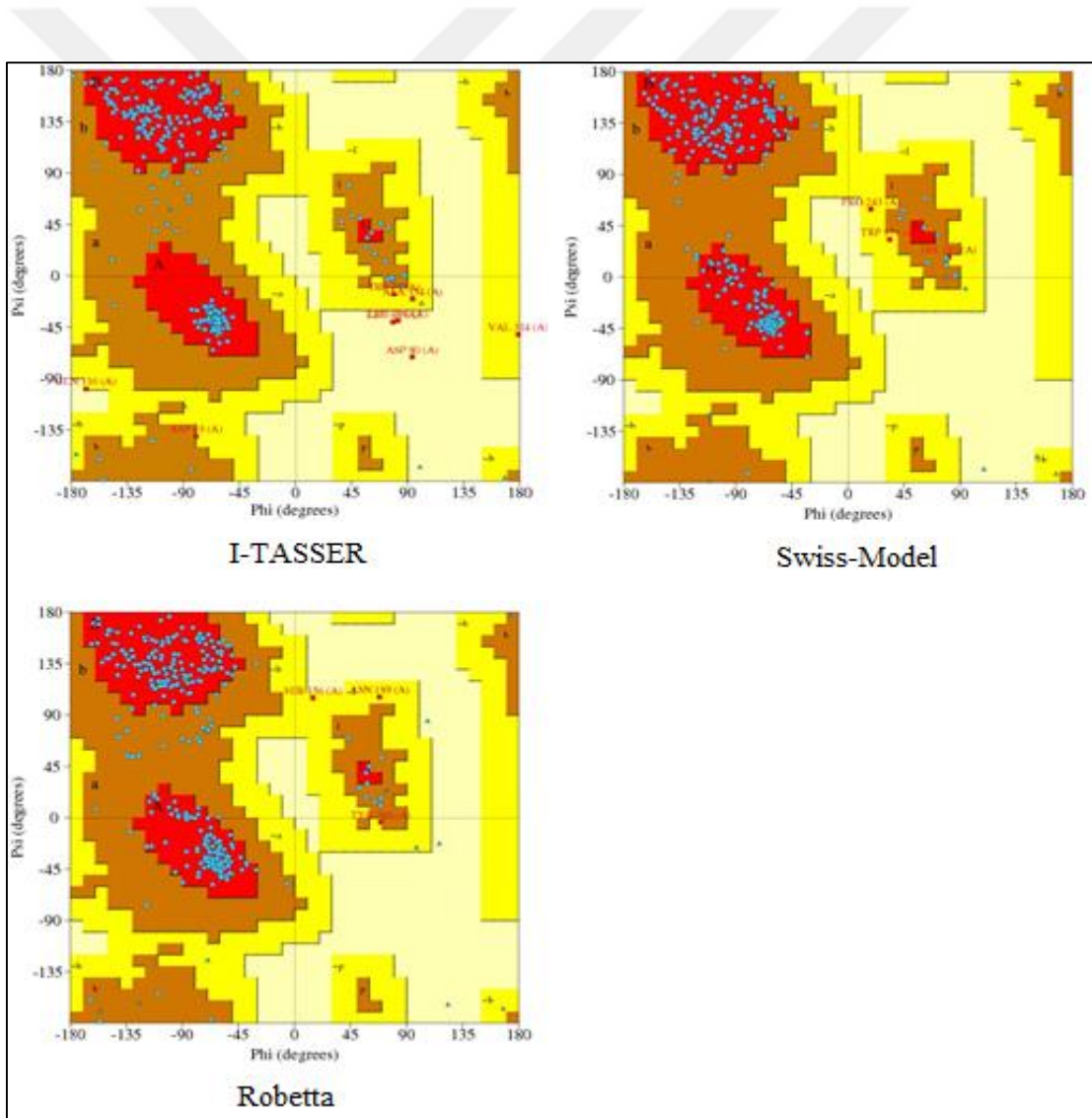
Şekil 4.9. Chromatin Folding v2 Programı kullanılarak elde edilen *NTH1* promotorunun nükleozom enerji seviyesi diyagramı.



Şekil 4.10. Chromatin Folding v2 Programı kullanılarak elde edilen *NTH1* promotoru (sarı) üzerindeki STRE bölgelerinin yerleri (kırmızı) ve olası Nükleozomların (mavi) bağlanma yerleri.

bütün protein oluşturulması istenildiğinde ikinci fragmentin modellenememesinden kaynaklı olarak Swiss-model tabanlı bir Gis1 proteini modeli oluşturulamadı.

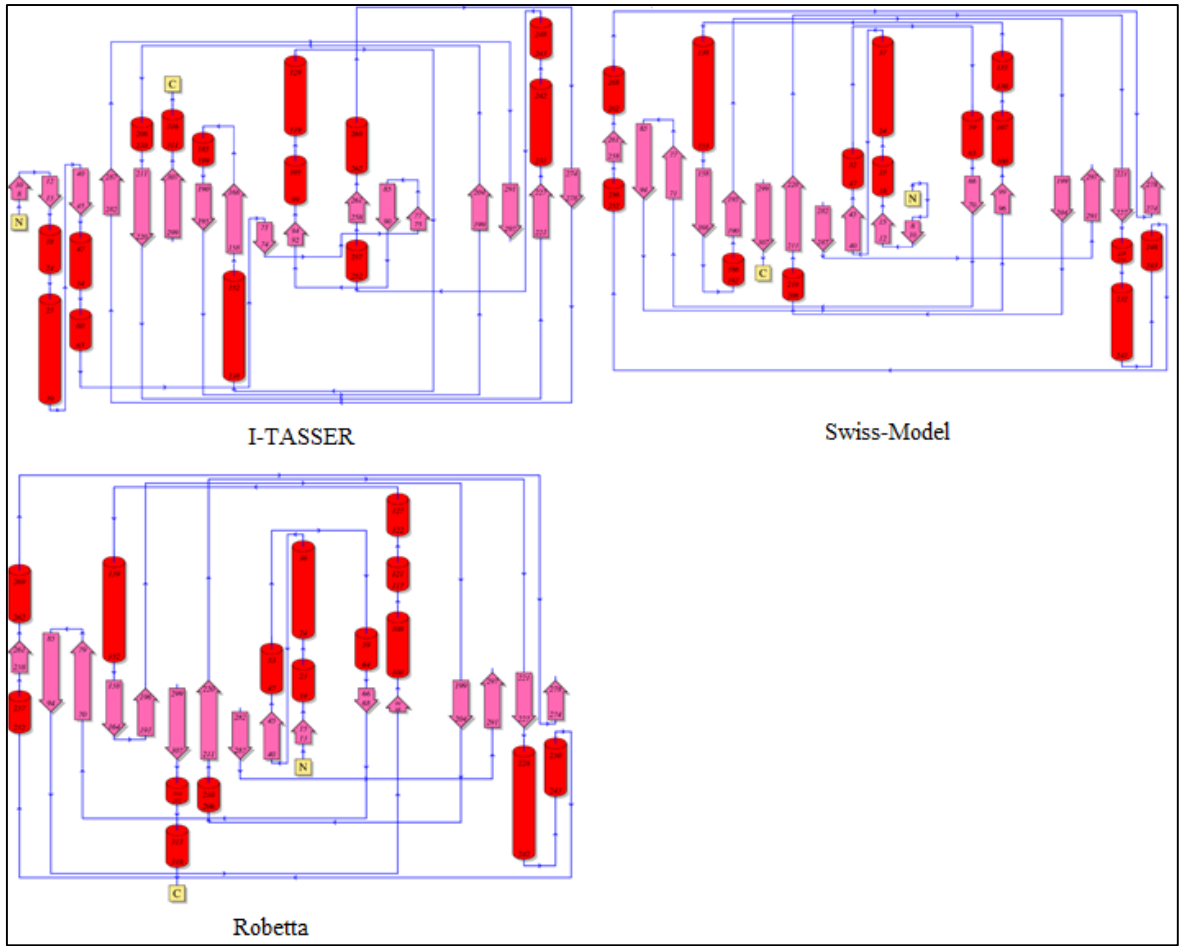
I-TASSER programının sonuçları: I-TASSER 3D model çıkartma tahminini tamamen yapabilmesinden dolayı çalışma boyunca I-TASSER'ın oluşturmuş olduğu modeller kullanıldı. 24 Şubat 2016 tarihinde Gis1 proteinin ilk modeli oluşturuldu. 22 Eylül 2016 tarihinde ise aynı verilerle ikinci bir Gis1 proteinin modeli oluşturuldu. Aradan geçen 7 aylık sürede programda yapılan güncellemeleri ve protein katlanmasında ki değişimi görebilmek için her iki 3D model (Eski/Yeni) karşılaştırıldı (Çizelge 4.9.). Son yapılan modelleme ile önceki modelleme arasında çok büyük fark gözlenmedi. Bu iki yapının arasındaki karşılaştırma VMD multiseq programının sonucunda hesaplanmış olan QH ve RMSD değerleri kontrol olarak kabul edilerek karşılaştırıldı.



