



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ



***SACCHAROMYCES CEREVISIAE* MAYA TÜRÜNDE TEC1
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN *NTH1* GEN EKSPRESYONUNA
ETKİSİNİN ANALİZİ**

Selen ÇAKAS

Biyoloji Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

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

***SACCHAROMYCE CEREVISIAE* MAYA TÜRÜNDE TEC1
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN *NTH1* GEN EKSPRESYONUNA
ETKİSİNİN ANALİZİ**

Selen ÇAKAS

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 10/11/2017

Tez Danışmanı:

Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ

ÇANAKKALE

Selen ÇAKAS tarafından Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ yönetiminde hazırlanan ve **10/11/2017** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “*Saccharomyces cerevisiae* Maya Türünde Tec1 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/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ

Başkan

Doç. Dr. Burhan ŞEN

Üye

Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR

Üye

Prof. Dr. Levet GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

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.

Selen ÇAKAS

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sũresince benden ihtiyaım olduğunda yardımlarını, bilgi birikimini, tecrũbelerini esirgemeyen maddi ve manevi her daim yanımda olduğunu gũsteren değerli danışmanım Yrd. Doç. Dr. Tũlay TURGUT GENÇ hocama;

Çalışmalarım sũresince gece gũndũz demeden yardımlarını esirgemeyen, her zaman yanımda olup bana destek veren değerli laboratuvar hocalarım; Mehmet Őerafettin SOLAK, Melik GũNAY ve arkadaşım Burak SERVİLİ'ye;

Gerek tez çalışmam sũresince gerek normal hayatımda bana yardım ve desteğini esirgemeyen, motivasyonumu yũksek tutan, her daim yanımda olduğunu en gũzel Şekilde hissettiren çok değerli hocam Arş. Gũr. Nihan AKINCI'ya;

Her zaman bana destek veren, iyi ve kũtũ her anımda yanımda olan, çalışmalarımız boyunca eğlenceli bir ortam sağlayan benim için son derece değerli canım kardeşim ve dostum Gamze DOğAN'a;

Her daim yanımda olup, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen, aldığım her kararlarda beni destekleyip seven değerli aileme başta annem Sevgi AKAS, babam Cemallettin AKAS'a,

Çalışmalarım boyunca beni destekleyen hayatımın her alanında benim yanımda olan sayın Burak COŐKUN ve ailesine sonsuz saygı ve teŐekkũrlerimi sunarım.

Selen AKAS
anakkale, Kasım 2017

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
Δ	Delta Delesyon
%	Yüzde
g	Gravity (santrifuj birimi)
gr	Gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
Mm	Milimolar
Nmol	Nanomole
μm	Mikron
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
Dk	Dakika
Bç	Baz çifti
Kbç	Kilobaz çifti uzunluk
kDA	Kilodalton
M	Molar
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
ATP	Adenozin Trifosfat
CaCl_2	Kalsiyum Klorür
cAMP	Halkasal Adenozin MonoFosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
Glc	Glukoz
HS-DNA	Herringsperm Deoksiribonükleik asiti
lac-Z	β -Galaktozidaz geni
LiOAc	Lityum Asetat
MAT	Maya tipi
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
Na_2CO_3	Sodyum Karbonat
NaOH	Sodyum Hidroksit

OD	Optik yoğunluk
ONPG	O-Nitro-Fenil-β-D- Galaktosidaz
PEG	Polyetilen Glikol
SDS	Sodium dodesil sũlfate
TE	Tris-EDTA
UDP	Uridin Difosfat
URA	Urasil Geni



ÖZET

SACCHAROMYCES CEREVISIAE MAYA TÜRÜNDE TEC1 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN *NTH1* GEN EKSPRESYONUNA ETKİSİNİN ANALİZİ

Selen ÇAKAS

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ

10/11/2017, 61

Saccharomyces cerevisiae maya türünde trehaloz, depo karbonhidratı ve stres koruyucu molekül olarak rol oynayan bir disakkarittir. Hücre içerisindeki trehaloz miktarı, biyosentez ve yıkım mekanizmalarının sıkı bir şekilde kontrolü ile belirli bir seviyede tutulmaktadır. Trehalozun sentezi trehaloz sentaz enzim kompleksi (TPS) ile yıkımı ise *NTH1* geni tarafından kodlanan trehalaz enzimi ile gerçekleşmektedir. *NTH1* gen ekspresyonu farklı transkripsiyon faktörleri ve sinyal yolları tarafından kontrol edilmektedir. Yaptığımız biyoinformatik çalışmalarda *NTH1* promotor bölgesinde farklı transkripsiyon faktörlerinin bağlanma dizileri belirlenmiştir. Bunlardan bir tanesi Tec1 transkripsiyon faktörü olup, *NTH1* promotoru üzerinde 5 tane olası bağlanma bölgesi tespit edilmiştir. Çalışmamızda azot açlığı koşullarında Tec1 proteininin *NTH1* transkripsiyonuna etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla yaban tip ve $\Delta tec1$ *S. cerevisiae* maya hücrelerine, *NTH1* promotor bölgesini içeren plasmid transform edilerek, farklı azot kaynakları içeren ortamlardaki *NTH1* gen ekspresyon seviyeleri enzimatik yöntem ile saptanmıştır. Ayrıca yaban tip ve $\Delta tec1$ maya hücrelerinde bu koşullarda biriktirilen trehaloz miktarı enzimatik yöntemle belirlenmiştir. Araştırmanın sonunda $\Delta tec1$ hücrelerinin içerisinde biriktirilen trehaloz miktarı yaban tip suş ile karşılaştırıldığında, azot açlığı koşulunda, trehaloz miktarında artış olduğu saptandı. Tec1 proteini yokluğunda, *NTH1* ekspresyonunda artış meydana geldiği belirlendi. Yapılan çalışmada Tec1 proteini, *NTH1* regülasyonunda represör olarak görev aldığı gösterilmektedir. Veri tabanları ve bilgisayar programları kullanılması ile gerçekleştirilen *in silico* DNA-TF bağlanma modellemesinde, Tec1 proteininin *NTH1* promotoruna bağlanma olasılığının yüksek olduğu belirlendi.

Anahtar sözcükler: *NTH1*, Tec1p, Trehaloz, *Saccharomyces cerevisiae*.



ABSTRACT

ANALYSIS OF THE EFFECT OF TEC1 TRANSCRIPTION FACTOR ON *NTH1* GENE EXPRESSION OF YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Selen ÇAKAS

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Biology

Advisor : Assist. Prof. Dr. Tülay TURGUT GENÇ

10/11/2017, 61

Trehalose is a disaccharide that plays a role as a carbohydrate and stress-protective molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. Trehalose synthesis is mediated by the trehalose synthase enzyme complex, whereas degradation is mediated by the trehalase enzyme encoded by the *NTH1*. *NTH1* gene expression controls different transcription factors and signaling pathways. In our bioinformatics studies, binding sequences of different transcription factors were determined in the *NTH1* promoter region. One of them is the Tec1 transcription factor and 5 possible binding sites were detected on the *NTH1* promoter. In our study, we tried to determine the effect of Tec1p on *NTH1* transcription under nitrogen starvation conditions. Therefore, *NTH1* expression was determined by enzymatic methods in medium containing different nitrogen sources, in wild-type and *Δtec1* yeast cells which were transformed with plasmids containing *NTH1* promoter region. Furthermore the amount of trehalose accumulated in wild type and *Δtec1* yeast cells under these conditions was determined by enzymatic method. At the end of the study, when the amount of trehalose accumulated in the *Δtec1* cells and the amount of trehalose accumulated in the wild type strain were compared, it was determined that the amount of trehalose increased in the condition of nitrogen starvation. In the absence of Tec1p, it was determined that *NTH1* expression was increased. It is shown that Tec1p is acting as a repressor in *NTH1* regulation. *In silico* DNA-TF binding model performed by using databases and computer programs, it was determined that the probability of binding of Tec1p to the *NTH1* promoter was high.

Keywords: *NTH1*, Tec1p, Trehaloz, *Saccharomyces cerevisiae*.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	4
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1. Trehaloz Molekülünün Yapısı ve Fonksiyonu	4
2.2. Trehaloz Sentezi	4
2.3. Trehaloz Hidrolizi	7
2.4. <i>NTH1</i> Geninin Yapısı ve İşlevi	8
2.4.1. <i>NTH1</i> Yapısı ve Transkripsiyonel Regülasyonu	8
2.4.2. <i>Nth1</i> Protein Yapısı ve Regülasyonu	9
2.5. Trehaloz Metabolizmasının Kontrol Eden Sinyal Sistemleri	10
2.5.1. cAMP/PKA Sinyal Sistemi	10
2.5.2. TOR Sinyal Sistemi	11
2.6. <i>TEC1</i> Geninin Yapısı ve İşlevi	14
BÖLÜM 3	17
MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1. Çalışmada Kullanılan Mayaların Özellikleri ve Sahip Oldukları Mutasyonlar	17
3.2. Kullanılan Plazmitler	17
3.3. Maya Suşlarının Büyüme Eğrileri.....	18
3.4. Plazmitlerin Amplifikasyonu ve Maya Suşlarına Hücrelerine Transformasyonu	18
3.5. Transformant Maya Suşlarının Üreme Şartları ve Örnek Alınması.....	19
3.6. β -Galaktozidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	19
3.7. Trehaloz Miktarının Saptanması	20
3.8. Biyoinformatik Çalışmalar	20
3.8.1. <i>Saccharomyces</i> Genome Database (SGD)	20

3.8.2. National Center for Biotechnology Information (NCBI)	21
3.8.3. JASPAR CORE Database	21
3.8.4. VMD-Visual Molecular Dynamics	21
3.8.5. Megasoftware 7.0 (MEGA 7).....	21
3.8.6. I-TASSER ve NPDock Webserverları	22
BÖLÜM 4	23
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	23
4.1. Maya Suşlarının Üreme Eğrileri (Growth Curve) ve İnkilenme Süreleri	23
4.2. Tec1 Transkripsiyon Faktörünün <i>NTH1</i> Gen Ekspresyonuna Etkisi	29
4.3. Farklı Azot Kaynaklarının <i>NTH1</i> Gen Ekspresyonuna Etkisi	30
4.4. Tec1 Transkripsiyon Faktörünün Farklı Azot Kaynaklarında <i>NTH1</i> Transkripsiyonuna Etkisi	31
4.5. Tec1 Transkripsiyon Faktörünün Hücre İçi Trehaloz Birikimine Etkisi	33
4.6. Tec1 Transkripsiyon Faktörünün Farklı Azot Kaynaklarında Hücre İçi Trehaloz Birikimine Etkisi	34
4.7. Tec1 Transkripsiyon Faktörünün <i>NTH1</i> Promotoruna <i>in silico</i> Bağlanma modeli ..	37
4.8. Çeşitli Canlı türlerinde Bulununan TEA Domain Bölgesinin Blast Analizi.....	46
BÖLÜM 5	49
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	49
EKLERİ	I
EK 1. Çalışma süresince kullanılan çözeltilerin hazırlanması	II
ÖZGEÇMİŞ	III

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Maya hücrelerinde replikatif ve kronolojik yaşam süresi	2
Şekil 2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> maya türünde trehaloz ve glikojen biyosentez mekanizması	5
Şekil 2.2. <i>S. cerevisiae</i> 'de normal koşul, stres ve stres sonrası durumlarda trehaloz biyosentez regülasyonu	7
Şekil 2.3. Bmh1 bağımlı Nth1 protein aktivasyonu.....	10
Şekil 2.4. cAMP-protein kinaz A (PKA) yolağı aktivasyonu.....	11
Şekil 2.5. Kuvvetli azot kaynağında TOR sinyal yolağı.....	13
Şekil 2.6. Zayıf azot kaynağında TOR sinyal yolağı	14
Şekil 2.7. <i>S. cerevisiae</i> ' de phantom C kaynağının (etil alkol) yaşlanma üzerine olası etkisi (modifiye edilmiştir.)	16
Şekil 4.1. Yaban tip maya suşunun üreme grafiği	25
Şekil 4.2. <i>Atecl</i> mutant maya suşunun üreme grafiği.....	26
Şekil 4.3. Yaban tip maya suşundaki İkilenme süresi ve spesifik üreme oranını.....	27
Şekil 4.4. <i>Atecl</i> maya suşunun İkilenme süresi ve spesifik büyüme oranını	28
Şekil 4.5. Tec1 transkripsiyon faktörünün olası DNA bağlanma bölgesi (Jaspar Core: ID MA0406.1).....	38
Şekil 4.6. Tec1p' nin <i>NTH1</i> promotor bölgesindeki olası bağlanma bölgeleri (SnapGene).....	38
Şekil 4.7. Tec1p'nin TEA/ATTS DNA bağlanma bölgesine ait 66 amino asitlik dizi (Uniprot/SGD)	39
Şekil 4.8. Leu ⁴⁴ – C ₉₁ (6.327 Å).....	41
Şekil 4.9. Ile ²⁹ – A ₈₈ (10.872 Å).....	42
Şekil 4.10. Lys ⁴⁷ – T ₈₉ (5.260 Å)	43
Şekil 4.11. Lys ⁴⁷ – G ₉₀ (4.352 Å)	44
Şekil 4.12. <i>NTH1</i> Promotoru üzerinde olası Tec1p DNA bağlanma bölgesi	45
Şekil 4.13. Çeşitli fungi türlerinde bulunan korunmuş TEA domain bölgeleri.....	47
Şekil 4.14. Çeşitli türlerdeki korunmuş TEA domain bölgeleri	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 3.1. <i>S. cerevisiae</i> maya suşları	17
Çizelge 4.1. Stressiz koşullarda Tec1 proteinin <i>NTH1</i> transkripsiyonuna etkisi.....	29
Çizelge 4.2. Farklı azot kaynaklarının <i>NTH1</i> gen ekspresyonuna etkisi	31
Çizelge 4.3. Tec1 proteinin farklı azot kaynaklarının <i>NTH1</i> gen ekspresyonuna etkisi	32
Çizelge 4.4. Stressiz üreme koşulunda Tec1 proteinin hücre içi trehaloz birikimine etkisi	34
Çizelge 4.5. Tec1 proteinin farklı azot kaynaklarının hücre içi trehaloz birikimine etkisi .	36
Çizelge 4.6. Çeşitli fungi türlerinde TEA/ATTS DNA helix bölgeleri ve karşılık geldiği korunmuş bölgeler	46
Çizelge 4.7. Çeşitli canlı türlerinde TEA/ATTS DNA helix bölgeleri ve karşılık geldiği korunmuş bölgeler	46

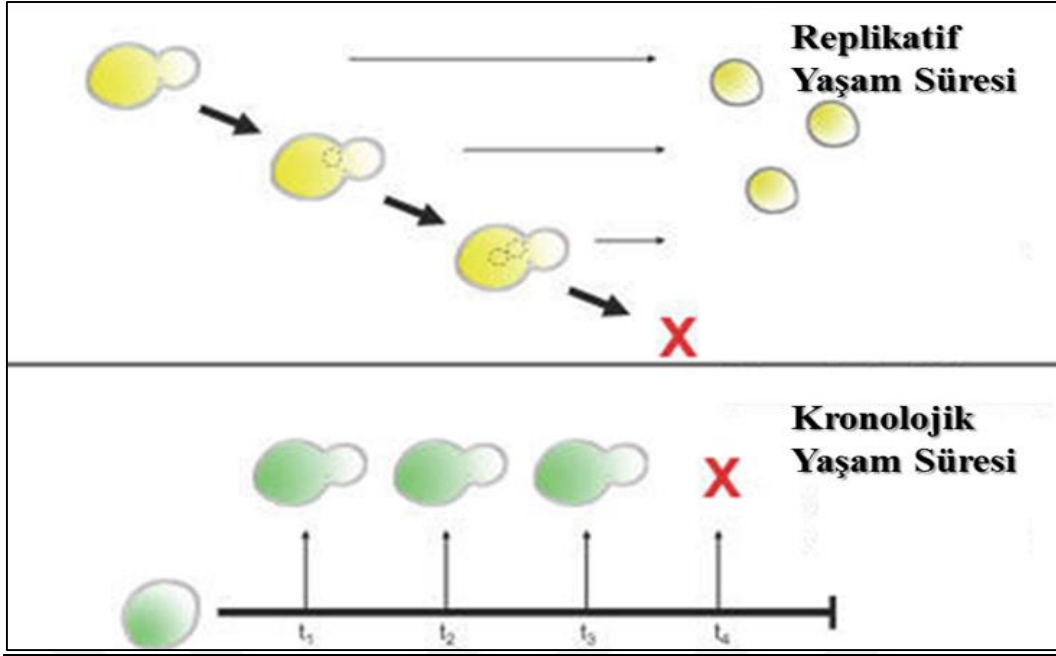


BÖLÜM 1

GİRİŞ

Fungi aleminin *Ascomycetes* sınıfı içerisinde bulunan mayalar tek hücreli ökaryotik mikroorganizmalardır. Mayalar çok çeşitli yaşam alanlarında simbiyotik ya da parazit olarak bulunabilirler. *S. cerevisiae* maya suşu yüksek ökaryotik organizmalara benzemesi, bu hücrelere kıyasla daha az karmaşık olması, genetik ve moleküler manipülasyonlara daha iyi cevap oluşturabilmesi gibi sebeplerden dolayı ökaryotik model organizma olarak kullanılmaktadır. *S. cerevisiae* tüm genom dizilimi yapılan ilk mikroorganizmadır. Tomurcuklanma ile üreyen *S. cerevisiae* maya hücreleri oksijen varlığında oksidatif fosforilasyon ile, oksijen yokluğunda ise alkolik fermentasyon yaparak çoğalmaktadır. Mayalar diğer canlılara ait protein ve farmasötik ajanların üretilmesinde kullanılmaktadır. Örneğin; insülin, interferon proteinleri ve hepatit B virüsünün kabuk proteinleri mayalar kullanılarak üretilmektedir. Mayalarda, yüksek ökaryotlara benzer G₁, S, G₂ ve M fazlarından oluşan hücre döngüsü ve intranükleer iğ bulunmaktadır. Lee Hartwell ve arkadaşlarının *S. cerevisiae*'da hücre döngüsünde görevli gen mutasyonları ve kanser ile ilişkilerini gösterdikleri çalışmaları 2001 yılında Nobel ödülü almalarını sağlamıştır. *S. cerevisiae* maya hücrelerinin yaşlanma mekanizması ile ilişkili sistemler yüksek ökaryotlardaki sistemlerle benzerlik göstermektedir. Bu nedenle *S. cerevisiae* maya türü, hücre ve organizma yaşlanması ile ilişkili çalışmalarda model organizma olarak kullanılmaktadır.