Şekil 4.12. PDBsum server kullanılarak oluşturulan I-TASSER, Swiss-model ve Robetta Ramachandran haritaları.

Karşılaştırma sonucu QH değerinin 1'e yakın değer olması, RMSD değerinin ise 0'a yani minimum seviyede olması, karşılaştırması yapılan modeller arasındaki benzerlik kalitesinin belirleyicisidir.

Yeasttrack ve SGD veritabanlarına göre Gis1 transkripsiyon faktörününün *NTH1* geninin regülasyonu ile ilgili bir veri bulunmamaktadır. Gis1 proteinin bağlanma bölgesinin (5'-CCCCT-/AGGGG-3') *NTH1* geninin promotor bölgesinde bulunmasından dolayı Gis1 proteininin *NTH1* promotor bölgesindeki STRE/PDS bölgelerine bağlanıp bağlanmadığı araştırıldı.



Şekil 4.13. PDBsum server kullanılarak oluşturulan I-TASSER, Swiss-model ve Robetta Topology haritaları.

I-TASSER'dan elde edilen Gis1 proteinin 3D modeli toplamda 13704 atomdan meydana gelmektedir. VMD uygulaması aracılığıyla 13704 atomlu Gis1 proteininin 3D yapısından hidrojen atomları uzaklaştırıldı ve atom sayısı 6990'a indirildi. İlk çalışma için "Gis1-No-Hidro.pdb" şeklinde kayıt edildi. *In silico* ortamlardaki hesaplamaların

gecikmesini önlemek amacıyla atom sayısı düşürüldü ve docking olarak adlandırılan programlarda kullanılması amacıyla Gis1 proteininin 3 boyutlu yapısı hidrojensiz olarak hazırlandı.

Tom Bishop'ın Teorikal Moleküler Biyoloji Laboratuvarının oluşturdukları DNA Maker adlı program vasıtasıyla, üzerinde 5'-CCCCT/-AGGGG-3' bölgesinin bulunduğu *NTH1* promotorundan 60kb fragment kesildi ve 3 boyutlu hale getirilen bu DNA parçasığı "STRE-PDS60kb_NTH1.pdb" şeklinde kaydı yapıldı.

Çizelge 4.8. Üç boyutlu model tahmin programı verilerinin karşılaştırılması.

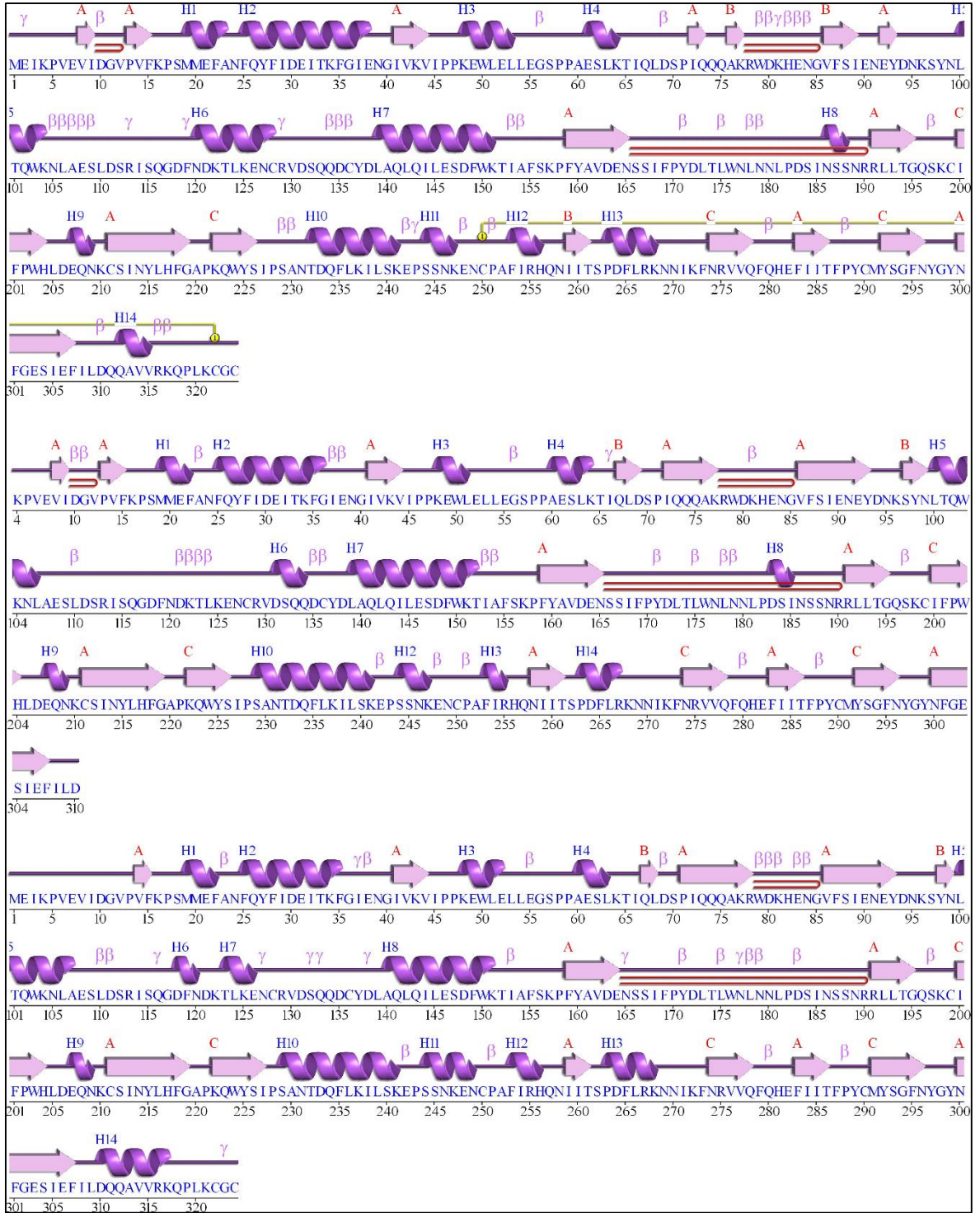
	<i>QH</i>	<i>RMSD</i>	<i>Identity</i>
Robetta – Swiss	0,6345	2,1844	%73,24
Robetta – I-TASSER	0,6857	2,3364	%79,19
Swiss – I-TASSER	0,7891	1,0612	%81,34