Maya hücrelerinde “Replikatif Yaşam Süresi” ve “Kronolojik Yaşam Süresi” olmak üzere yaşlanma ile ilişkili iki mekanizma bulunmaktadır (Kaeberlein ve ark., 2007). Replikatif yaşam süresi, tek bir maya hücrelerinin gerçekleştirdiği mitotik bölünme sayısı olarak, kronolojik yaşam süresi ise durağan fazdaki maya hücrelerinin hayatta kalabildiği zaman süresi olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. Maya hücrelerinde replikatif ve kronolojik yaşam süresi (Kaeberlein ve ark., 2007)

S. cerevisiae maya hücreleri uygun üreme koşulları varlığında glikojen ve trehaloz karbonhidratlarını sentezleyerek depolamaktadır. Glikojen, glukoz moleküllerinin $\alpha(1-4)$ ve $\alpha(1-6)$ glikozidik bağlarıyla bağlanması sonucu oluşan bir polisakkarit iken, trehaloz molekülü iki glukoz molekülünün $\alpha(1-1)$ glikozidik bağı ile bağlanması sonucu oluşan bir disakkarittir. Her iki karbonhidratta enerji kaynağı olarak maya hücreleri tarafından kullanılmakla birlikte, trehaloz molekülü çeşitli fizyolojik streslere (oksidasyon, ağır metaller, kuruma ve organik bileşikler vb.) karşı hücrelerin korumasında rol almaktadır (Franca ve ark., 2007).

Stres koşullarında trehaloz molekülü Trehaloz Fosfat Sentetaz (TPS) kompleksi tarafından sentezlenmektedir (François ve ark., 1997). Stres koşullarında sentezlenen trehaloz, ortam koşullarının normale dönmesiyle birlikte, trehalaz enzimi ile hızlıca yıkılır. *S. cerevisiae* maya hücresinde lokalizasyonuna, düzenleyici sistemlerine ve fonksiyonlarına göre asidik trehalaz ve nötral trehalaz olmak üzere 2 farklı trehalaz enzimi bulunmaktadır. *ATH1* geni (Acid Trehalase 1) tarafından kodlanmakta olan asidik trehalaz inter-membranda bulunmaktadır. Bu enzim hücre dışı trehalozun parçalanmasından sorumlu olup, pH yaklaşık olarak 5 değerindeyken optimum aktivite göstermektedir.

NTH1/NTH2 genleri (Neutral Trehalase 1,2) tarafından kodlanmakta olan nötral trehalaz enzimleri ise pH 7.0 değerinde aktif olmaktadır. Nth1 proteini sitoplazmada

lokalize olup, stres koşullarında sentezlenen trehalozun parçalanmasında görev almaktadır (Nwaka ve Holzer, 1998; Elbein ve ark., 2003; Eleutherio ve ark., 2014). Maya hücrelerinin erken gelişim evresinde maksimum düzeyde Nth1p aktive edilirken, hücrelerin durağan evreye geçmesiyle birlikte Nth1p inaktive edilmektedir (Thevelein ve ark., 1984). Vakuolde lokalize olan Nth2p, Nth1p ile %77 benzerliğe sahiptir (Jules ve ark., 2008). Nth2 proteinin rolü henüz tam olarak bilinmemekle beraber, Nth1 protein regülatörü olabileceği düşünülmektedir (Nwaka ve ark.,1995a; Nwaka ve Holzer, 1998; Eleutherio ve ark., 2014).

S. cerevisiae maya türünde *NTH1* geni (YDR001) 4. kromozom üzerinde tek kopya halinde bulunmaktadır. *NTH1* geninin promotorunda bulunan Stress Response Elementleri (STRE), *NTH1* gen aktivasyonu için gereklidir (Nwaka ve ark., 1995a, 1995b). Stres koşullarında gerçekleşen *NTH1* transkripsiyonu sonucu sentezlenen Nth1 enzimi hücrede inaktif olarak kalmaktadır. Stres koşulları sona erdiğinde ise cAMP/PKA tarafından fosforlanarak aktif hale geçen Nth1p enzimi, trehalozu hidrolize etmektedir. Farklı stres koşullarında aktivasyonu artan *NTH1* geninin transkripsiyonel regülasyonu ve bu regülasyondan sorumlu olan transkripsiyon faktörlerinin çoğunluğu tam olarak bilinmemektedir.

TEC1 geni (Transposon Enhancement Control 1) (YBR083W) tarafından kodlanan Tec1 transkripsiyon faktörü, MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) ve TORC1 (Target of Rapamycine Complex) yollarında görev almaktadır (Madhani ve ark., 1997; Brükner ve ark., 2011). Tec1 transkripsiyon faktörü promotor bölgesinde TEA/ATTS elementlerini içeren genlere bağlanarak transkripsiyonlarını düzenlemektedir. Yaptığımız biyoinformatik analizde *NTH1* geninin promotor bölgesinde, Tec1p bağlanma dizisi bulunmaktadır. Veri tabanları ve bilgisayar programları kullanılması ile gerçekleştirilmiş olan *in silico* DNA-TF bağlanma modellemesinde, Tec1 proteinin *NTH1* promotoruna bağlanma olasılığının yüksek olduğu gösterilmiştir.

Bu nedenle tez çalışması kapsamında, *NTH1* geninin transkripsiyonel regülatörü olduğunu düşündüğümüz Tec1 transkripsiyon faktörünün, *NTH1* ekspresyonu üzerindeki olası etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

TEC1 gen mutasyonu taşıyan *S. cerevisiae* maya hücrelerinde, logaritmik aşamada *NTH1* gen ekspresyonun arttığı belirlendi. Bu durum Tec1 proteinin, *NTH1* gen ekspresyonunda represör olarak görev aldığını gösterdi. Ayrıca farklı azot kaynakları kullanılarak yapılan çalışmada kuvvetli azot kaynağında *Δtec1* mayalarda trehaloz birikiminin azaldığı, zayıf azot kaynağında ise arttığı belirlendi.

BÖLÜM 2

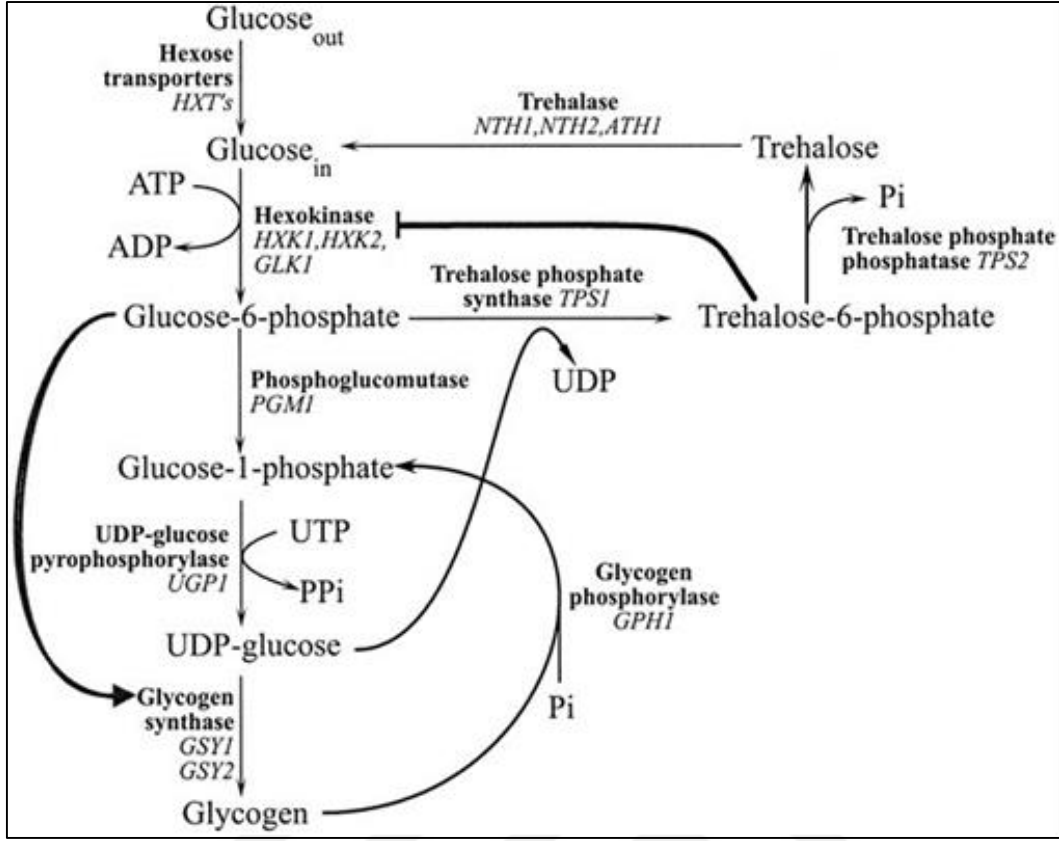
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Trehaloz Molekülünün Yapısı ve Fonksiyonu

Trehaloz molekülü, iki glukoz molekülünün Glc α 1,1 glikolizidik bağ ile bağlanması sonucu oluşan bir disakkarittir. *S. cerevisiae* maya hücrelerinde, trehaloz enerji kaynağı ve stres koruyucu olarak rol oynamaktadır. Trehaloz, yüksek su tutma özelliğine sahip olduğundan dolayı gıda ve kozmetik alanlarında kullanılmaktadır. Anhidrobiyot organizmalar, yapılarında bulunan trehaloz molekülü sayesinde radyasyona, yüksek veya düşük sıcaklıklar gibi ekstrem koşullara karşı yüksek tolerans göstermektedir (Crowe ve Koblasz, 1984; Womersley, 1981). *In vitro* yapılan çalışmalarda trehalozun hidroksil grubu ile hücre zarında fosfolipitlerin polar baş gruplarının etkileşime girerek, hücre zarının iç ve dış kısmında bulunan su molekülleri ile yer değiştirdiği böylece hücre zarının stabilitesini sağladığı rapor edilmiştir (Crowe ve ark., 1984). Farklı mutant *S. cerevisiae* maya suşları kullanılarak yapılan çalışmalarda trehaloz molekülünün hücreleri osmotik ve oksidatif stres, etil alkol konsantrasyonu, donma, yüksek sıcaklık ve kuruma gibi streslere karşı koruduğu belirlenmiştir (Coutinho ve ark., 1998; Eleutherio ve ark., 1993a, 1993b, 1997; Mansure ve ark., 1994; Herdeiro ve ark., 2006). Yapılan başka bir çalışmada, trehaloz molekülünün, oksidatif stres sonucu meydana gelen hasara karşı protein ve lipitleri koruyarak, hücrelerin yaşam süresini uzattığı ve fermentasyon kapasitesini arttırdığı tespit edilmiştir (Trevisol ve ark., 2011).

2.2. Trehaloz Sentezi

S. cerevisiae maya türünde, trehaloz sentezi TPS kompleksi (Trehaloz Fosfat Sentetaz) ile gerçekleşmektedir. TPS kompleksi Tps1p, Tps2p, Tps3p ve Tsl1 proteinlerinden oluşan tetramerik bir komplekstir (Trevisol ve ark., 2014). *TPS1* geni tarafından kodlanan Tps1p trehaloz fosfat sentaz aktivitesine sahip olup UDP-glukozu kullanarak Glukoz-6-fosfatı trehaloz-6-fosfata dönüştürmektedir. *TPS2* geni tarafından kodlanan Tps2 proteini ise, trehaloz fosfat fosfataz aktivitesine sahip olup trehaloz-6-fosfatı trehaloz molekülüne çevirmektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *Saccharomyces cerevisiae* maya türünde trehaloz ve glikojen biyosentez mekanizması (De Silva-Udawatta, 2001)

Tps1p ve Tps2p enzimleri TPS kompleksinin katalitik alt üniteye sahip alt üniteleridir. Diğer alt üniteler, Tps3p ve Tsl1p ise düzenleyici alt ünitelerini oluşturmaktadır. Tsl1 proteinin, TPS kompleksi içinde yapısal bir role sahip olduğu, *TSL1* gen ekspresyonundaki değişimin Tps1p aktivitesini etkilediği belirlenmiştir. Tps3 proteini, Tps1p ile homolog olmasına rağmen enzimatik aktivitesi bulunmamaktadır (Eleutherio ve ark., 2014; Magalhaes ve ark., 2017). Tps3 proteinin PKA tarafından fosforlanması ile TPS kompleksinin aktivitesinin cAMP-PKA yolu üzerinden kontrol edildiği gösterilmiştir (Trevisol ve ark., 2014). Yapılan fosfoproteomik çalışmada Tps3 proteinin PKA fosforilasyonu için 4 fosforilasyon motifi içerdiği belirlenmiştir (Stark ve ark., 2010). Tps3 proteinin yokluğunda, Tps1 proteinin aktif olması ve baskılanamaması, Tps3 proteinin trehaloz sentezinin regülasyonunda önemli olduğunu göstermektedir (Trevisol ve ark., 2014).

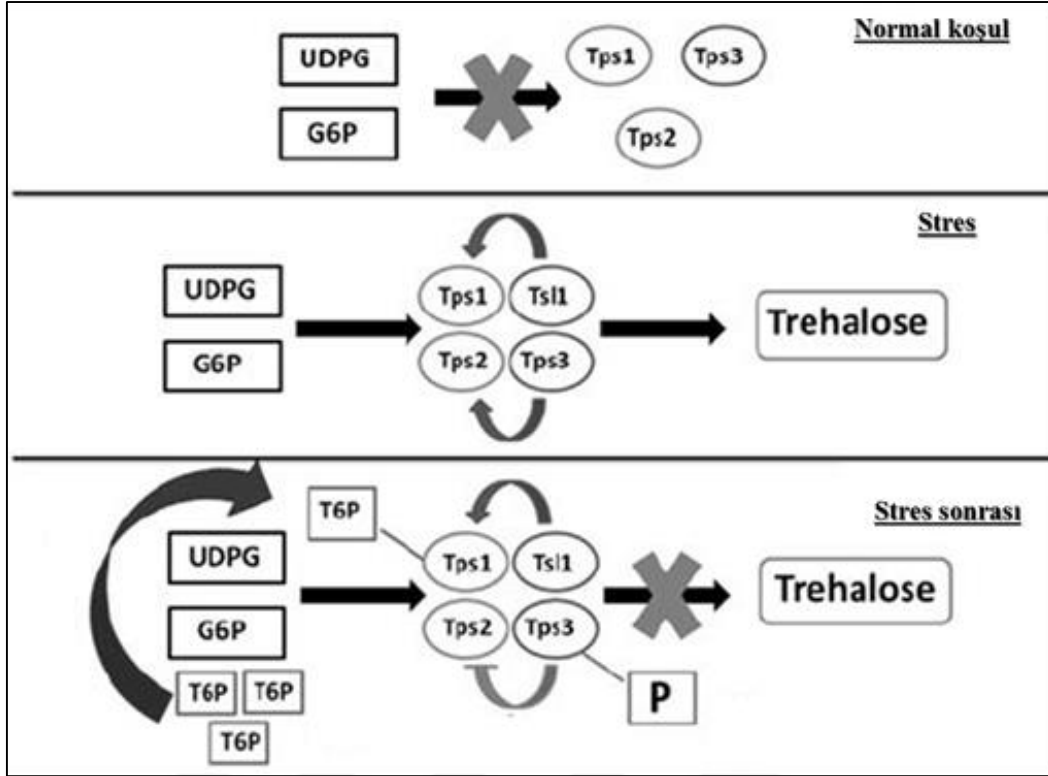
Trehaloz-6-P fosfataz ve Trehaloz-6-Fosfat Sentetaz trehaloz biyosentezinden sorumlu önemli yollarda kritik öneme sahip enzimlerdir. Trehaloz biyosentez yolu *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, nematodların bazı türleri, bitkiler, böcekler gibi birçok organizmada bulunmaktadır (Kaasen ve ark., 1994; Becker ve

ark.,1996; Behm, 1997; Li ve ark., 2012; Lunn ve ark., 2014;). *E .coli* bakterisi hücrelerinde trehaloz sentaz ve fosfatazı kodlayan *otsA* ve *otsB* genleri ile *S.cerevisiae*'de bulunan *Tps1p* ve *Tps2p* alt ünitelerini kodlayan genler yüksek oranda homoloji göstermektedir (Kaasen ve ark., 1994).

TPS genlerinin promotor bölgeleri değişken sayıda *STRE* elementleri içermektedirler (Winderickx ve ark., 1996). Stres koşullarında *S. cerevisiae* maya türünde *TPS* kompleksinde bulunan proteinlerin aktivitelerinin ve aynı zamanda ilgili genlerin transkripsiyonlarının arttığı belirlenmiştir (Trevisol ve ark., 2014).

Nth1p ve *Tps3p*, *cAMP/PKA* bağımlı fosforilasyonu, trehalozun sentez ve yıkım mekanizmalarının etkin bir şekilde düzenlenmesi ve metabolik olayların hızlı bir şekilde ayarlanmasını sağlamaktadır. *Tps1p*, heksokinaz (*Hxk2p*) ve heksoz transport (*HXTs*) proteinlerinin aktivitelerini kontrol etmektedir. Trehaloz-6-P tarafından heksokinaz aktivitesinin bloke edilmesi, glukozun glikolitik yolak yerine diğer yollara girmesine neden olmaktadır (Şekil 2.1). *TPS1* delesyonuna sahip hücrelerde glikolitik enzimler etkin olmalarına rağmen glukoz varlığında üreyemedikleri saptanmıştır. Bu durum trehaloz-6-P'in glikolitik yolun düzenlenmesinde görev aldığını göstermektedir (Deroover ve ark., 2016).

S. cerevisiae maya hücrelerinde normal üreme koşullarında (çevresel stresin olmadığı koşullarda) *TPS* kompleksi oluşmaz (Şekil 2.2.). Stres koşullarında ise *TPS* kompleksi oluşur ve trehaloz molekülü sentezlenir. Stres koşullarının ortadan kalkması ile *Tps3p* fosforlanır ve *Tps2* proteinini baskılar. *Tps1* proteini bu koşullarda çalışmaya devam etmemektedir. Hücre içerisinde trehaloz-6-fosfat trehaloza dönüştürülemediği için konsantrasyonu artmaya başlar. Bu durumda, yüksek trehaloz-6-fosfat, *Tps1* proteinine bağlanarak kompleksin dağılmasına neden olur (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. *S. cerevisiae*'de normal koşul, stres ve stres sonrası durumlarda trehaloz biyosentez regülasyonu (Trevisol ve ark., 2014)

2.3. Trehaloz Hidrolizi

S. cerevisiae maya hücrelerinde trehaloz molekülü, karbon ve enerji kısıtlamasına bağlı olarak, dioksik kayma sonrası durağan aşamaya geçerken TPS enzim kompleksinin aktivitesiyle biriktirmeye başlamaktadır (Lillie ve Pringle, 1980). Besin ve çevresel stres koşullarının normale dönmesiyle ise hızlı bir şekilde trehalaz enzim aktivitesiyle glukozu hidroliz edilmektedir. *S. cerevisiae* maya hücrelerinde asidik trehalazlar ve nötral trehalazlar olmak üzere trehalozu parçalayan iki farklı trehalaz bulunmaktadır.

Asit trehalaz enzimi *ATH1* geni tarafından kodlanmakta olup, hücre dışı trehalozun yıkımından sorumludur. Ath1 proteini optimum pH değeri 5.0 olduğu için asidik trehalaz olarak adlandırılmıştır. Yapılan çalışmalarda Nth1 proteinin vakuolde ve hücre zarının dış kısmında (inter-membran) lokalize olduğu belirlenmiştir. Hücre zarında lokalize olan Ath1 proteinin hücre dışı trehaloz molekülünün hidrolizinde sorumlu olduğu düşünülmektedir (Alizadeh ve Klionsky, 1996). Vakuolde lokalize olan asit trehalazın görevi bilinmemekle beraber otofaji ile hücre içerisindeki trehalozun parçalanmasında görev aldığı düşünülmektedir (Jules ve ark., 2004).

S. cerevisiae maya türünde nötral trehalaz enzimi *NTH1* ve *NTH2* genleri tarafından kodlanmakta olup, aktivitesi için pH değeri 7.0 olduğundan dolayı nötral

trehalaz olarak adlandırılmaktadır (Nwaka ve Holzer, 1998). Nth1p ve Nth2 proteinleri sitoplazmada lokalize olup, farklı stres koşullarında hücre içinde biriktirilen trehalozun yıkımından sorumludur (Nwaka ve Holzer, 1998). Nth1 proteininin homoloğu olan Nth2 proteininin aktivitesi henüz tam olarak bilinmemekle beraber, Nth1 proteinin düzenleyicisi olduğu düşünülmektedir (Nwaka ve Holzer, 1998).

S. cerevisiae maya türünde hücre içi trehaloz seviyesi birbirine antagonist olarak çalışan enzimlerin aktiviteleri ile düzenlenmektedir. Trehalozun sentezinden sorumlu TPS kompleksini oluşturan genlerin (*TPS1*, *TPS2*, *TPS3*, *TSL1*) ve yıkımından sorumlu *NTH1* geninin transkripsiyonu stres koşullarında gerçekleşmektedir. *TPS* ve *NTH1* gen ekspresyonu aynı anda gerçekleşmesine rağmen, sentezlenen Nth1p inaktif olarak sitoplazmada kalmaktadır. Stres koşulları kalktığında ise *TPS* ve *NTH1* transkripsiyonu baskılanırken, Nth1p farklı sinyal yolları tarafından fosforlanarak aktive edilir ve trehalozu glukoza parçalamaktadır. Bu durum trehaloz metabolizmasında görevli enzimlerin ve ilgili genlerinin çevre koşullarına göre sıkı bir şekilde kontrol edildiğini göstermektedir.

2.4. *NTH1* Geninin Yapısı ve İşlevi

2.4.1. *NTH1* Yapısı ve Transkripsiyonel Regülasyonu

S. cerevisiae maya türünde *NTH1* (*YDR001*) 4. kromozom üzerinde intron içermeyen bir gen dir. Tek kopya olarak bulunan *NTH1* geni 2255bp (coordinates: chrIV: 452475-450220) uzunluğundadır. *NTH1* geninin promotor bölgesinde STRE elementleri (Stress Response Element) (5'-CCCCT-3') bulunmakta olup, stres koşullarında transkripsiyon aktivasyonu için gereklidir (Nwaka ve ark., 1995a, 1995b). Besin açlığı, ısı stresi, oksidatif stres, yüksek ozmolarite, düşük pH ve DNA hasarları gibi farklı çevresel etkenler promotorlarında STRE *cis*-elementini içeren genlerin ekspresyonuna neden olmaktadır.

Msn2 ve Msn4 proteinleri sırasıyla, *MSN2* ve *MSN4* genleri (Multicopy Suppressor of SNF1 mutation 2,4) tarafından kodlanmaktadır. Msn2 ve Msn4 proteinleri C₂H₂ çinko parmak DNA bağlanma motifine sahip transkripsiyon faktörleridir. Yapılan çalışmalarda Msn2 ve Msn4 trans-acting faktörlerinin STRE aracılı gen ekspresyonunda birincil olarak görev aldıkları belirlenmiştir (Martinez Pastor ve ark., 1996). Msn2 proteini besin açlığı ve diğer stres koşullarında *NTH1* promotorundaki STRE dizilerine bağlanarak transkripsiyonunu kontrol etmektedir. Msn2 ve Msn4 proteinlerinin hücre içindeki lokasyonu (sitoplazma veya nukleus) fosforilasyon-defosforilasyon mekanizması ile kontrol edilmektedir. Msn2/4 proteinleri üzerinde; DNA Bağlanma Bölgesi (DBD),

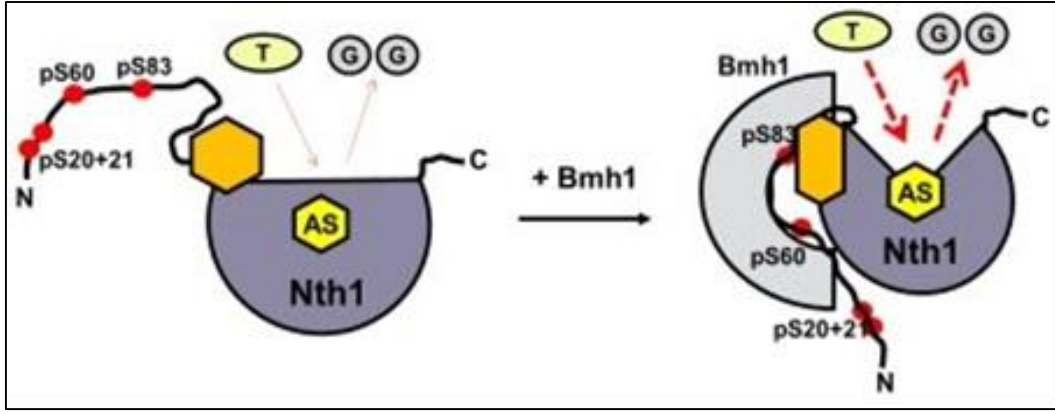
nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) ve transkripsiyon aktivasyon bölgesi (TAR) bulunmaktadır.

Çevresel stres bulunmadığında, Msn2 ve Msn4 proteinleri sitoplazmada lokalize olmaktadır. Işı şoku, sorbik asit, oksidatif stres gibi çevresel stresler Msn2/Msn4 proteinlerinin aktif hale geçmesini sağlar (Görner ve ark., 2002). Msn2 ve Msn4 proteinlerinin aktivitesi, TOR yolağı, SWI/SNF1 kompleksi, cAMP/PKA sinyal yolağı ve Proteozom degradasyon yolağı kontrol edilmektedir. cAMP/PKA, Msn2 ve Msn4 proteinlerini fosforlayarak sitoplazmik alana geçişi sağlanmaktadır. Aynı zamanda yüksek cAMP konsantrasyonu ve Tor1 kinaz yolağı ile aktif hale gelen Bmh2 proteini Msn2/Msn4 proteinlerine bağlanarak sitoplazmada kalması sağlanır. Nükleer Snf1 kinaz kompleksi (Snf1p/Snf4p/Gal83p), Msn2 ve Msn4 transkripsiyon faktörlerini besin azlığı koşulunda fosforlayarak sitoplazmaya geçişini sağlamaktadır. Msn2 ve Msn4 proteinlerinin defosforilasyonunda protein fosfataz 1 enzimi (PP1) görev almaktadır (De Wever ve ark., 2005).

2.4.2. Nth1 Protein Yapısı ve Regülasyonu

Nth1 proteinin 751 amino asit içerdiği ve 8588.1 Da moleküler ağırlığa sahip olduğu hesaplanmıştır (web kaynakça 1). Nötral trehalaz enzimi (E.C.3.2.1.28), glikozit hidrolaz ailesine ait olup hücre içi trehalozun [α -D-glucopyranosyl-(1-1)- α -D-glucopyranoside] iki molekül glukoza hidrolizinden sorumludur. Farklı stres koşullarında *NTH1* transkripsiyonu artmasına rağmen, Nth1p aktivitesi gözlenmemektedir. Stres ortamının sonlanması, sonrası Nth1 proteini cAMP bağımlı PKA tarafından fosforlanarak aktif hale geçirilmektedir. Nth1p üzerinde PKA tarafından fosforlanabilecek olası 8 amino asit (Ser²⁰, Ser²¹, Ser⁶⁰, Ser⁸³, Ser⁴⁷⁵, Thr⁵⁸, Thr¹³⁵, Thr¹⁴⁹) bulunmaktadır. Bu amino asitlerin her biri için yapılan site-directed mutagenesis çalışmalarında trehalaz aktivitelerinde değişiklik gözlenmemiştir (Wera ve ark., 1999). Daha sonra yapılan başka bir çalışmada ise Ser²⁰, Ser²¹, Ser⁶⁰ ve Ser⁸³ fosforlanma bölgelerinin tümünün fosforlandığı zaman trehalaz aktivitesinin görüldüğü tespit edilmiştir (Veisova ve ark., 2012). 14.3.3 proteininin mayadaki izoformları olan Bmh1 ve Bmh2 proteinlerinin, fosforlanan bu dört amino asitin bulunduğu bölgeye bağlanarak Nth1 protein aktivitesini arttırdığı rapor edilmiştir (Veisova ve ark., 2012).

Bmh1 proteini (Brain Modulosignalin Homolog) PKA tarafından fosforlanan Nth1 proteinine bağlanarak enzimin katalitik bölgesinin açığa çıkmasını ve trehalozun hidrolize edilmesini sağlamaktadır (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Bmh1 bağımlı Nth1 protein aktivasyonu (Macakova ve ark., 2013)

Diğer bir protein olan Dcs1 proteini (DeCapping Scavenger 1) pirofosfataz aktivitesine sahip olup Nth1 proteinin inhibitörüdür. *DCS1* gen mutasyonu taşıyan mayalarda nötral trehalaz aktivitesinin belirli bir seviyede olduğu gözlenmiştir. (Schepers ve ark., 2012). Ayrıca Dcs1 proteinin, Nth1 proteinine bağlanmak için Bmh1 proteini ile yarıştığı, böylece Nth1 proteinin fosforlanmasını ve aktif hale gelmesini engellediği öne sürülmüştür (Schepers ve ark., 2012).