Çizelge 4.9. I-TASSER - Eylül-Şubat 2016 Gis1p model yapılarının verilerinin karşılaştırılması.

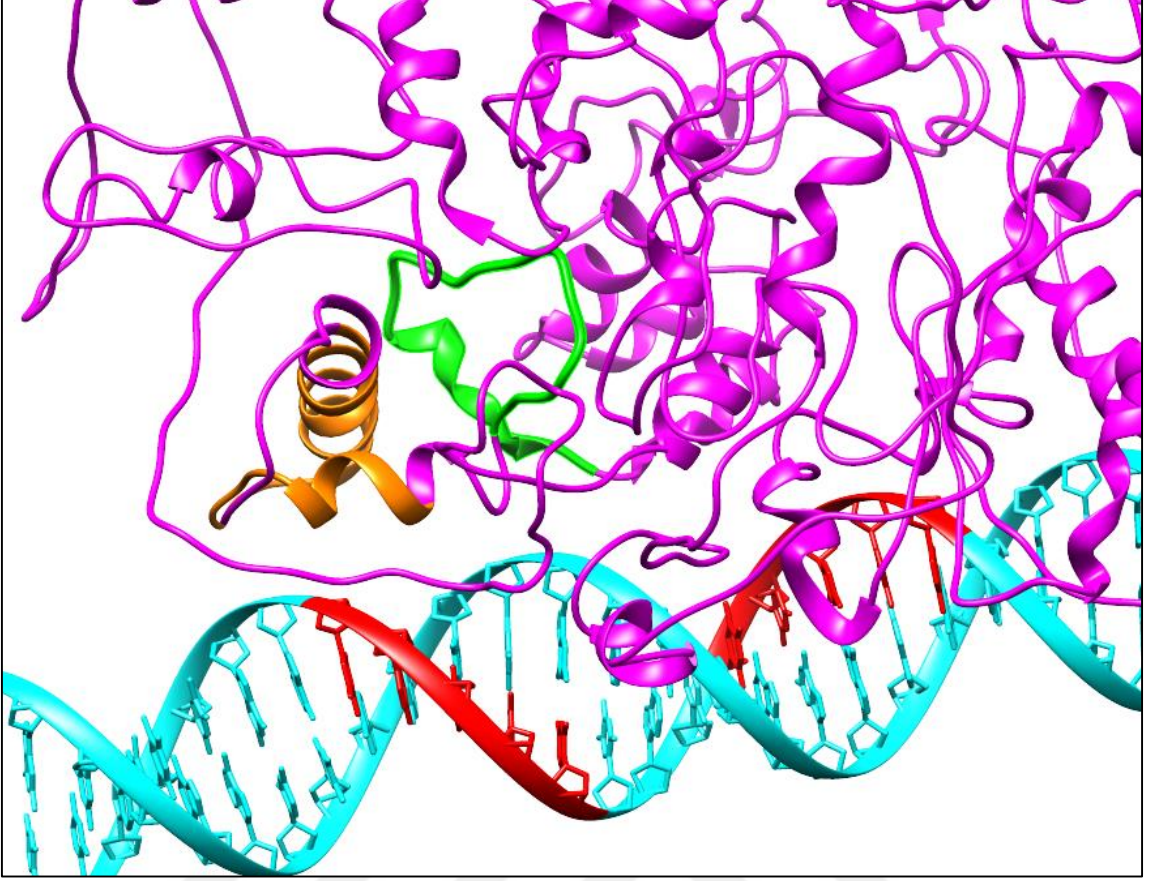
	<i>QH</i>	<i>RMSD</i>	<i>Identity</i>
Eski – Yeni	0,9861	0,3452	%100

International Institute of Molecular and Cell Biology - Laboratory of Bioinformatics and Protein Engineering grubunun geliştirmiş olduğu program aracılığıyla Nükleik asit-Protein Dock (NPDock) çalışması yapıldı. Yapılan bu çalışma sonucunda *in silico* olarak Gis1 proteininin, *NTH1* promotorunun 60bp'lık bir parçası olan ve üzerinde 2 tane STRE/PDS bölgesinin bulunduğu DNA fragmentinin 5'-CCCCT/-AGGGG-3' bölgesine docking yapabildiği gözlemlendi. Böylelikle Gis1 proteinin *NTH1* promotoruna bağlanma olasılığının yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 4.15.).

Yapılan *in silico* çalışmalar sonucunda, Gis1 proteinin *NTH1* geninin promotor bölgesinde bulunan ve birbirine yakın olan iki C₂H₂ bağlanma bölgesine docking yapabilmesi çalışmanın daha fazla detaylandırılarak ihtimalleri daha da kuvvetlendirecek olan çalışmaların devam etmesi gerektiğine karar verildi. nAMD programı aracılığıyla proteinin yapısı minimize edilerek daha iyi bir yapının elde edilip edilemeyeceğine dair çalışmalarımız devam etmektedir.



Şekil 4.14. PDBsum server kullanılarak oluşturulan I-TASSER, Swiss-model ve Robetta Secondary Structure sonuçları.