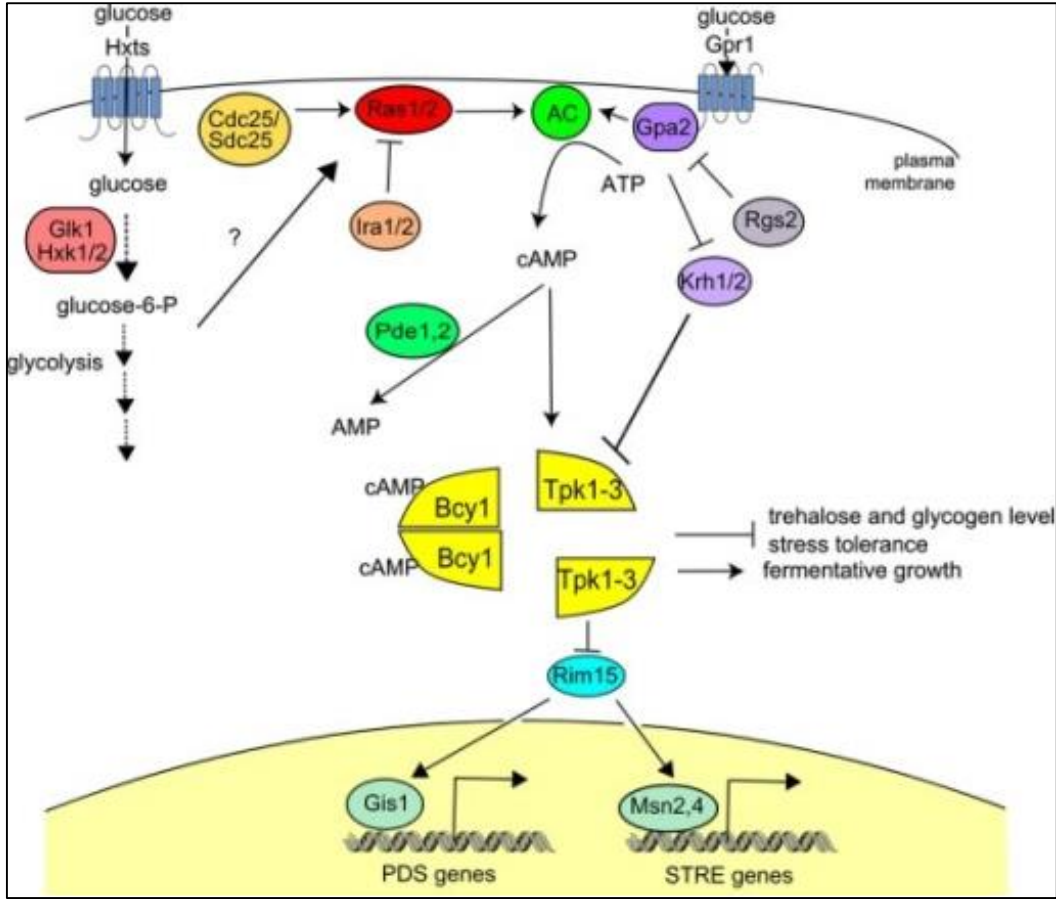
Bmh1 proteinin hedefinin fosforlanmış Nth1 proteini, Dcs1 proteininin ise fosforlanmamış Nth1 proteini olduğu düşünülmektedir. Tüm bu çalışmalar Bmh1 proteinin Nth1 proteinin fosforlanmış bölgesine bağlanarak fosfataz enzimlerine karşı Nth1 proteinin koruduğu ve inhibitörlerin bağlanmasını engellediği sonucunu çıkarmaktadır. Nth1 proteini Protein Fosfataz 2A (PP2A) enziminin aktivitesi ile inaktif hale geçmektedir (Sugajska ve ark., 2001).

2.5. Trehaloz Metabolizmasının Kontrol Eden Sinyal Sistemleri

2.5.1. cAMP/PKA Sinyal Sistemi

S. cerevisiae'de cAMP-protein kinaz A (PKA) yolağı hücre büyümesi, metabolizması ve stres direncinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. *S. cerevisiae*' da PKA *TPK1*, *TPK2* ve *TPK3* (Takashi's Protein Kinase) genler tarafından kodlanan katalitik birim ve *BCY1* (Bypass of Cyclic-AMP requirement) geni tarafından kodlanan düzenleyici alt birimden meydana gelen tetramerik bir komplekstir. Besin azlığı durumunda (örneğin; glukoz azlığı) bu katalitik ve düzenleyici alt birimler bir araya gelerek inaktif PKA kompleksini meydana getirirler. Ancak glukoz miktarının artması glikolizi aktive ederek, fruktoz 1-6-bifosfat miktarını artırmaktadır. Fruktoz 1-6-bifosfat miktarındaki artış, Cdc25 (Cell Division Cycle 25) proteininin aktivasyonunu sağlayarak, Ras1p/Ras2p GTPaz enzimlerini aktive etmektedir (Peeters ve ark., 2017; Tamaki, 2007).

Ras1p/Ras2 proteinleri Cyr1 (Cyclic AMP Requirement 1) proteinini aktive ederek, cAMP oluşumunu katalize eder. Cyr1p, Gpa1 proteini (G Protein Alpha subunit) içeren ayrı bir yolak tarafından aktiveleştirilmektedir. cAMP molekülünün Bcy1 proteinine bağlanması ile tetramer kompleks çözülerek katalitik birimler (aktif PKA) aktif hale getirilir (Şekil 2.4.) (Santangelo, 2006; Zaman ve ark., 2008).



Şekil 2.4. cAMP-protein kinaz A (PKA) yolağı aktivasyonu (Conrad ve ark., 2014)

2.5.2. TOR Sinyal Sistemi

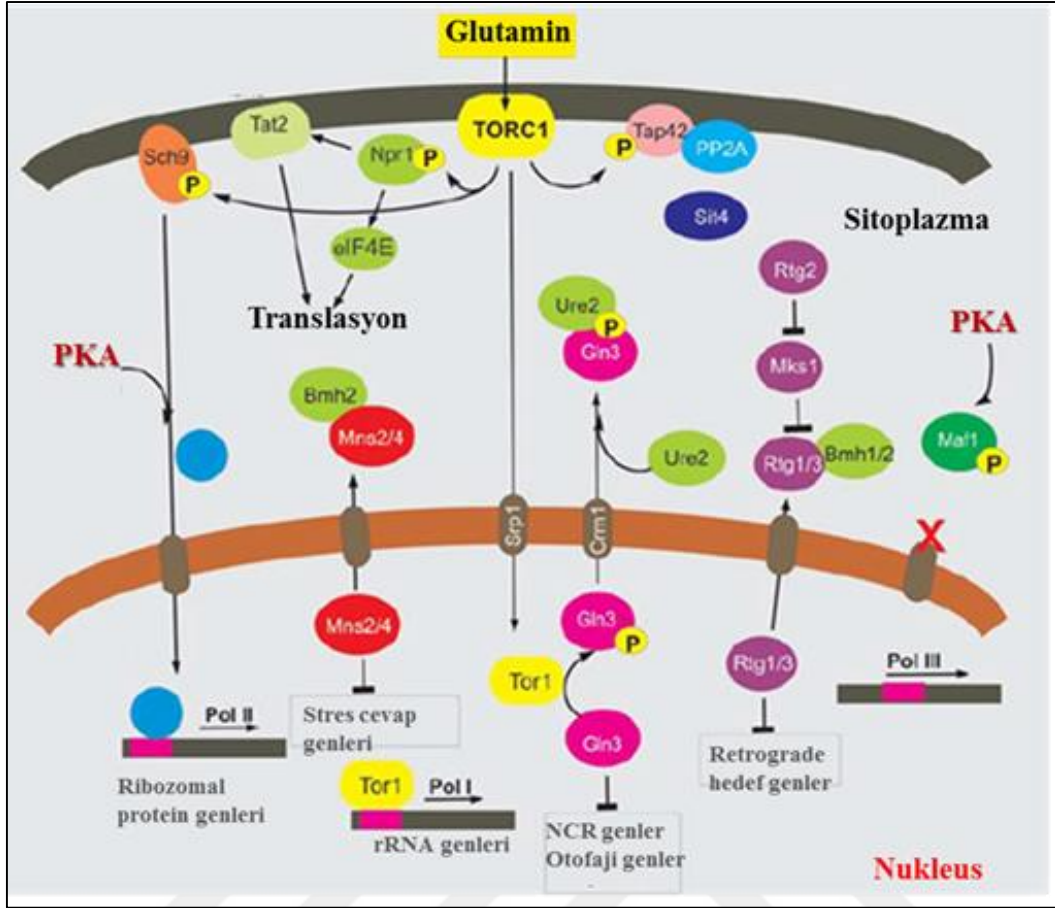
S. cerevisiae maya türünde çeşitli azot kaynaklarının algılanması, hücre içerisine alınması ve hücresel olaylarda kullanılması ile ilişkili sinyal yolları bulunmaktadır. Bu sinyal yollarının denetimi, sitoplazmik protein kinazların aktivasyonu ve metabolik transkripsiyon faktörlerinin varlığı ile sağlanmaktadır (Cooper, 2002). *S. cerevisiae* maya türü tarafından tercih edilmekte olan azot kaynakları amonyum tuzları ve glutamin olup bu azot bileşiklerinin olmadığı durumlarda *S. cerevisiae* farklı azot kaynaklarını kullanmaktadır. *S. cerevisiae*' da zayıf azot kaynakları (prolin, üre, γ -aminobutyrate) ile güçlü azot kaynaklarının (glutamin, asparajin, amonyum) kullanımı ile ilgili gen

ekspresyonları karşılaştırıldığında, ekspresyon seviyelerinde farklılıkların olduğu gözlenmiştir (Scherens ve ark., 2006). Maya üreme ortamında bulunan azot kaynağının miktarına ve kalitesine bağlı olarak azot sinyal iletim sisteminin regülasyonunda sorumlu genler aktive edilmekte veya baskılanmaktadır.

Besin kullanılabilirliğine göre hücre büyümesinin düzenlenmesinde TOR (Target of Rapamycine) sinyal yolağının görevi bulunmaktadır. *S. cerevisiae* maya türünde, Tor1p ve Tor2p olmak üzere iki farklı protein kinaz bulunmaktadır. Tor1p ve Tor2p rapamisine duyarlı TORCI (TOR Complex 1) oluşumuna katılarak hücre büyümesini kontrol etmektedir. TORCI'de, Tor1p ve Tor2p'in yanı sıra Kog1p, Lst8p ve Tco89p bulunmaktadır. TORCII ise Tor2p, Avo1p, Avo2p Avo3p, Bit61p ve Lst8p tarafından oluşturulur ve rapamisin ile baskılanamaz. TORC2, aktin iskelet polarizasyonu yolu ile spatial (uzamsal) büyümeyi düzenlemektedir (Loewith ve ark., 2002; Jacinto ve ark., 2004; Fadri ve ark., 2005).

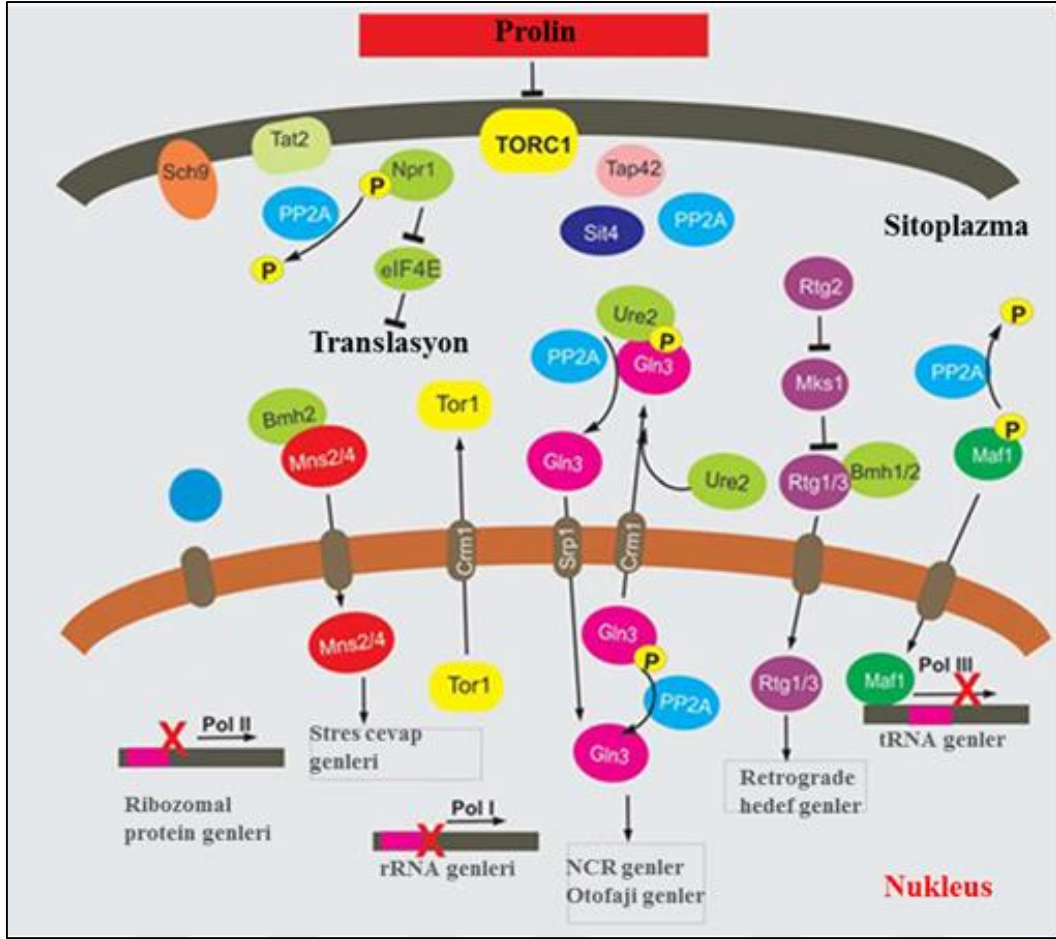
S. cerevisiae'de rapamisin veya azot açlığı varlığında TORC1 inaktivasyonu sonucu, RTG (Retrograde Response Pathway) ve NDP (Nitrogen Discrimination Pathway) sinyal yollarında sorumlu genler indüklenmektedir (Cox ve ark., 2000; Cooper, 2002). TOR sinyal yolağı, GATA transkripsiyon faktörleri (Gat1p, Gln3p) ve glutamin varlığında Gln3p, Ure2p aracılığı ile azot katabolit baskılamasının (NCR) regülasyonunda rol oynamaktadır (Cooper, 2002). Gln3p, NCR tarafından indüklenen genlerin ve SRG (Starvation-Respond Genes) genlerinin aktive edilmesinde görev almaktadır. Azotun varlığı Gln3 proteininin nükleer lokalizasyonunun belirlenmesini sağlamaktadır (Cox ve ark., 2000).

Güçlü azot kaynağında (glutamin veya amonyum tuzları) TOR kinazlar, Gln3p'yi fosforlayarak Ure2p/Gln3p-P kompleksinin meydana gelmesine aracılık ederler. Böylece Gln3 proteininin nükleer lokalizasyonu engellenerek, NCR gen ekspresyonu bloke edilir (Cox ve ark., 2000) (Şekil 2.5.). Gln3 proteininin fosforilasyonu, Snf1p ve TOR tarafından olmak üzere 2 farklı şekilde gerçekleştirilir. TOR tarafından fosforile edilen Gln3p sitoplazmada kalır iken, Snf1p ile fosforile edilen Gln3p'nin nükleer alana geçmesi sağlanır (Rødkær ve Færgeman, 2014). Snf1p, TORCI kompleksinin alt birimleri olan Kog1p ve Tco89p alt birimlerini uyararak, TORCI'in aktivitesini etkilemektedir (Hallett ve ark., 2015). Güçlü azot varlığında, Tor1 kinaz yolu ile aktive olan Bmh2 proteini Msn2 proteinine bağlanarak, bu proteinin sitoplazmada kalmasını sağlar (Inoki ve Guan, 2006). Ayrıca Msn2/Msn4p transkripsiyon faktörlerinin sitoplazmadaki lokalizasyonu, cAMP/PKA tarafından fosforilasyonu ile sağlanmaktadır.



Şekil 2.5. Kuvvetli azot kaynağında TOR sinyal yolağı (Feldmann ve ark., 2012)

Glutamin ve amonyum gibi güçlü azot kaynaklarının yokluğunda ve prolin gibi zayıf azot kaynaklarının varlığında *S. cerevisiae* maya hücreleri, prolin kullanım yolağını (Proline Utilization Pathway-PUP) aktive ederek mitokondride prolinin glutamata dönüşümünü sağlamaktadır. Glutamat, hücrede düşük azot sinyalinin oluşumuna sebep olarak stres ile ilişkili yolların aktive edilmesinde rol oynamaktadır. *S. cerevisiae* maya türünde düşük azot kaynağı (prolin) ve immüno-baskılayıcı ilaç olan rapamisin varlığında TORC1 baskılanır. TORC1 baskılanması sonucu, Sch9p ve Tap42p fosforilasyonu ortadan kalkmaktadır. İnaktif Tap42p, Sit4p'e bağlanmadığından dolayı Sit4p aktif hale gelerek, Gln3 proteinini defosforile eder. Aktif hale gelen Gln3 proteini, sitoplazmadan nukleusa geçer ve NCR gen ekspresyonunu aktive eder (Şekil 2.6.). Protein fosfataz 1 (PP1) enzimi tarafından Msn2/Msn4 proteinleri defosforile edilerek PKA aracılı inhibisyonu ortadan kaldırır. Aktif hale gelen Msn2/Msn4 proteinleri nukleer alana lokalize olarak stres ile ilişkili genlerin aktive edilmesini sağlar (De Wever ve ark., 2005; Sadeha ve ark., 2011).



Şekil 2.6. Zayıf azot kaynağında TOR sinyal yolağı (Feldmann ve ark., 2012)

2.6. *TEC1* Geninin Yapısı ve İşlevi

NTH1 promotor bölgesinde farklı transkripsiyon faktörlerinin bağlanma dizileri bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi TEA/ATTS DNA-bağlanma bölgesine sahip Tec1p (Transposon Enhancement Control 1) transkripsiyon faktörüdür. Tec1p, genellikle Ste12p (STERile 12) transkripsiyon faktörü ile birlikte çalışır. Tec1p, ikinci kromozom üzerinde bulunan *TEC1* geni (YBR083W) tarafından kodlanmaktadır. Tec1p, RNA bağımlı transpozonların pozitif regülasyonunda görev yapmaktadır (Conte ve Curcio, 2000). Sıcaklık, nem, radyasyon gibi stres koşullarında hücrenin stres yanıtının oluşturulmasında görev almaktadır (Madhani ve Fink., 1997).

Tec1 proteini, TCS (TEA/ATTS Consensus Sequence) elementlerine bağlanarak filamentli üremeden sorumlu genlerin transkripsiyonlarını indüklemektedir (Madhani ve Fink., 1997). Filamentli üremeden sorumlu Ste12 proteini, Tec1p ile dimerik kompleks oluşturarak SWI/SNF kompleksine bağlanmaktadır (Madhani ve Fink., 1997; Baur ve ark., 1997; Lo ve Dranginis, 1998). SWI/SNF kompleksi, glukoz miktarına göre aktive ya da

inaktive olmaktadır. Tec1 transkripsiyon faktörü farklı genler üzerinde aktivator veya represör olarak rol oynamaktadır. Tec1 transkripsiyon faktörünün aktivitesi, glukoz miktarına göre, SWI/SNF kompleksi üzerinden düzenlenmektedir. Aynı zamanda bu transkripsiyon faktörünün aktivitesi besin azlığında TOR-SWI/SNF sistemlerinin koordinasyonu ile sağlanmaktadır. Tec1 ve Ste12 proteinleri invazif üreme ve pseudohifsel değişimden sorumludur (Gavrias ve ark., 1996). MAPK sinyal yolağı üzerinden Ste12p/Tec1p kompleksini aktive edilmektedir. Aktif Ste12p/Tec1 proteinleri, Flo11 ekspresyonunu indükleyerek, pseudohifsel gelişim ve invazif üreme aktivasyonunu sağlarlar.

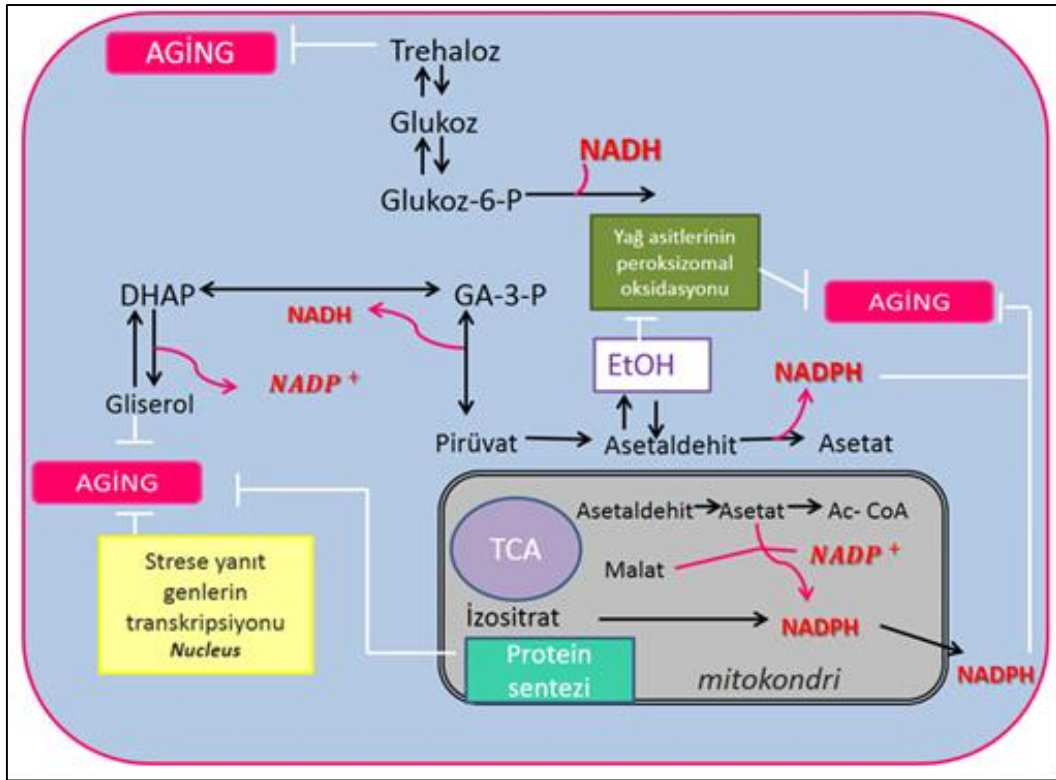
Diploid *S. cerevisiae* maya hücrelerinin pseudohifsel üremesinde ve haploid hücrelerin invazif üremesinde Tec1 transkripsiyon faktörü görev almaktadır (Kim, 2004). Set3C, transkripsiyonel regülasyona katılan bir histon deasetilaz kompleksidir. Set3C dizi homolojisi, mantarlardan memelilere doğru yüksek oranda benzerlik göstermektedir. *Candida albicans* üzerinde yapılan bir çalışmada Set3C'nin hifsel farklılaşmanın baskılayıcısı olarak rol oynadığı ve aktivitesi için cAMP/PKA sinyalizasyonunun gerekli olduğu gösterilmiştir (Hnisz ve ark., 2010). Set3C, morfogenez ile ilişkili genlerde geçici ifade değişikliklerini modüle etmektedir. Set3C'ye bağımlı *BRG1*, *EFG1*, *TEC1* ve *NRG1* düzenleyici devre bulunmaktadır. Bu düzenleyici devrede *NRG1* ve *EFG1* maya hücre fazında ekspresyonları artarken, *TEC1* ve *BRG1* hif fazında ekspresyonları artmaktadır. Dört transkripsiyon faktörü, birbirine bağlı bir ağ oluşturmaktadır. Bu dört faktörün hepsi kendisinden ve diğer üç faktörün düzenlemesinden sorumludur (Hnisz ve ark., 2012).

S. cerevisiae maya hücrelerinde azot açlığı, makromolekül bileşimlerinin değişimine, glukoz sinyal sisteminin baskılanmasına, G₁ fazının baskılanmasında, proteinlerin hidrolizinin artmasına, gliserol sentezlenmesine, fermantasyon kapasitesinin düşmesine ve üremenin farklılaşmasına neden olmaktadır. TOR (Target of Rapamycin) yolağı azot açlığına karşı oluşturulan cevapta önemli rol oynamaktadır. Azot açlığı sonucu oluşan stres koşullarında Tec1 transkripsiyon faktörü MAPK ve TOR sinyal yollarının regülasyonunda rol oynamaktadır (Brückner ve ark., 2011).

S. cerevisiae hücresinde üreme fazlarına göre trehaloz miktarında meydana gelen değişimler bu Tec1 proteinin *NTH1* gen regülasyonunda rol oynadığı düşündürmektedir. Ayrıca yaşa bağımlı olarak hücre içi trehaloz konsantrasyonunun değişim göstermesi maya hücrelerinin kronolojik yaşam süresini uzatmaktadır (Arlia-Ciommo ve ark., 2014). Maya hücrelerinde glukoz miktarının azalması TOR yolağını inhibe ederek stres ile ilişkili genleri aktive eder. Glukoz azlığı ve etil alkol (phantom C kaynağı) varlığında strese karşı

yanıt genleri aktive edilerek kronolojik yaşam süresi artırılmaktadır. Phantom C kaynağından biri olan etil alkol yaşlanma mekanizmasını baskımlarken, hücre dışarısından alınan etil alkol maya apoptotik-benzer yolu aktive ederek yaşlanma mekanizmasını indüklemektedir (Şekil 2.7.). Tec1 transkripsiyon faktörü, MAPK ve TORC1 yolakları üzerinden kronolojik yaşam süresini artırmaktadır (Campos ve ark., 2017).

NTH1 geninin promotor bölgesi Tec1p'nin bağlanması için gerekli TEA/ATTS elementi içermektedir. Daha önce yaptığımız *in silico* çalışmalarda Tec1 transkripsiyon faktörünün *NTH1* promotoruna olası bağlanma bölgelerinin modellenmesi yapılmıştır.



Şekil 2.7. *S. cerevisiae*' de phantom C kaynağının (etil alkol) yaşlanma üzerine olası etkisi (Arlia-Ciommo ve ark., 2014) (modifiye edilmiştir.)

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Mayaların Özellikleri ve Sahip Oldukları Mutasyonlar

BY4741 *S. cerevisiae* maya suşu çalışmada yaban tip maya suşu olarak kullanılmıştır. BY4741 maya suşunun tüm genom dizisi belirlenmiş olup, metabolik yollarda görevli genlerde mutasyon içermediği bilinmektedir. Çalışmada kullanılan *S. cerevisiae* maya suşu ise Y07155 olup, *TEC1* geni mutasyonu taşımaktadır. Yaban tip ve *Atecl* maya suşlarının genotipleri Çizelge 3.1.'de verilmiştir. BY4741 ve Y07155 maya suşları EUROSCARF (European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis) maya koleksiyonundan alınmıştır.

Çizelge 3.1. *S. cerevisiae* maya suşları

<i>S. cerevisiae</i> maya suşları	Genotip	Kaynak
BY4741	<i>MATa, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> (Yaban tip)	EUROSCARF
Y07155	<i>MAT a, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YBR083w: kanMX4</i> (<i>TEC1</i> Delesyonu)	EUROSCARF

3.2. Kullanılan Plazmitler

Çalışmada *NTH1-lacZ* ve *SUC2-LacZ* gen fizyonu içeren YEpl plazmitleri kullanıldı. Araştırmada kullanılan pNL1, Profesör Jean Marie François (Institut National Des Sciences Appliquées, Toulouse, France) tarafından sağlanmıştır. pNL1, *NTH1-lacZ* gen fizyonuna sahip olup, çeşitli büyüme koşullarına yanıt olarak *NTH1* promotorunun aktivitesini belirlemek için kullanılmıştır. Bu plazmitler *S. cerevisiae* hücrelerinde standart ve seçici üreme koşullarında stabil olarak kalmaktadır (Liao ve ark., 1993). YEpl plazmitlerinin yapısında Ori (*Escherichia coli* replikasyon orjini), LacZ (β -galactosidase reporter gen), AmpR (ampisilin direnç geni), URA3 (maya için seleksiyon marker), 2 μ ori (*S. cerevisiae* replikasyon orjini) bulunmaktadır (Rose ve ark., 1990). *NTH1-lacZ* gen fizyonu içeren YEpl plazmitinde, 770bp uzunluğunda *NTH1* promotor bölgesi bulunmakta olup, transkripsiyon regülasyonu için kontrol bölgeleri bulunmaktadır (Parrou ve François, 1997). *SUC2* geni stres ile aktive edilmemektedir. Dolayısıyla *SUC2-LacZ* YEpl plazmiti

kontrol olarak kullanılmıştır.

3.3. Maya Suşlarının Büyüme Eğrileri

BY4741 ve Y07155 *S. cerevisiae* maya suşları 150 ml'lik urasil bulunan YNBD-HLM (%0,16 Yeast Nitrogen Base + %2 Dextrose + %0,2 Histidine + %0,3 Leucine + %0,2 Methionine + %0,2 Uracil + % 0,5 Ammonium sulfate) ortamına aktarıldı. YNBD-HLMU kültür ortamından 48 saat boyunca 2 saatlik sürelerle hücre örneği alınarak spektrofotometrede OD₆₀₀ absorbans değerleri ölçüldü. Çalışmanın sonunda BY4741 ve Y07155 maya suşlarının zamana karşı OD₆₀₀ değerine karşılık gelen hücre sayısına bağlı olarak ikilenme süreleri (Doubling Time, Dt) ile spesifik üreme oranlarının (Specific Growth Rate, μ) grafikleri oluşturuldu.

3.4. Plazmitlerin Amplifikasyonu ve Maya Suşlarına Hücrelerine Transformasyonu

NTH1-LacZ ve *SUC2-LacZ* YE_p plazmitleri MgCl₂-CaCl₂ metodu ile XL1-Blue *E. coli* hücrelerine transforme edildi (Ausubel ve ark., 1993). XL1-Blue *E. coli* transformantlar Ty^{amp} (%2,4 Trypton Yeast Extract Agar + Ampisilin (35 mg/ml)) petrilere aktarıldı. Üreme gözlenen transformant *E. coli* hücrelerinden tek koloni seçimi yapılarak ampisilin içeren NB (%2,5 Nutrient Broth) besin ortamına aktarıldı. Transformant *E. coli* hücreleri 37 °C'de yaklaşık 16-18 saat inkübasyona bırakıldı. Plazmit saflaştırma kiti (GeneJet Plasmid Kiti (#K050-Fermentas)) kullanılarak, transformant *E. coli* hücrelerinden *NTH1-LacZ* ve *SUC2-LacZ* plazmitleri saflaştırıldı. Plazmit purifikasyonu ile elde edilen plazmitler, TE besin ortamında son hacim 100 μ L olacak şekilde -20 °C'de saklandı.

Çalışmamızda kullanılan *NTH1-LacZ* ve *SUC2-LacZ* gen füzyonu plazmitleri yaban tip ile *Δtec1 S. cerevisiae* suşlarına LiOAc/SS-DNA/PEG metodu kullanılarak transform edildi (Gietz ve ark., 2002). Yaban tip ve *Δtec1* maya suşları 50 μ l YPD (%1 Yeast Extract + %2 Pepton + %2 Dextrose) üreme ortamında 30°C'de 120 rpm/dk hızdaki çalkalamalı inkübatörde 17 saat üretildi. Hücreler OD₆₀₀ absorbans değeri 0.2 olacak şekilde YPD taze üreme ortamına aktarılarak logaritmik aşamaya (OD₆₀₀ değeri yaklaşık 0.8-1.0) kadar 30°C'deki çalkalamalı inkübatörde üretildi. Logaritmik aşamadaki 50 ml'lik hücrelerden 25ml örnek alınarak 6000 rpm'de 5 dk çöktürüldü (Hettich ZENTRIFUGEN 320R). Hücreler saf su ile yıkamaları yapıldıktan sonra 1.5 ml'lik mikrotüplere aktarıldı. 12000 rpm'de 5 dk çöktürülüp süpernatant kısmı atıldı. Pellet üzerine 240 μ l (50% w/v), 36 μ l

1.0M LiOAc, 5 µl HS-DNA, 3 µl plazmit, 34 µl saf su koyuldu. Hücre solüsyonu dikkatli bir şekilde homojen hale gelene kadar karıştırıldı (BioCote Stuart). Hücre süspansiyonu 20 dk, 42 °C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler 12000 rpm’de 30 sn çöktürüldü. Hücre pelleti üzerine 100 µl saf su içerisinde resuspend edildi.

Hücre pelleti YNBD-HLM urasil içermeyen katı besi ortamına geçirildi 30 °C’da 3-5 gün inkübe edildi. Petrilere üreme gösteren transformant maya kolonilerinden bir tane seçilerek taze YNBD-HLM katı besiyeri ortamlarına çizgi ekimleri yapıldı ve aynı üreme koşullarında üretildi. Transformant maya suşlarını daha sonra β-Galaktozidaz enzim aktivite belirlenmesinde kullanıldı.

3.5. Transformant Maya Suşlarının Üreme Şartları ve Örnek Alınması

S. cerevisiae transformant maya hücreleri YNBD-HLM sıvı üreme ortamlarında 120 rpm 30 °C’da bir gece inkübe edildi. Gecelik maya kültürlerinden bir miktar hücre taze sıvı üreme ortamına, OD₆₀₀ absorbans 0,2 olacak şekilde kültür ortamına aktarıldı ve inkübe edildi. Logaritmik aşamaya gelen hücre kültürlerinden (OD₆₀₀ ~ 0,8-1,0) örnekler toplandı. Kalan kültür ortamı 3 eşit gruba ayrılarak farklı azot ortamlarına aktarıldı. Birinci grup hücreler prolin bulunduran YN (%0,16 Yeast Nitrogen Base + 2Dextrose + %0,2 Histidine + %0,3 Leucine + %0,2 Methionine + % 0,1 prolin) ortamında, ikinci grup hücreler son konsantrasyonu % 0,1 olacak şekilde glutamin içeren YN besin ortamında, üçüncü grup hücreler ise amonyum sülfat içeren besin ortamında 4 saat boyunca inkübe edildi. Elde edilen hücre kültürlerinden örnek alınarak, β-galaktozidaz enzim yöntemiyle gen ekspresyon seviyeleri, Lowry metodu ile hücre içerisindeki total protein miktarı saptandı. Trehalaz enzimatik metod ile hücre içerisinde biriktirilen trehaloz miktarı saptandı. Tüm deneysel çalışmalar en az 3 kez tekrar yapılarak standart sapma değerleri belirlendi.