Şekil 4.15. Gis1 proteini ile *NTH1* promotor DNA fragmentinin *in silico* bağlanma modeli. Turkuaz: DNA fragmenti, Magenta: Gis1 proteini, Yeşil: Birinci C₂H₂ DNA bağlanma bölgesi, Turuncu: İkinci C₂H₂ DNA bağlanma bölgesi.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Stres şartlarında, *S. cerevisiae* maya hücresinde depolanan trehaloz metaboliti *NTH1* geni tarafından kodlanan nötral trehalaz enzimiyle yıkılır. Ortam koşulları uygun olduğunda çevresel stresler olmadığında trehaloz logaritmik aşamada düşük bir seviyede bulunmaktadır. Trehaloz sentezinin ara metaboliti olan trehaloz-6-fosfatın glikozun transportu ve metabolize edilmesinde düzenleyici rolü bulunmaktadır. Bu nedenle trehaloz biyosentezinde normal koşullarda belirli bir seviyede tutulması gerekmektedir. Hücre üremenin farklı aşamalarında hücre içi trehaloz miktarı değişmekte olup stres koşullarında ve besin açlığında artmaktadır.

Gis1 proteini PDS ve durağan aşamada aktivatör olarak logaritmik aşamada ise represör olarak görev yapmaktadır. Çalışmamızda Gis1p yokluğunda, *NTH1* transkripsiyonunun logaritmik aşamada yaklaşık 4 kat arttığı görüldü. Post-dioksik kayma aşamasında da Gis1p yokluğunda *NTH1* gen ekspresyonunda 2-3 kat arttığı belirlendi. Bu durum Gis1 proteininin *NTH1* transkripsiyonun baskılanması için gerekli olduğunu ve Gis1 proteininin *NTH1* geninin negatif regülatörü olduğunu göstermektedir.

Gis1 proteininin Rim15 kinazdan bağımsız olarak represör aktivitesi yerine getirmektedir (Zhang ve ark., 2009). Ayrıca Gis1p yokluğunda *MSN4* transkripsiyonu artmaktadır. Normal üreme koşullarında Gis1 proteini direk olarak PDS elementleri aracılığıyla yada indirek olarak Msn4p üzerinden STRE elementleri aracılığıyla stres-cevap genlerinin ekspresyonunu baskılamaktadır (Zhang ve ark., 2009).

Yaptığımız *NTH1* promotor analizinde PDS elementleri ile STRE elementlerinin üstüste geldiği belirlendi. Dioksik kayma ve post-dioksik kayma aşamasında Gis1p yokluğunda *NTH1* gen ekspresyonunda 2-3 kat artış olduğu tespit edildi. Bu durum Gis1 proteininin logaritmik aşamada, dioksik aşamada ve post-dioksik aşamada, *NTH1* transkripsiyonunu Msn4p üzerinden indirek olarak baskıladığını düşündürmektedir. Gis1p yokluğunda transkripsiyonu artan Msn4 proteininin *NTH1* promotorunda bulunan STRE dizilerine bağlanarak transkripsiyonu artırdığı düşünülmektedir. Durağan aşamada ise *NTH1* transkripsiyonunun Gis1p yokluğunda çok yüksek oranda azaldığı görüldü. Bu durum Gis1 proteininin durağan aşamada *NTH1* transkripsiyonunun aktivasyonu için gerekli olduğunu göstermektedir. Gis1 proteininin logaritmik aşamada represör olarak, post-dioksik ve durağana aşamada aktivatör olarak görev yapmaktadır (Westholm ve ark., 2012).

Çalışmamızda da Gis1 proteini logaritmik aşamada ve post-dioksik aşamada represör olarak, durağan aşamada ise aktivatör olarak görev yaptığı belirlendi.

Sonuç olarak yaptığımız çalışma sonucunda Gis1 transkripsiyon faktörünün *NTH1* gen ekspresyonunun regülasyonunda görev aldığı, eksponensiyel aşamada *NTH1* represörü olarak görevli olduğu belirlendi. Ayrıca özellikle Post-dioksik kayma aşamasında yüksek trehaloz miktarının bulunması, Gis1 proteininin *NTH1* geninin aktivatörü *TPS1* geninin ise represörü olarak görev yaptığını düşündürmektedir. Ancak bu konu ile ilgili *TPS1* genine ait literatürde bilgi bulunmadığından, tüm bu çalışmaların *TPS1* geni ile tekrarlanması uygun olacaktır.

Yapılan *in silico* çalışmalar sonucunda, Gis1 proteinin *NTH1* geninin promotor bölgesinde bulunan ve birbirine yakın olan iki C₂H₂ bağlanma bölgesine docking yapabilmesi çalışmanın daha fazla detaylandırılarak ihtimalleri daha da kuvvetlendirecek olan çalışmaların devam etmesi gerektiğine karar verildi. nAMD programı aracılığıyla proteinin yapısı minimize edilerek daha iyi bir yapının elde edilip edilemeyeceğine dair çalışmalarımız devam etmektedir.

KAYNAKLAR

- Agger K., Cloos P.A.C., Christensen J., Pasini D., Rose S., Rappsilber J., Issaeva I., Canaani E., Salcini A.E., Helin K., 2007. UTX and JMJD3 are Histone H3K27 Demethylases Involved in HOX Gene Regulation and Development. *Nature*. 449: 731–734.
- Arguelles J.C., 2000. Physiological Roles of Trehalose in Bacteria and Yeasts: A Comparative Analysis. *Archives of Microbiology*. 174: 217- 224.
- Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schwede T., 2006. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. 22: 195–201.
- Attfield P.V., 1987. Trehalose Accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* During Exposure to Agents That Induce Heat Shock Response. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 225: 259-263.
- Ausubel S. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., 1993. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Grene Publishing Associates and Willey-Interscience.
- Avonce N., Mendoza-Vargas A., Morett E., Iturriaga G., 2006. Insights on the Evolution of Trehalose Biosynthesis. *BMC Evolutionary Biology* 6: 109.
- Belinchon M. M., Gancedo J. M., 2007. Glucose Controls Multiple Processes in *Saccharomyces cerevisiae* Through Diverse Combinations of Signalling Pathways. *FEMS Yeast Research*. 7: 808-818.
- Bell W., Sun W.N., Hohmann S., Wera S., Reinders A., De Virgilio C., Wiemken A., Thevelein J.M., 1998. Composition and Functional Analysis of The *Saccharomyces cerevisiae* Trehalose Synthase Complex. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 33311–33319.
- Biasini M., Bienert S., Waterhouse A., Arnold K., Studer G., Schmidt T., Kiefer F., Cassarino T.G., Bertoni M., Bordoli L., Schwede T., 2014. SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*. 42.