3.6. β-Galaktozidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Çalışmamızda β galaktozidaz aktivitelerinin hesaplanması için ayrılan transformant maya hücreleri santrifüj ile çöktürüldü. Elde edilen pelet kısmı stresil distile su ile yıkandı. Transformant maya hücreleri üzerine 0,2 ml breaking buffer (EK 1) eklendi. Daha sonrasında hücre süspansiyonlarına sırasıyla 20 µl %0,1 SDS ve 20 µl Kloroform eklenerek hücresel lizatlar oluşturuldu. Hazırlanan hücresel lizatlardan 30 µl alınarak, 970 µl Z-Buffer (Ek 1) içerisine eklenerek 30 °C’da inkübe edildi. Süspansiyon üzerine enzimatik aktiviteyi belirlemek için 200 µl ONPG (Z-Buffer içerisinde hazırlanmış %0,4’lük 2-Nitro-B-D-galactopyranoside) eklenerek, reaksiyonun başlama zamanı

kaydedildi. Renk dönüşümü ile birlikte, 0,5 ml 1M Na₂CO₃ eklenerek enzimatik reaksiyonunun durdurulma süresi saptandı. Elde edilen sarı renkli çözelti OD₄₂₀ absorbans değerinde ölçümü yapılarak kaydedildi. β-galaktozidaz aktivitelerinin hesaplaması, β-Galaktozidaz Unitesi dakikada hidroliz edilen nmol ONPG/mg toplam protein olarak verilmiştir (Ausubel ve ark., 1993; Guarente ve Ptashe, 1981). Transformant hücrelerin hücre içerisindeki total protein miktarı Lowry yöntemi ile belirlendi (Lowry ve ark., 1951). Hücresel lizatlar 0,02 ml alınarak 0,18 ml steril distile sui le birlikte süspanse edildi. Daha sonra oda sıcaklığında hücresel lizatların üzerine 1 ml C-Buffer (Ek 1) eklenerek 10 dk, sonrasında ise 0,1 ml Folin eklenerek 30 dakika süresince bekletildi. Reaksiyon sonucunda meydana gelen mavi-yeşil rengin miktarı spektrofotometrede OD₇₅₀ değeri saptandı.

3.7. Trehaloz Miktarının Saptanması

1997 yılında Parrou ve François tarafından geliştirilmiş olan metodun kullanılması ile normal koşul ve stres koşulları varlığında *S. cerevisiae* maya hücrelerinde depolanmış olan trehalozun enzimatik tayini yapıldı. Farklı üreme koşullarından alınan transformant maya hücreleri santrifüj edilerek, steril soğuk sui le iki defa yıkama işlemi yapıldı. Hücrelerin yaş ağırlıkları ölçülerek üzerlerine 0,25 ml 0,25M Na₂CO₃ çözeltisi eklenerek 2 saat süresince 95-100 °C'da inkübe edildi. Kaynama bittikten sonra hücre lizatlarının üzerine 0,15 ml 1 M Asetik asit ve 0,6 ml 0,2 M NaOAc eklenildi. Transformant maya hücrelerinin içerisinde biriktirilen trehaloz miktarını belirlemek için 1,5mU trehalaz enzimi (Sigma, 8778) eklenerek 18 saat süresince 37 °C'da inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon sonunda açığa çıkan glukoz miktarı GOD (Glukoz Oksidaz Peroksidaz) yöntemiyle belirlendi. Hücresel lizatların üzerine GOD enzimi eklenerek 15 dk süresince 37 °C'da inkübe edildi. GOD yöntemi kullanılarak belirlenen OD₅₄₆ değerleri, glukoz standardının vermiş olduğu absorbans değerine göre hesaplanarak, hücresel lizatların içerdiği glukoz miktarı glukoz standart çözeltisinin içerdiği glukoz miktarına göre maya yaş ağırlığının üzerinden normalize edilerek, miligram hücre başına biriktirilen mikro gram glukoz (µg glukoz/mg yaş ağırlığı) olarak saptandı.

3.8. Biyoinformatik Çalışmalar

3.8.1. Saccharomyces Genome Database (SGD)

SGD (Saccharomyces Genome Database) veri tabanı *S. cerevisiae* hakkında bilgilerin bulunduğu kapsamlı bir veri tabanıdır. *S. cerevisiae* ve daha yüksek organizmalardaki sekans ve gen ürünleri arasındaki fonksiyonel ilişkileri ve bunlarla ilgili

verileri incelemek için analiz araçları ile birlikte çalışmaktadır. Yaptığımız çalışmada SGD vasıtası ile, *NTH1* geninin üzerinde bulunduğu kromozom belirtildi (www.yeastgenome.org).

3.8.2. National Center for Biotechnology Information (NCBI)

NCBI, 1988 yılında kurulmuş geniş bir veri tabanıdır. BLAST, ENTREZ, MEDLINE ve OMIM hizmetleri sayesinde biyoinformatik çalışmalara olanak sağlamaktadır. Çalışmamızda kullanacağımız TEA Domain bölgesine sahip çeşitli canlılardaki homolog proteinlerine ilişkin blast sonuçları NCBI webserver programı kullanılarak elde edilmiştir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.8.3. JASPAR CORE Database

JASPAR CORE veritabanı, ökaryotlar için deneysel olarak tanımlanmış transkripsiyon faktörlerinin olası DNA bağlanma bölgeleriyle ilişkili profilleri içermektedir (jaspar.genereg.net). JASPAR CORE veritabanı sayesinde Tec1 transkripsiyon faktörünün olası DNA bağlanma bölgesi saptandı (Jaspar Core: IDMA0406.1)(http://jaspar.binf.ku.dk/cgi-bin/jaspar_db.pl?ID=MA0406.1&rm=present&collection=CORE).

3.8.4. VMD-Visual Molecular Dynamics

VMD, Theoretical and Computational Biophysics Group tarafından geliştirilmekte olup ücretsizdir. VMD, proteinler, nükleik asitler, lipid tabakalı yapılar gibi biyolojik sistemlerin modellenmesi, görselleştirilmesi ve analizi için tasarlanmıştır. VMD, Protein Veri Bankası (PDB) dosyalarını görüntüleyebilmek için kullanılmaktadır (www.ks.uiuc.edu/Research/vmd). VMD, moleküllerin çok çeşitli biçimlerde görüntülenmesi ve renklendirilmesi için kullanılmaktadır. Bu program vasıtası ile Tec1 proteini üzerindeki DNA bağlanma bölgesi görselleştirildi.

3.8.5. Megasoftware 7.0 (MEGA 7)

Sudhir Kumar ve arkadaşları tarafından 2016 yılında 7.0 sürümü geliştirilen ve ücretsiz sunumu olan bir programdır. Türler ve populasyonlardaki DNA ve protein hizalanması, evrimsel benzerlikler ve farklılıkların saptanması gibi kapsamlı araştırma sunmaktadır. Tez çalışmamızda Tec1 proteininin sahip olduğu TEA/ATTS DNA bağlanma bölgesini, farklı fungi türleri ve diğer canlılarda homolog olan proteinler karşılık gelen

korunmuş sekanslar saptanmıştır (www.megasoftware.net).

3.8.6. I-TASSER ve NPDock Webserverları

SGD veri tabanından alınan 486 aminoasitlik Tec1p dizisi ve Tec1p'nin TEA/ATTS DNA bağlanma bölgesine denk gelen 75 amino asitlik dizisi belirlendi. Iterative Threading ASSEMBLY Refinement (I-TASSER) (zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER) programı, proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının tahmini olarak belirlenmesinden sorumludur. I-TASSER programı ile Tec1 proteinin olası 3 boyutlu homoloji modelleri saptandı. *NTH1* promotorunda, Tec1p TEA/ATTS-DNA bağlanma elementleri 3D-DART webserver programına gönderilerek pdb formatı haline dönüştürüldü. NPDock, RNA-protein ve DNA-protein kompleks yapılarının modellenmesi için kullanılan web sunucusudur. I-TASSER programından gelen Pdb dosyaları ile 3D-DART webserver programından gelen Pdb dosyaları Nucleic acid-Protein Dock (NPDock-Genesilico.pl) sitesine gönderilerek olası bağlanma modelleri oluşturuldu. Elde edilen modeller VMD (Visual Molecular Dynamics) programı ile görsel hale getirildi.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Maya Suşlarının Üreme Eğrileri (Growth Curve) ve İkilenme Süreleri

Çalışmada kullanılan maya suşlarının (wt ve *Δtec1* mutant) O/N (bir gece boyunca) kültürlerinden urasil içeren YNB-HLM taze sıvı besiyerlere OD₆₀₀ değeri 0,2 olacak şekilde geçirildi ve durağan zamanın ortalarına ulaşınca kadar yaklaşık 2 gün 30 °C’de 120 rpm/dk çalkalama ile üretildi. Bu sürenin başından sonuna kadar her iki saatte bir 1ml örnek alınarak OD₆₀₀ absorbans değerleri belirlendi. Yaban tip maya suşu için Şekil 4.1.’de, *Δtec1* maya suşu için Şekil 4.2.’ verildi. Maya suşlarının ikilenme süreleri ve spesifik üreme oranları yaban tip maya suşu için Şekil 4.3. ve *Δtec1* maya suşu için Şekil 4.4. verildi.

Mikroorganizmaların büyümesi belirli kurallara uymaktadır. Bu nedenle bazı koşullar altında inkübasyon sonunda hücre sayısı ve biyokütle miktarı hakkında tahminde bulunulabilmektedir. Bakteriler, mayalar ve küflerin farklı üreme eğrileri bulunmaktadır. *S. cerevisiae* maya suşunun zamana bağlı OD₆₀₀ değerleri saptanmıştır (web kaynakça 2). Spesifik büyüme oranı (μ), birim zamanda toplam hücre sayısına kıyasla hücre miktarında meydana gelen artıştır. Spesifik büyüme hızı ne kadar yüksekse, hücrelerin büyüme hızında o kadar yüksektir. Mikroorganizmalar logaritmik evrede üssel çoğalırlar. Buna göre logaritmik evredeki mikroorganizma gelişim hızı;

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \frac{dN}{dt} = \mu N \quad N=\text{Hücre sayısı.} \quad (4.1)$$

Mikroorganizmaların ikilenme süresi, hücre sayısındaki artışın 2 katına ulaşması için geçen süre (t) olarak tanımlanmaktadır. Hücre sayısının deneysel olarak belirlenmesi zor olmasından dolayı hücre büyümesi biyokütle artışı olarak hesaplanır (web kaynakça 3).

$$\ln. X_1 - \ln. X_0 = \mu (t_1 - t_0) \quad (4.2)$$

$$tD = t_1 - t_0 \quad (4.2a)$$

Denklemin yerine konulursa;

$$\ln \frac{2X}{X} = \mu \cdot tD \quad (4.2b)$$

$$\ln 2 = \mu \cdot tD \quad (4.2c)$$

$$tD = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (4.2d)$$

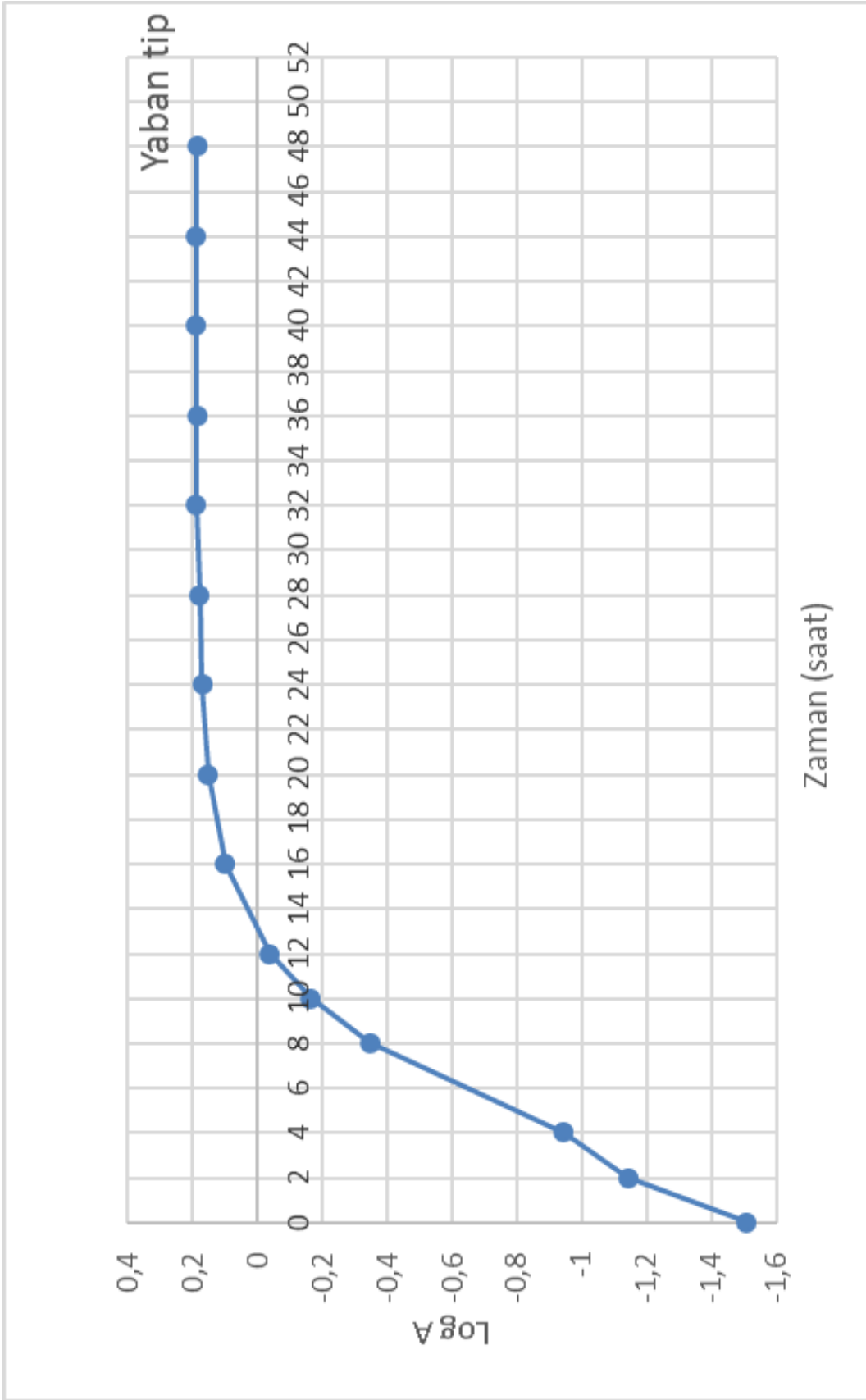
μ = Spesifik üreme hızı

X= Hücre konsantrasyonu (g/L)

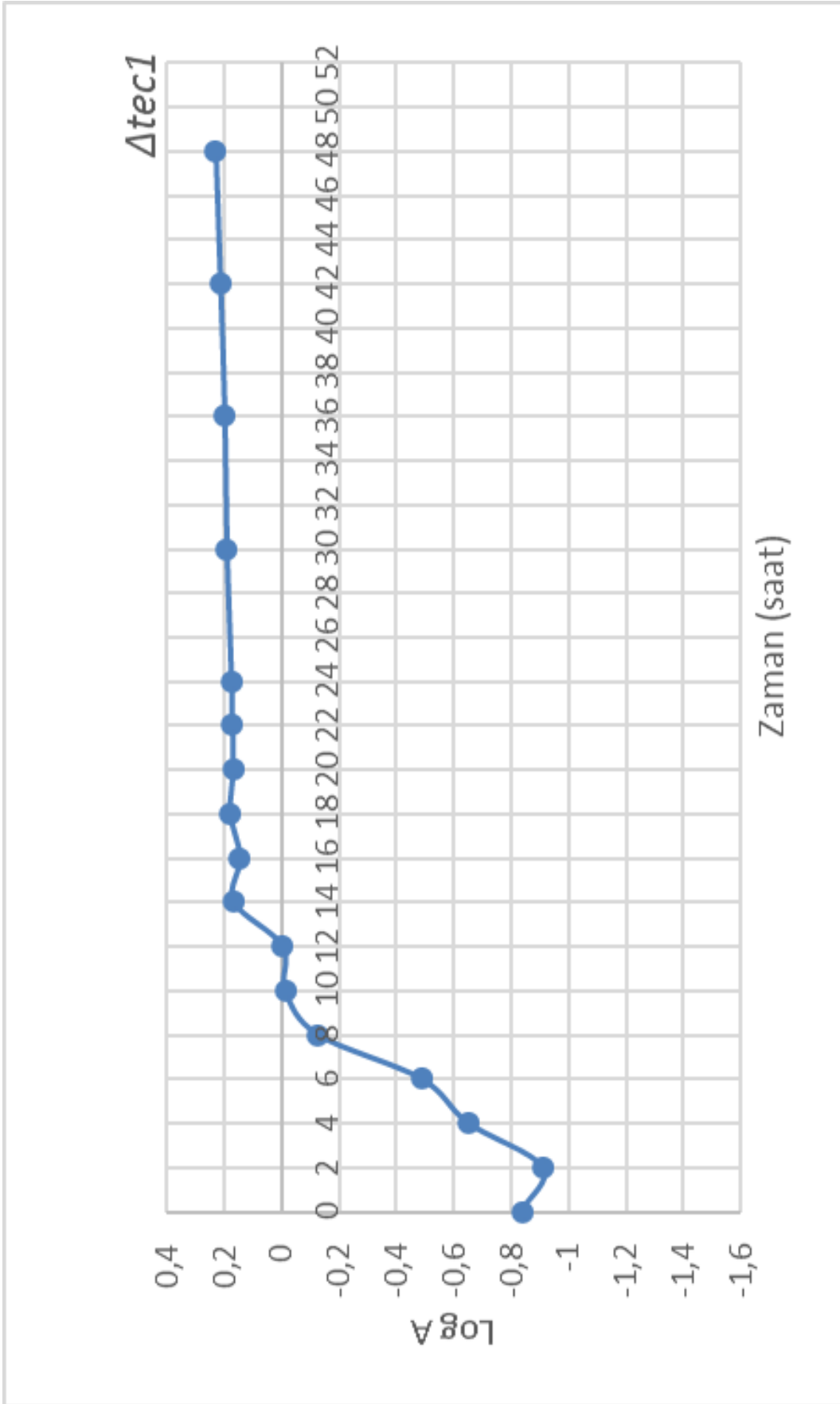
t= Süre (saat)

Mikroorganizmaların üreme eğrileri ile spesifik üreme hızlarının bağlantısı; Lag fazda spesifik üreme oranı sıfırdır. Uyum fazında sürekli artar. Logaritmik fazda sabittir ($\mu = \mu_{\max}$). Durağan fazda ise bu oran sifira yakındır.

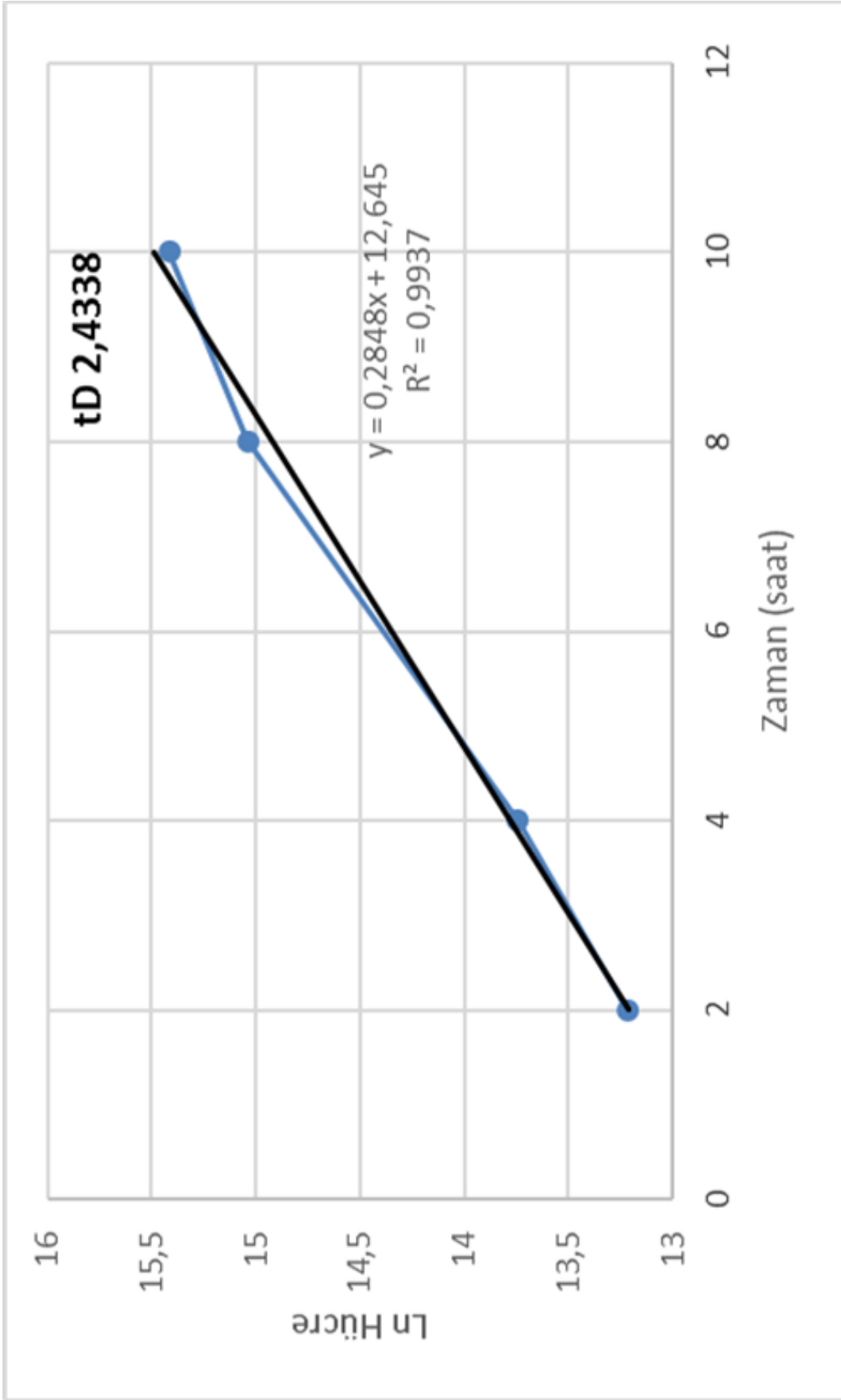
Buna göre yaban tip maya suşunun ikilenme süresi (doubling time, tD) $2,44 \pm 0,2$ (2 saat 26 dakika \pm 12 dakika) ve spesifik üreme oranı (specific growth rate, μ) 0,2848 olarak belirlendi. Mutant maya suşunun ikilenme süresi $2,70 \pm 0,2$ (2 saat 42 dakika \pm 12 dakika) ve spesifik üreme oranı 0,2564 olarak hesaplandı.



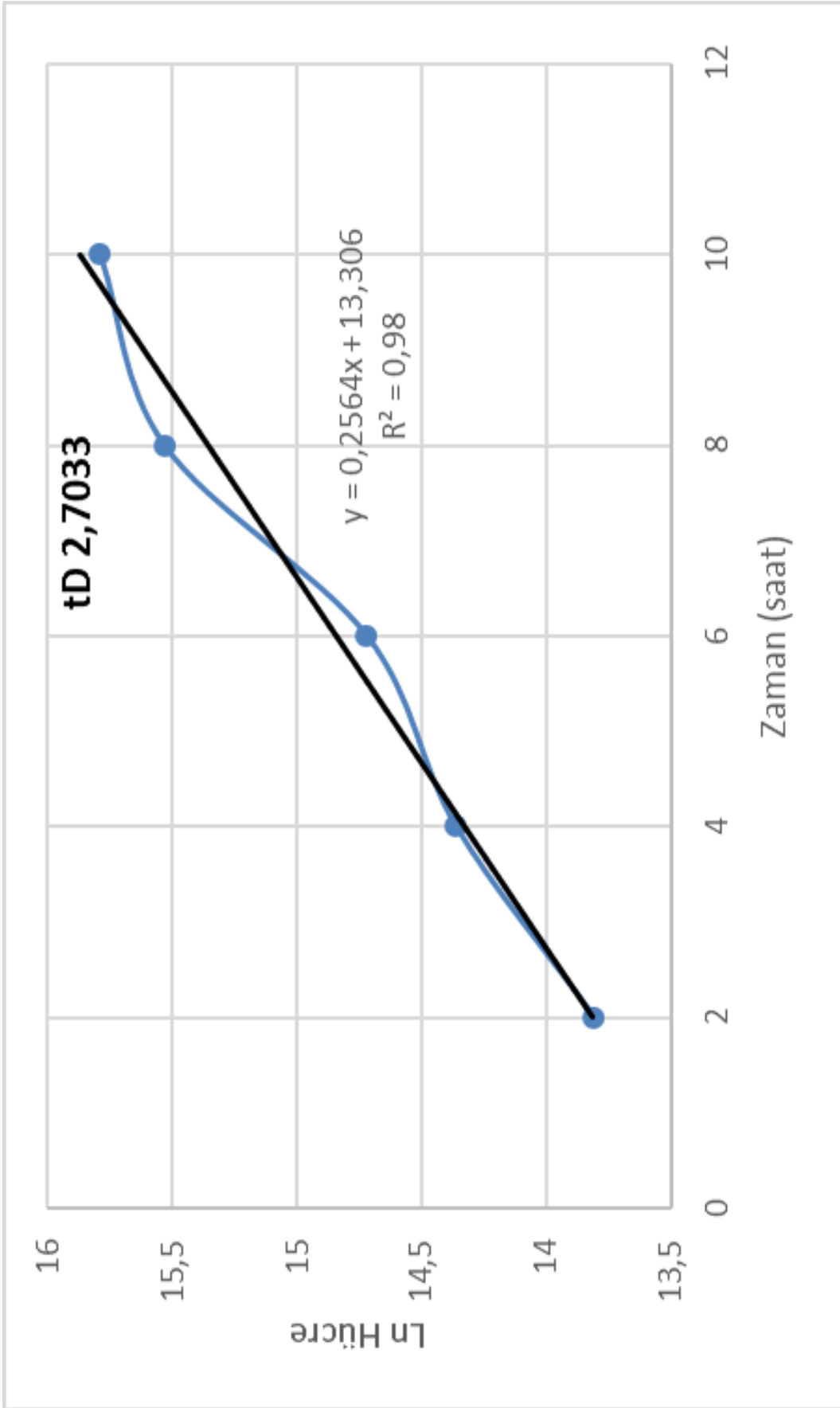
Şekil 4.1. Yaban tip maya suşunun üreme grafiği



Şekil 4.2. $\Delta tec1$ mutant maya şuşunun üreme grafiği



Şekil 4.3. Yaban tip maya suşundaki ikilenme süresi ve spesifik üreme oranını



Şekil 4.4. *Atecl* maya suşunun ikilenme süresi ve spesifik büyüme oranını

4.2 Tec1 Transkripsiyon Faktörünün *NTH1* Gen Ekspresyonuna Etkisi

S. cerevisiae hücrelerinde *NTH1* gen ekspresyonu farklı stres koşullarında aktive edilmektedir. Bu aktivasyonda *NTH1* promotor bulunan STRE elementlerinin rolü büyüktür. Msn2/4p transkripsiyon faktörleri, STRE elementlerine bağlanarak *NTH1* transkripsiyonunun aktivasyonundan sorumludur. Yaptığımız *NTH1* promotor bölgesinin biyoinformatik çalışmasında, *NTH1* promotorunda farklı transkripsiyon faktörlerinin bağlanabilmesi için cis-elementlerinin bulunduğu belirlenmiştir.

Analiz sonucunda *NTH1* promotorunda, özellikle azot açlığında MAPK ve TOR sinyal yollarının düzenlenmesinde rol alan Tec1 transkripsiyon faktörünün 5 tane (124-128 bç (3'-CATTC-5'), 134-138 bç (3'-CATCG-5'), 140-144 bç (3'-CATCG-5'), 429-433 bç (3'-CATTC-5') ve 634-638 bç (3'-CATCG-5')) bağlanma dizisinin bulunduğu tespit edildi. Tec1 proteinin *NTH1* transkripsiyonuna etkisini belirlemek için *NTH1*-LacZ gen füzyonu içeren yaban tip ve *Δtec1* transformant maya hücreleri logaritmik aşamaya kadar YNBD-HLM üreme ortamında üretildi ve hücreler farklı azot kaynaklarına geçirilmeden önce kültürden örnekler alınarak *NTH1* gen ekspresyon seviyesi beta-galaktozidaz enzim aktivitesi ölçülerek belirlendi. Beta galaktozidaz enzim ünitesi 1 dakika içerisinde 1mg total proteinde hidrolize edilen nanomol ONPG miktarı olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1.'de verildi.

Yaban tip maya hücrelerinde beta galaktozidaz seviyesi $76,8 \pm 8,6$ ünite, *Δtec1* maya hücrelerinde ise $551,6 \pm 10,1$ ünite olarak belirlendi. Mutant maya hücrelerinde *NTH1* transkripsiyonunda yaklaşık 7 kat artış gözlemlendi.

Çizelge 4.1. Stresiz koşullarda Tec1 proteinin *NTH1* transkripsiyonuna etkisi

Gen Füzyonu	Ortalama beta- galaktosidaz aktivitesi (\pm SD)*	
	Yaban Tip	<i>Δtec1</i>
<i>NTH1</i> -LacZ	$76,8 \pm 8,6$	$551,6 \pm 10,1$
<i>SUC2</i> -LacZ	$0,4 \pm 0,0$	$0,5 \pm 0,0$

* β -galaktozidaz ünitesi nmol ONPG/dak/mg protein

\pm SD: standart sapma

Bu durum normal şartlarda çevresel stresin olmadığı, karbon ve azot kaynağının yeterli olduğu durumda, Tec1 proteinin *NTH1* transkripsiyonu için gerekli olduğunu göstermektedir.

S. cerevisiae maya türü glukoz, galaktoz vb. gibi farklı fermentatif karbon kaynaklarını kullanabilmekte olup öncelikli olarak glukozu tercih etmektedir. Glukoz karbon kaynağında alternatif karbon kullanımı için gerekli tüm genler baskılanmaktadır. Bu durum mayalarda glukoz baskılaması (Glucose Repression) olarak bilinmektedir.

S. cerevisiae maya türünde sukrozun hidrolizinden sorumlu olan invertaz enzimi için kodlu *SUC2* gen ekspresyonunda glukoz baskılamasına uğramaktadır (Ronne, 1995). *SUC2* geninin transkripsiyonel regülasyonunda karbon kaynağı ve miktarı etkin role sahipken, azot miktarı veya kaynağının etkisi olmadığı bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamızda *SUC2* promotorunu taşıyan plazmit kontrol amaçlı kullanılmıştır. *NTH1-LacZ* fizyonu içeren maya suşları ile yapılan tüm çalışmalar *SUC2-LacZ* fizyonu taşıyan yaban tip ve *Atec1* maya suşlarında tekrar edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Yaban tip maya suşunda beta galaktozidaz aktivitesi $0,4\pm 0,0$ ünite, *Atec1* maya suşunda ise $0,5\pm 0,0$ ünite olarak belirlendi.

4.3. Farklı Azot Kaynaklarının *NTH1* Gen Ekspresyonuna Etkisi

S. cerevisiae maya hücrelerinde *NTH1* gen ekspresyonu TOR sinyal yolağı üzerinden kontrol edilmektedir. *NTH1* promotorunda bulunan STRE dizilerine bağlanarak *NTH1* transkripsiyonunu Msn2/4 proteinleri aktive etmektedir. Msn2/4 transkripsiyon faktörlerinin aktiviteleri ise cAMP/PKA ve TOR sinyal yolları ile kontrol edilmektedir. Kuvvetli azot kaynağında TOR sinyal yolu aktifleşerek Msn2/4 transkripsiyon faktörlerinin sitoplazmaya geçmesini ve inaktif olarak kalmasını sağlar. Böyle *NTH1* gen ekspresyonu aktifleştirilemez.

Düşük azot kaynağında ve rapamisin varlığında Tor1 kinaz inaktifleşir ve Msn2/4 proteinleri nukleusa geçerek *NTH1* geni gibi promotorlarında STRE içeren genlerin transkripsiyonlarını aktive eder. Bu nedenle öncelikli olarak çalışmamızda yaban tip maya hücrelerinde kuvvetli ve zayıf azot kaynaklarında *NTH1* gen ekspresyon seviyeleri belirlendi.