- Blazquez M.A., Lagunas R., Gancedo C., Gancedo J.M., 1993. Trehalose-6-phosphate, a New Regulator of Yeast Glycolysis that Inhibits Hexokinases. *FEBS Letters*. 329: 51–54.
- Busti S., Coccetti P., Alberghina L., Vanoni M., 2010. Glucose Signaling-Mediated Coordination of Cell Growth and Cell Cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sensors*. 6195–6240.
- Cabib E., Leloir L.F., 1958. The Biosynthesis of Trehalose Phosphate. *The Journal of Biological Chemistry*. 231: 259–275.
- Cameroni E., Hulo N., Roosen J., Winderickx J., De Virgilio C., 2004. The Novel Yeast PAS Kinase Rim15 Orchestrates G0-associated Antioxidant Defense Mechanisms. *Cell Cycle*. 3: 462–468.
- Chang B., Chen Y., Zhao Y., Bruick R.K., 2007. JMJD6 Is a Histone Arginine Demethylase. *Science*. 318: 444–447.
- 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 Research*. 40.
- Coluccio A., Bogengruber E., Conrad M.N., Dresser M.E., Briza P., Neiman A.M., 2004. Morphogenetic Pathway of Spore Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*. 3: 1464–1475.
- Conrad M., Schothorst J., Kankipati H.N., Zeebroeck G.V., Rubio-Teixeira M., Thevelein J.M., 2014. Nutrient Sensing and Signaling in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*. 38: 254–299.
- De Silva-Udawatta M.N., Cannon J.F., 2001. Roles of Trehalose Phosphate Synthase in Yeast Glycogen Metabolism and Sporulation. *Molecular Microbiology*. 40: 1345–1356.
- DeRisi J.L., Lyer V. R., Brown P. O., 1997. Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale. *Science*. 278: 680–686.

- Düvel K., Santhanam A., Garrett S., Schneper L., Broach J.R., 2003. Multiple roles of Tap42 in Mediating Rapamycin-induced Transcriptional Changes in Yeast. *Molecular Cell*. 11: 1467–1478.
- Eastmond P.J., Graham I.A., 2003. Trehalose Metabolism: A Regulatory Role for Trehalose-6-Phosphate. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 231–235.
- Elbein A.D., Pan Y.T., Pastuszak I., Carol D., 2003. New Insights on Trehalose: A Multifunctional Molecule. *Glycobiology*. 13: 17-27.
- Engel S.R., Dietrich F.S., Fisk D.G., Binkley G., Balakrishnan R., Costanzo M.C., Dwight S.S., Hitz B.C., Karra K., Nash R.S., Weng S., Wong E.D., Lloyd P., Skrzypek M.S., Miyasato S.R., Simison M., Cherry J.M., 2014. The Reference Genome Sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: Then and Now. *G3*. 4: 389–398.
- Estruch F., 2000. Stress-controlled Transcription Factors, Stress-induced Genes and Stress Tolerance in Budding Yeast. *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 469–486.
- Estruch F., Carlson M., 1993. Two Homologous Zinc Finger Genes Identified by Multicopy Suppression in A SNF1 Protein Kinase Mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. 13: 3872–3881.
- Frake R.A., Rubinsztein D.C., 2016. Yoshinori Ohsumi's Nobel Prize for Mechanisms of Autophagy: From Basic Yeast Biology to Therapeutic Potential. *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*. 46: 228–233.
- François J., Blazquez M.A., Arino J., Gancedo C., 1997. Storage Carbohydrates in The Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Sugar Metabolism, Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications*. Technomic Publishing Company. 16: 285-303.
- François J., Eraso P., Gancedo C., 1987. Changes in the concentration of cAMP, fructose 2,6 bisphosphate and related metabolites and enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* during growth on glucose. *European Journal of Biochemistry*. 164: 369–373.
- François J., Parrou J.L., 2001. Reserve Carbohydrates Metabolism in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*. 25: 125–145.
- Galdieri L., Mehrotra S., Yu S., Vancura A., 2010. Transcriptional Regulation in Yeast During Diauxic Shift and Stationary Phase. *Omics: A Journal of Integrative Biology*.

14: 629–638.

- Gancedo J. M., 1998. Yeast Carbon Catabolite Repression, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 334-361.
- Gaupel A.C., Begley T., Tenniswood M., 2014. High Throughput Screening Identifies Modulators of Histone Deacetylase Inhibitors. *BMC Genomics*. 15: 528.
- Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G., 1996. Life with 6000 Genes. *Science* 274: 546–567.
- Goldstein A., Lampen J. O., 1975. Beta-D-fructofuranoside Fructohydrolase From Yeast. *Methods in Enzymology*. 42: 504-511.
- Görner W., Durchschlag E., Wolf J., Brown E.L., Ammerer G., Ruis H., Schüller C., 2002. Acute Glucose Starvation Activates the Nuclear Localization Signal of a Stress-specific Yeast Transcription Factor. *EMBO Journal*. 21: 135–144.
- Gray J.V., Petsko G.A., Johnston G.C., Ringe D., Singer R.A., Werner-Washburne M., 2004. “Sleeping Beauty”: Quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68: 187–206.
- Guarente L., Ptashne M., 1981. Fusion of *Escherichia coli lacZ* to the Cytochrome c Gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 78: 2199–2203.
- Guex N., Peitsch M.C., Schwede T., 2009. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis*. 30.
- Hartwell L., 2001. Yeast and Cancer. *Bioscience Reports*. 525-544.
- Hedbacker K., Carlson M., 2008. SNF1/AMPK Pathways in Yeast. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*. 2408–2420.
- Helliwell S.B., Wagner P., Kunz J., Deuter-Reinhard M., Henriquez R., Hall M.N., 1994. TOR1 and TOR2 are Structurally and Functionally Similar but not Identical Phosphatidylinositol Kinase Homologues in Yeast. *Molecular Biology of the Cell*. 5:

105–118.

Herman P.K., 2002. Stationary phase in yeast. *Current Opinion in Microbiology*. 5: 602–607.

Humphrey W., Dalke A., Schulten K., 1996. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*. 14: 33–38.

Inoki K., Ouyang H., Li, Y., Guan K.L., 2005. Signaling by Target of Rapamycin Proteins in Cell Growth Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 69: 79–100.

Jang Y.K., Wang L., Sancar G.B., 1999. Rph1 and Gis1 are Damage-Responsive Repressors of Phr1. *Molecular Cell Biology*. 19: 7630–7638.

Kapitzky L., Beltrao P., Berens T.J., Gassner N., Zhou C., Wüster A., Wu J., Babu M.M., Elledge S.J., Toczyski D., Lokey R.S., Krogan N.J., 2010. Cross-Species Chemogenomic Profiling Reveals Evolutionarily Conserved Drug Mode of Action. *Molecular Systems Biology*. 6.

Kiefer F., Arnold K., Künzli M., Bordoli L., Schwede T., 2009. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Research*. 37.

Klose R.J., Zhang Y., 2007. Regulation of histone methylation by demethylimination and demethylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 8: 307–318.

Kumar S., Stecher G., Tamura K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution*. 33: 1870–1874.

Kupiec M., Byers B., Esposito R.E., Mitchell A.P., 1997. 11 Meiosis and Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*. 21C: 889–1036.

Kwon H.B., Yeo E.T., Hahn S.E., Bae S.C., Kim D.Y., Byun M.O., 2003. Cloning and Characterization of Genes Encoding Trehalose-6-phosphate Synthase (TPS1) and Trehalose-6-phosphate Phosphatase (TPS2) from *Zygosaccharomyces rouxii*. *FEMS Yeast Research*. 3: 433–440.

Liao X.C., Tang J., Rosbash M., 1993. An Enhancer Screen Identifies a Gene that Encodes the Yeast U1 Snrnp a Protein: Implications for Snrnp Protein Function in Pre-Mrna

- Splicing. *Genes and Development*. 7: 419–428.
- Lillie S.H., Pringle J.R., 1980. Reserve Carbohydrate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: Responses to Nutrient Limitation. *Journal Of Bacteriology*. 143: 1384-1394.
- Lo Curto R.B., Tripodo M.M., 2001. Yeast Production from Virgin Grape Marc. *Bioresource Technology*. 78: 5–9.
- Londesborough J., Varimo K., 1984. Characterization of Two Trehalases in Baker's Yeast. *Biochemical Journal*. 219: 511-518.
- Lowry, 1951. Lowry Protein Assay. *Journal of Biological Chemistry*. 265–275.
- Martinez-Pastor M.T., Marchler G., Schuller C., Marchler-Bauer A., Ruis H., Estruch F., 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* Zinc Finger Proteins Msn2p And Msn4p are Required for Transcriptional induction Through the Stress-Response Element (STRE). *The EMBO Journal*. 15: 2227–2235.
- Mathelier A., Fornes O., Arenillas D.J., Chen C.Y., Denay G., Lee J., Shi W., Shyr C., Tan G., Worsley-Hunt R., Zhang A.W., Parcy F., Lenhard B., Sandelin A., Wasserman W.W., 2016. JASPAR 2016: A major expansion and update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Research*. 44: 110-115.
- Nwaka S., Kopp M., Holzer H., 1995a. Expression and Function of the Trehalase Genes Nth1 and Ybr0106 in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*. 270: 10193-10198.
- Nwaka S., Mechler B., Destruelle M., Holzer H., 1995b. Phenotypic Features of Trehalase Mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Febs Letters*. 360: 286-290.
- Oshiro J., Han G., Iwanyshyn W. M., Conover K., Carman G. M., 2003. Regulation of the Yeast Dpp1-Encoded Diacylglycerol Pyrophosphate Phosphatase by Transcription Factor Gis1p. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 31495-31503.
- Parrou J.L., Enjalbert B., Plourde L., Bauche A., Gonzalez B., François J., 1999. Dynamic Responses of Reserve Carbohydrate Metabolism Under Carbon and Nitrogen Limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 15: 191–203.

- Parrou J.L., François J., 1997. A Simplified Procedure for an Rapid and Reliable Assay of Both Glycogen and Trehalose in Whole Yeast Cells. *Analytical Biochemistry*. 248: 186-188.
- Pedruzzi I., Bürckert N., Egger P., De Virgilio C., 2000. *Saccharomyces cerevisiae* Ras/cAMP Pathway Controls Post-Diauxic Shift Element-Dependent Transcription Through the Zinc Finger Protein Gis1. *The EMBO journal*. 19: 2569–2579.
- Pedruzzi I., Dubouloz F., Cameroni E., Wanke V., Roosen J., Winderickx J., De Virgilio C., 2003. TOR and PKA Signaling Pathways Converge on the Protein Kinase Rim15 to Control Entry into G0. *Molecular Cell*. 12: 1607–1613.
- Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E., 2004. UCSF Chimera—A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *Journal of Computational Chemistry*. 25: 1605–1612.
- Reinders A., Bürckert N., Boller T., Wiemken A., De Virgilio C., 1998. *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-Dependent Protein Kinase Controls Entry into Stationary Phase Through the Rim15p Protein Kinase. *Genes and Development*. 12: 2943–2955.
- Riberio M. J.S., Leao L.S. C., Morais P.B., Rosa C.A., Panek A.D., 1999. Trehalose Accumulation by Tropical Yeast Strains Submitted to Stress Conditions. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 75: 245- 251.
- Roosen J., Engelen K., Marchal K., Mathys J., Griffioen G., Cameroni E., Thevelein J.M., De Virgilio C., De Moor B., Winderickx J., 2005. PKA and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability. *Molecular Microbiology*. 55: 862–880.
- Rose M. D., Winston F., Heiter P., 1990. *Methods in Yeast Genetics. A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press Books.
- Roy A., Kucukural A., Zhang Y., 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*. 5: 725–738.
- Santangelo G.M., 2006. Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70: 253–282.
- Sanz R., Battu S., Puignou L., Galceran M.T., Cardot P.J.P., 2003. Sonication Effect on

- Cellular Material in Sedimentation and Gravitational Field Flow Fractionation. *Journal of Chromatography*. 1002: 145–154.
- Schmidt A., Kunz J., Hall M.N., 1996. TOR2 is Required for Organization of the Actin Cytoskeleton in Yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93: 13780– 13785.
- Schroeder E.A., Raimundo N., Shadel G.S., 2013. Epigenetic Silencing Mediates Mitochondria Stress-Induced Longevity. *Cell Metabolism*. 17: 954–964.
- Singer M.A., Lindquist S., 1998. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Molecular cell*. 1: 639–648.
- Sopko R., Huang D., Preston N., Chua G., Papp B., Kafadar K., Snyder M., Oliver S.G., Cyert M., Hughes T.R., Boone C., Andrews B., 2006. Mapping Pathways and Phenotypes by Systematic Gene Overexpression. *Molecular Cell*. 21: 319–330.
- Stolz R.C., Bishop T.C., 2010. ICM Web: The interactive chromatin modeling web server. *Nucleic Acids Research*. 38.
- Suda Y., Rodriguez R.K., Coluccio A.E., Neiman A.M., 2009. A Screen For Spore Wall Permeability Mutants Identifies a Secreted Protease Required for Proper Spore Wall Assembly. *PLoS ONE*. 4:9.
- Swinnen E., Wanke V., Roosen J., Smets B., Dubouloz F., Pedruzzi I., Cameroni E., De Virgilio C., Winderickx J., 2006. Rim15 and the Crossroads of Nutrient Signalling Pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Division*. 1: 8.
- Szostak J.W., Blackburn E.H., 1982. Cloning Yeast Telomeres on Linear Plasmid Vectors. *Cell*. 29: 245–255.
- Tahiliani M., Mei P., Fang R., Leonor T., Rutenberg M., Shimizu F., Li J., Rao A., Shi Y., 2007. The Histone H3K4 Demethylase SMCX Links REST Target Genes to X-linked Mental Retardation. *Nature*. 447: 601–605.
- Teixeira M.C., Monteiro P.T., Guerreiro J.F., Gonçalves J.P., Mira N.P., Dos Santos S.C., Cabrito T.R., Palma M., Costa C., Francisco A.P., Madeira S.C., Oliveira A.L., Freitas A.T., Sá-Correia I., 2014. The YEASTRACT database: An upgraded information system for the analysis of gene and genomic transcription regulation in

- Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Research. 42: 161–166.
- Thevelein J.M., 1984. Regulation of trehalose mobilization in fungi. Microbiological Reviews. 48: 42-59.
- Thevelein J.M., 1992. The RAS-Adenylate Cyclase Pathway and Cell Cycle Control in Saccharomyces cerevisiae. Antonie Van Leeuwenhoek. 62: 109–130.
- Thevelein J.M., Hohmann S., 1995. Trehalose Synthase: Guard to the Gate of Glycolysis in Yeast. Trends in Biochemical Sciences. 20: 3-10.
- Tsukada Y., Fang J., Erdjument-Bromage H., Warren M.E., Borchers C.H., Tempst P., Zhang Y., 2005. Histone Demethylation by a Family of JmjC Domain-containing Proteins. Nature. 439: 811–816.
- Tuszynska I., Magnus M., Jonak K., Dawson W., Bujnicki J.M., 2015. NPDock: A web server for protein-nucleic acid docking. Nucleic Acids Research. 43: 425–430.
- Wang Y., Pierce, M., Schnepfer L., Güldal C. G., Zhang X., Tavazoie S., Broach J. R., 2004. Ras and Gpa2 Mediate One Branch of a Redundant Glucose Signaling Pathway in Yeast. Plos Biology. 2: E128.
- Wanke V., Pedruzzi I., Cameroni E., Dubouloz F., De Virgilio C., 2005. Regulation of G0 Entry by the Pho80-Pho85 Cyclin-CDK Complex. The EMBO Journal. 24: 4271–4278.
- Werner-Washburne M., Braun E., Johnston G.C., Singer R.A., 1993. Stationary Phase in the Yeast Saccharomyces cerevisiae. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 57: 383–401.
- Westholm O.J., Tronnorsjö S., Nordberg N., Olsson I., Komorowski J., Ronne H., 2012. Gis1 and Rph1 Regulate Glycerol and Acetate Metabolism in Glucose Depleted Yeast Cells. PLoS ONE 7.
- Winzeler E., 1999. Functional Characterization of the S.cerevisiae Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis. Science. 285: 901–906.
- Wullschleger S., Loewith R., Hall M.N., 2006. TOR Signaling in Growth and Metabolism. Cell.124: 471-484.

- Yamane K., Toumazou C., Tsukada Y. ichi, Erdjument-Bromage H., Tempst P., Wong J., Zhang Y., 2006. JHDM2A, a JmjC-Containing H3K9 Demethylase, Facilitates Transcription Activation by Androgen Receptor. *Cell*. 125: 483–495.
- Yu Y., Neiman A.M., Sternglanz R., 2010. The JmjC Domain of Gis1 is Dispensable for Transcriptional Activation. *FEMS Yeast Research*. 10: 793–801.
- Zahringer H., Thevelein J.M., Nwaka S., 2000. Induction of Neutral Trehalase Nth1 by Heat and Osmotic Stress is Controlled by Stre Elements and Msn2/Msn4 Transcription Factors: Variations of Pka Effect During Stress and Growth. *Molecular Microbiology*. 35: 397-340.
- Zaman S., Lippman S.I., Zhao X., Broach J.R., 2008. How *Saccharomyces* Responds to Nutrients. *Annual Review of Genetics*. 42: 27–81.
- Zhang N., Wu, J., Oliver S.G., 2009. Gis1 is required for transcriptional reprogramming of carbon metabolism and the stress response during Transition into stationary phase in yeast. *Microbiology*. 155: 1690–1698.



EK 1. *NTH1* Geni Hakkında Bazı Bilgiler

Sistematik Adı	YDR001C
Özellik Türü	ORF
Paralog	<i>NTH2</i>
Tanımı	Nötr Trehalaz
Gen Lokasyonu	IV. Kromozom 450220..452475
Protein Ailesi	Glikozid Hidrolaz Ailesi 37
Alt Birim Yapısı	Homodimer
Uzunluk (a.a.)	751
EC Numarası	3.2.1.28
USR _{STRE/PDS}	3 tane
Moleküler Fonksiyonu	Alfa, alfa-trehalaz aktivitesi, Glikosidaz , Hidrolaz
Biyolojik İşlemi	Kurumaya hücre sel yanıt ve trehaloz katabolic süreç
Hücrede İçi Konumu	Sitoplazma
Katalitik Aktivitesi	Alfa, alfa-trehaloz + H ₂ O = beta-D-glikoz + alfa-D-glikoz
Enzim Düzenlenmesi	CAMP'ye bağı fosforilasyon ile aktive olur.
Substrat Bağlanma Bölgesi	302, 346, 355 (a.a.)
Aktif Bölgesi	478, 674

EK 2. *GIS1* Geni Hakkında Bazı Bilgiler

Sistemik Adı	YDR096W
Özellik Türü	ORF
Paralog	<i>RPH1</i>
Tanımı	GIg1-2 Baskılayıcı
Gen Lokasyonu	IV. Kromozom 637.139 .. 639.823
Protein Ailesi	JmjC/jmjN
Alt Birim Yapısı	Monomer
DNA Bağlanma Tipi	C2H2 Tip – Çinko parmak
Uzunluk (a.a.)	894
Moleküler Fonksiyonu	histon demetilaz aktivitesi (H3-K36 özel), transkripsiyonel represör ve aktivatör faaliyeti
Biyolojik İşlemi	histon metilasyonu, fosfolipid biyosentetik sürecin düzenlenmesi, kronolojik hücre yaşlanması
Hücrede İçi Konumu	Nukleus

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Burak SERVİLİ

Doğum Yeri : Edremit/BALIKESİR **Doğum Tarihi :** 15.01.1989 **Uyruk:** T.C.

EĞİTİM BİLGİLERİ:

Derece	Okulun Adı	Mezuniyet Derecesi	Yıl
Lise	Edremit Lisesi	3.8/5	2001 - 2004
Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi – Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2.42/4	2010 - 2014
Yüksek Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi – Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü	4/4	2015 - 2017

Yüksek Lisans Tez Başlığı: *Saccharomyces cerevisiae* Maya Türünde Gis1 Transkripsiyon Faktörünün *NTH1* Gen Ekspresyonuna Etkisinin Analizi

Yüksek Lisans Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ

Yabancı Dil Puanı: 51.25 YDS-Sonbahar (2016) / İngilizce

İŞ DENEYİMLERİ:

Pozisyon	İş Yeri	Yıl
Teknik Servis Elemanı	Erbil Bilgisayar	1996 - 2002
Teknik Servis Elemanı	Intercity	2002 - 2004
Teknik Servis Sorumlusu	Kırmızı Multimedya	2009 - 2010
Teknik Servis Elemanı	Malimedya Bilgisayar	06.2013 - 09.2013

SERTİFİKA BİLGİLERİ:

International AFS English Center / Programmed English Language Course / 25.12.2003

Doğu Akdeniz Üniversitesi / International Conference on Security of Information and Networks / AKİS, Smart Card Operation System / 8 - 10 Mayıs 2007

KGS Danışmanlık ve Eğitim Hizmetleri / ISO 9001 Kalite Yönetim Sistemi / Katılım ve Başarı Sertifikaları / 11 - 12 Aralık 2010

KGS Danışmanlık ve Eğitim Hizmetleri / ISO 17025 Laboratuvar Teknik Yeterlilik Sistemi / Katılım ve Başarı Sertifikaları / 18 - 19 Aralık 2010

KGS Danışmanlık ve Eğitim Hizmetleri / HACCP Gıda Güvenliği Kriterleri / Katılım ve Başarı Sertifikaları / 25 Aralık 2010

ULUSAL KATILIM BELGELERİ:

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi / Kişisel Gelişim ve Bilgilendirme Toplantısı / 23 Aralık 2010

Yeditepe Üniversitesi / II. Ulusal Mikoloji Günleri / 9 - 11 Eylül 2015

IV. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi / 21 - 24 Ağustos 2015

Trakya Üniversiteler Birliği / Lisansüstü Öğrenci Kongresi / 29 - 30 Nisan 2016

ULUSLARARASI KATILIM BELGELERİ:

28th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology held in Prague, Chech Republic, 27 August – 1 September

TEŞEKKÜR BELGESİ:

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi / 5th International Eurasian Ornithology Congress / 10 - 13 Mayıs 2016

YAPILAN PROJELER:

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi / Tez Projesi, Yüksek Lisans / 2015-2016

ALINAN BURSLAR:

TÜBİTAK 2210-C Yurtiçi Yüksek Lisans Burs Programı / 2015 Yılı 2. Dönem

ULUSAL BİLİMSEL POSTER BİLDİRİLERİ:

Genç Turgut T., Solak M.Ş., Servili B., Türkel S., 2015. *Saccharomyces cerevisiae*'da Çeşitli Sinyal İletim Yolaklarının *NTH1* Geni Ekspresyonuna Etkilerinin Analizi. IV. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi.

Genç Turgut T., Günay M., Servili B., 2015. Ahududu Meyvesinden İzole Edilen *Non-Saccharomyces* Maya Türlerinin PCR-RFLP-REAP Analizi ve Hücre Dışı Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi. II. Ulusal Mikoloji Günleri.

Genç Turgut T., Günay M., Servili B., Çakas S., Doğan G., Solak M.Ş., 2016. Ozmotik Stresinin *Metschnikowia Pulcherrima* Maya Türünün Üremesi Üzerine Etkisi. 2016 Trakya Üniversiteler Birliği Lisansüstü Öğrenci Kongresi.

ULUSAL BİLİMSEL SÖZLÜ BİLDİRİLER:

Genç Turgut T., Günay M., Servili B., 2015. Nar Meyvesinden İzole Edilen *Non-Saccharomyces* Maya Türlerinin PCR-RFLP-REAP Analizi ve Hücre Dışı Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi. II. Ulusal Mikoloji Günleri.

Genç Turgut T., Günay M., Solak M.Ş., Servili B., 2015. Biyoetanol Üretimi İçin Potansiyel İki Maya Türü; *Candida glabrata* ve *Pichia kudriavzevii*. II. Ulusal Mikoloji Günleri.

Genç Turgut T., Servili B., 2016. Gis1 Transkripsyon Faktörünün NTH1 Promotoruna *in silico* Bağlanma Modeli. 2016 Trakya Üniversiteler Birliği Lisansüstü Öğrenci Kongresi.

Genç Turgut T., Günay M., Servili B., 2016. *Metschnikowia pulcherrima* Maya Türünde Tür İçi Varyasyonun Belirlenmesine ITS1 ve ITS2 Bölgelerinin Etkisi. 2016 Trakya Üniversiteler Birliği Lisansüstü Öğrenci Kongresi.







ULUSLARARASI BİLİMSEL POSTER BİLDİRİLERİ:

Servili B., Genç Turgut T., Türkel S., 2017. Computational Analysis of the Glycolytic Gene Expression Patterns in Different *Saccharomyces cerevisiae* Strains Grown in Solid State Fermentation Conditions. 2017 28th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (ICYGMB).

Tez konumun haricinde biyoinformatik ve biyokimya alanlarında bilgisayar programları ile araştırmalar yapıyorum. Genel olarak Moleküler sistematik, Protein dizileri ve katlanmaları, Proteinlerin 3Boyutlu Modellenmesi ve Docking. Toplanan veriler ile protein üzerindeki mantıksal bölgeleri *in silico* ortamda inceleyerek karşılaştırmalar yapmaktayım. *in silico* olarak Protein-Ligand, Protein-Protein ve Protein-DNA arasındaki ve bağlanma bölgelerinin etkileşimlerini araştırıyorum.

- **Kullanabildiğim Programlar**

- Biyoinformatik Programları

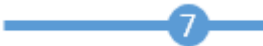





- SnapGene 
- DnaSTAR 
- VMD 
- NAMD 
- Chimera 
- Pymol 

Bu programlara ek olarak PAUP, REAP, Megasoftware gibi benzeri programları da kullanmaktayım. Ayrıca web tabanlı olarak kullanmakta olduğum veritabanları ve programlar şunlardır:

- ✓ yeastgenome.org
- ✓ yeabstract.com
- ✓ ensemblgenomes.org
- ✓ ebi.ac.uk
- ✓ dnanexus.com
- ✓ uniprot.org
- ✓ rcsb.org
- ✓ ncbi.nlm.nih.gov
- ✓ expasy.org
- ✓ proteinmodelportal.org
- ✓ zhanglab.ccmb.med.umich.edu
- ✓ genesilico.pl/NPDock
- ✓ haddock.chem.uu.nl
- ✓ usegalaxy.org





Yeni nesil sekanslama programlarında transkriptomik alanda kullandığım uygulamalar ise sırasıyla: fastqGroomer, Trimmomatic, Tophat2, FeatureCounts.

○ Grafik Programları

- Photoshop 
- Indesign 
- Aftereffects 
- 3ds Max 
- Corel Draw 
- Flash Pro 




Grafik üzerine benzer şekilde yazılmış programları da kazanmış olduğum deneyimlerle kısa sürede kullanabilmekteyim.

○ Müzik Programları

- Acid Music 
- Flstudio 
- Melodyne 
- Guitar Pro 





Birçok müzik programının benzer özellikleri vardır ve bu sebepten dolayı bu programlara benzer onlarca program kullanmaktayım.

o İşletim Sistemleri

- Windows X 
- Linux 
- Mac Os X 

İlk olarak MS-DOS işletim sistemiyle tanışmamın ardından Windows 3.x ile Windows 10 arasındaki tüm versiyonlara aşinayım. Linux işletim sisteminde çoğunlukla tercih ettiğim dağıtım ise Mint'dir. Mac OS X işletim sistemi ise pek tercih etmediğim bir işletim sistemidir ancak yeri geldiğinde işlerimi tamamlayabilecek kadar bilgim vardır.

o Office/Web Programları

- Word 
- Excel 
- Powerpoint 
- Dreamweaver 

Bu tarz ve buna benzer çoğu programı kullandım ve kullanmaya devam etmekteyim. Bu zamana kadar kullanmakta olduğum farklı programlar sayesinde yeni bir programı öğrenmek zorunda kaldığımda çok kısa sürede programı kullanabilir hala gelmekteyim.

İLETİŞİM

burakservili@stu.comu.edu.tr

(537) 273 15 62

Boğaz Kent mah. Manik Ali Cad. 26/2 17110 Kepez/ÇANAKKALE