Çalışmamızda yaban tip maya hücreleri YNBD-HLM içeren üreme ortamında logaritmik aşamaya ($OD_{600} = 0,8-1,0$) kadar üretildi. Birinci kısımdaki maya hücreleri aynı koşul maya kültürleri 3 eşit parçaya bölünerek, birinci grup aynı şartlarda 4 saat üremeye bırakıldı. İkinci ve üçüncü parçalar ise çöktürelerek toplandı ve steril soğuk su ile yıkandı. İkinci parçadaki maya hücreleri glutamin içeren üreme ortamına, üçüncü grup ise prolin içeren üreme ortamına geçirilerek 4 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda amonyum sülfat, glutamin ve prolin azot kaynaklarını içeren hücre kültürlerinde β -galaktozidaz enzim

aktivitesi belirlendi. Tüm deneyler en az üç tekrarlı olarak yapıldı ve standart sapma değerleri hesaplandı. Tüm deneylerde standart sapma değerleri %20'nin altında bulundu.

Yaban tip maya suşunda kuvvetli (amonyum sülfat ve glutamin) ve zayıf (prolin) azot kaynaklarında elde edilen *NTH1* gen ekspresyon seviyeleri Çizelge 4.2.'de verildi. Ayrıca *SUC2-LacZ* gen fizyonu içeren yaban tip maya suşunda da farklı azot kaynaklarında *SUC2* gen ekspresyonu belirlenerek Çizelge 4.2.'de sunuldu.

Transformant maya hücreleri logaritmik aşamaya kadar ve sonrada 4 saat süresince amonyum sülfat içeren üreme ortamında üretildi. Bu ortamda ölçülen β -galaktozidaz değerleri $150\pm 2,8$ ünite belirlendi. AS içeren ortamdan glutamin içeren ortama geçirilen yaban tip maya hücrelerinde *NTH1* transkripsiyonun yaklaşık 2 kat, prolin içeren ortama geçirilen maya hücrelerinde ise yaklaşık 5 kat artma gözlemlendi. Prolin içeren üreme ortamında β -galaktozidaz enzim aktivitesi $626\pm 14,6$ ünite, glutamin içeren üreme ortamında β -galaktozidaz enzim aktivitesi $289,3\pm 6,6$ ünite olarak hesaplandı. Zayıf azot kaynağında Tor sinyal sisteminin baskılanması ve Msn2/4 proteinlerinin *NTH1* transkripsiyonunu 5-6 kat arttırdığı belirlendi. Gözlenen bu durum beklenen bir sonuç olup literatür ile de uyumludur.

Çizelge 4.2. Farklı azot kaynaklarının *NTH1* gen ekspresyonuna etkisi

Gen Fizyonu	Ortalama beta- galaktosidaz aktivitesi (\pm SD)*		
	Amonyum Sülfat	Glutamin	Prolin
<i>NTH1-LacZ</i>	$150\pm 2,8$	$289,3\pm 6,6$	$626\pm 14,6$
<i>SUC2-LacZ</i>	$0,1\pm 0,0$	$0,4\pm 0,0$	$0,1\pm 0,0$

* β -galaktozidaz ünitesi nmol ONPG/dak/mg protein

\pm SD: standart sapma

SUC2-LacZ gen fizyonu içeren yaban tip maya hücrelerinde farklı azot kaynaklarında ölçülen β -galaktozidaz enzim aktiviteleri Çizelge 4.2.'de verildi. Farklı azot kaynaklarının *SUC2* promotor aktivasyonunda etkili olmadığı görülmektedir.

4.4. Tec1 Transkripsiyon Faktörünün Farklı Azot Kaynaklarında *NTH1* Transkripsiyonuna Etkisi

S. cerevisiae maya türünde TEA transkripsiyon faktörü Tec1p, farklı besinlere ve feromonlara karşı oluşturulan cevapta görev almaktadır. Tec1 proteininin stabilitesi TOR sinyal yolağı üzerinden sağlanmaktadır. Yüksek miktarda rapamisin uygulaması TOR

sinyal yolağının baskılanması ve hücrelerin G₁ safhasında durmasına neden olurken, düşük dozda uygulanan rapamisin filament oluşumunu engelleyerek mayanın kronolojik yaşam süresini uzatmaktadır (Barbert ve ark., 1996; Powers ve ark., 2006). TOR sinyal yolağında görev alan Sch9 protein kinazın replikatif yaşam uzunluğunu ve kronolojik yaşam uzunluğunu kontrol ettiği bilinmektedir (Kaeberlin ve ark., 2005). Tec1 transkripsiyon faktörü G₁ siklinlerin aktivatörüdür ve G₁ siklinler besin açlığında baskılanmaktadır. Ayrıca Tec1 proteini kronolojik yaşam uzunluğunu kontrol etmektedir (Brückner ve ark., 2011).

S. cerevisiae maya türünde trehaloz miktarının hücre döngüsünün G₁ safhasında kalma süresiyle doğru orantılı olarak arttığı belirlenmiştir (Paalmen ve ark., 2003). TOR sinyal sisteminin inhibisyonu Cln3p translokasyonunu azaltarak G₁'de durmasını ve depo karbonhidratları biriktirmesini sağlamaktadır. Besin miktarına ve çeşidine göre TOR sinyal yolağı Sch9 üzerinden Tec1p aracılığıyla hücre döngüsünü kontrol etmektedir. Bu nedenle çalışmamızda Tec1 transkripsiyon faktörünün TOR sinyal sistemine bağlı olarak *NTH1* gen ekspresyonuna etkisi belirlendi. Bu amaçla *Δtec1* maya hücreleri Bölüm 4.3.'te açıklandığı gibi yaban tip maya hücreleri gibi üretilerek β-galaktozidaz enzim aktiviteleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3.'de gösterildi.

Çizelge 4.3. Tec1 proteinin farklı azot kaynaklarının *NTH1* gen ekspresyonuna etkisi

Gen Fizyonu	Ortalama beta- galaktosidaz aktivitesi (±SD)*		
	Amonyum Sülfat	Glutamin	Prolin
<i>NTH1</i> -LacZ	534,2±56,2	995,6±138,8	1177,7±42,0
<i>SUC2</i> -LacZ	0,3±0,0	0,4±0,0	0,5±0,0

* β-galaktozidaz ünitesi nmol ONPG/dak/mg protein

±SD: standart sapma

Zayıf azot kaynağında üretilen *Δtec1* maya hücrelerinde (1177,7±42,0) β-galaktozidaz enzim aktivitesinin, glutamin azot kaynağında üretilen hücrelerden (995,6±138,8) farklı olmadığı gözlemlendi. Prolin ve glutamin içeren ortamda üretilen mutant maya hücrelerinde *NTH1* gen ekspresyonunun değişmediği tespit edildi.

Amonyum sülfat ve glutamin maya hücreleri için kuvvetli azot kaynağı olmasına rağmen, *NTH1* ekspresyonunun amonyum sülfat içeren ortamda üretilen mutant maya hücrelerinde yaklaşık 2 kat azaldığı belirlendi. Amonyum sülfat içeren ortamda üretilen maya hücrelerinde beta galaktozidaz enzim aktiviteleri 534,2±56,2 ünite olarak ölçüldü.

S. cerevisiae maya hücrelerinde azot sinyal sistemleri azot transport sistemleri ile birlikte çalışır. Hücre dışındaki azot kaynağının çeşidine ve miktarına göre farklı sinyal transport sistemleri görev almaktadır. Amonyum ve glutamin içeren ortamlarda gözlenen *NTH1* transkripsiyon farklı transport mekanizması ile ilgili olabilir.

Farklı azot kaynaklarının yaban tip ve *Δtec1* maya hücrelerinde ölçülen *NTH1* ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında, genel olarak Tec1 proteinin yokluğunda *NTH1* transkripsiyonun 2 ile 4 kat arasında artış olduğu tespit edildi. Zayıf azot kaynağında *Δtec1* maya hücrelerinde *NTH1* ekspresyon seviyesinin (1177,7±42,0 ünite), yaban tip maya hücrelerindeki *NTH1* ekspresyon seviyesinden (626±14,6 ünite) 2 kat fazla olduğu, benzer şekilde glutamin içeren ortamda *Δtec1* maya hücrelerinde 3 kat fazla olduğu görüldü. Yaban tip maya hücrelerinde zayıf azot kaynağında, *NTH1* ekspresyonu kuvvetli azot kaynaklarından 2 ile 7 kat fazladır (Çizelge 4.2.). Ancak *Δtec1* maya hücrelerinde, prolin içeren ortamda ve glutamin içeren ortamda *NTH1* gen ekspresyonunda değişim gözlenmemiştir. Bu durum Tec1 proteinin *NTH1* gen ekspresyonunun düzenlenmesinde represör olarak görev aldığını göstermektedir.

SUC2-LacZ gen fizyonu taşıyan *Δtec1* maya suşunda farklı azot kaynaklarında *SUC2* promotorunun aktive olmadığı tespit edildi (Çizelge 4.3).

4.5. Tec1 Transkripsiyon Faktörünün Hücre İçi Trehaloz Birikimine Etkisi

S. cerevisiae'de *TPS1* promotor bölgesinde STRE dizileri bulunmakta olup, çeşitli stres koşullarında aktive edilmektedir. *TPS1* promotor bölgesi farklı transkripsiyon faktörlerinin bağlanması için gerekli elementler bulunmaktadır. Bu transkripsiyon faktörleri aracılığıyla *TPS1* gen ekspresyonu regüle edilmektedir. *S. cerevisiae* maya hücrelerinde stres koşulları varlığında TPS kompleksi aktif hale getirilerek, trehaloz molekülü sentezi gerçekleştirilir.

Çalışmamızda Tec1 transkripsiyon faktörünün hücre içi trehaloz birikimini belirlemek için, *NTH1 LacZ* gen fizyonu içeren yaban tip ve mutant transformant maya hücreleri logaritmik faza kadar YNBD-HLM besin ortamında üretildi. Hücreler farklı azot kaynaklarının bulunduğu kültür ortamlarına geçirilmeden önce örnek alınımı yapılarak hücre içi trehaloz miktarı saptandı. GOD yöntemi kullanılarak belirlenen OD₅₄₆ değerleri, glukoz standardının vermiş olduğu absorbans değerine göre hesaplanarak, hücresel lizatların içerdiği glukoz miktarı glukoz standart çözeltisinin içerdiği glukoz miktarına göre maya yaş ağırlığının üzerinden normalize edilerek, miligram hücre başına biriktirilen mikro gram glukoz (µg glikoz/mg yaş ağırlığı) olarak saptandı. Elde edilen veriler Çizelge

4.4.'de verildi.

Yaban tip maya hücrelerinde hücre içi trehaloz miktarı $277,4\pm 56,8$ μg glukoz/mg yaş ağırlığı, *Δtec1* maya hücrelerinde $27,2\pm 16,0$ μg glukoz/mg yaş ağırlığı olarak saptandı. Yaban tip maya suşu ile karşılaştırıldığında, *Δtec1* maya suşunda hücre içi trehaloz miktarında 10 katlık bir azalma gözlemlendi.

Çizelge 4.4. Stressiz üreme koşulunda Tec1 proteinin hücre içi trehaloz birikimine etkisi

Gen Fizyonu	Hücre içi trehaloz miktarı (\pm SD)*	
	Yaban Tip	<i>Δtec1</i>
<i>NTH1-LacZ</i>	$277,4\pm 56,8$	$27,2\pm 16,0$
<i>SUC2-LacZ</i>	775 ± 88	281 ± 22

* μg glukoz/mg yaş ağırlığı

\pm SD: Standart sapma

NTH1-LacZ gen fizyonu içeren maya suşları ile ilgili yapılan tüm çalışmalar *SUC2-LacZ* gen fizyonu içeren yaban tip ve *Δtec1* maya suşlarında tekrar edilmiştir. *SUC2-LacZ* gen fizyonu içeren transformant maya suşlarına ilişkin hücre içi trehaloz miktarları Çizelge 4.4.'de gösterilmektedir. Yaban tip maya suşunda hücre içi trehaloz miktarı 775 ± 88 μg glukoz/mg yaş ağırlığı, *Δtec1* maya suşunda ise 281 ± 22 μg glukoz/mg yaş ağırlığı olarak saptandı.

4.6. Tec1 Transkripsiyon Faktörünün Farklı Azot Kaynaklarında Hücre İçi Trehaloz Birikimine Etkisi

S. cerevisiae'de trehaloz metaboliti dioksik kayma sonrası durağan faza geçerken depolanmaktadır. Kuvvetli azot ve glukoz varlığında, TOR ve PKA sinyal yolları üzerinden Msn2/Msn4 proteinlerinin fosforile edilerek sitoplazmada kalması sağlanmaktadır. Msn2/Msn4 proteinleri, STRE elementlerine bağlanamamasından dolayı, stres ile ilişkili genler inhibe edilmektedir. Dolayısıyla uygun üreme koşulu varlığında stres sinyali oluşmadığından dolayı bazal seviyede trehaloz sentezi gerçekleşmektedir. Düşük azot kaynağı (Prolin) varlığında, Tor1 kinaz baskılanarak Msn2/Msn4 proteinlerin defosforilasyonu sağlanır. Aktive edilen Msn2/Msn4 proteinleri nukleusa geçerek strese cevap genlerini aktive eder. Çevresel stres koşullarında TPS kompleksi aktifleştirilerek, hücre içi trehaloz miktarı artırılır.

Çalışmamızda yaban tip ve *Δtec1* maya hücreleri YNBD-HLM üreme ortamında

logaritmik aşamaya kadar üretildi. Aynı koşul maya kültürleri 3 eşit gruba ayrıldı. Birinci grup aynı üreme şartlarında 4 saat inkübasyona bırakıldı. İkinci ve üçüncü gruplar ise santrifüj edilerek, steril soğuk su ile yıkama işlemi yapıldı. İkinci grup maya hücreleri glutamin içeren üreme ortamına, üçüncü grup ise prolin içeren üreme ortamına aktararak 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyon sonunda amonyum sülfat, glutamin ve prolin azot kaynaklarını içeren üreme kültürlerinde hücre içi trehaloz miktarı saptandı. Tüm deneyler en az 3 kez tekrar edilerek, standart sapma değerleri hesaplandı. Yaban tip ve *Δtec1* maya suşunda kuvvetli (amonyum sülfat ve glutamin) ve zayıf azot (prolin) varlığında elde edilen hücre içi trehaloz miktarları Çizelge 4.5.'de gösterildi.

NTH1-LacZ gen fizyonu içeren transformant maya hücreleri logaritmik aşamaya ve sonrasında da 4 saat amonyum sülfat içeren üreme ortamında inkübe edildi. Bu koşulda saptanan hücre içi trehaloz miktarı yaban tip maya suşunda $277,4 \pm 56,8$ μg glukoz/mg yaş ağırlığı, *Δtec1* maya suşunda ise $27,2 \pm 16,0$ μg glukoz/mg yaş ağırlığı seviye saptandı. Amonyum sülfat içeren ortamdan glutamin bulunan kültür ortamına aktarılan yaban tip maya hücrelerinde hücre içi trehaloz miktarında 1,5 kat bir azalma gözlenirken, *Δtec1* maya hücrelerinde yaklaşık 2 katlık bir artış gözlenmektedir. Amonyum sülfat içeren ortamdan prolin kültür ortamına geçirilen yaban tip maya hücrelerinde hücre içi trehaloz miktarında 2 kat artış gözlenirken, *Δtec1* maya hücrelerinde ise yaklaşık 30 kat bir artış gözlenmektedir. Amonyum sülfat varlığında üretilen yaban tip maya suşunda hücre içi trehaloz miktarı $472,8 \pm 76,8$ μg glukoz/mg yaş ağırlığı, *Δtec1* maya suşunda ise $617,4 \pm 5,4$ μg glukoz/mg yaş ağırlığı olarak belirlendi. Glutamin varlığında yaban tip maya hücrelerinde $173,5 \pm 27,1$ μg glukoz/mg yaş ağırlığı, *Δtec1* maya suşunda ise $47,4 \pm 12,1$ μg glukoz/mg yaş ağırlığı olarak saptandı. Prolin içeren üreme koşulu varlığında yaban tip maya hücrelerinde $656,1 \pm 2,6$ μg glukoz/mg yaş ağırlığı, *Δtec1* maya suşunda ise $802,2 \pm 3,7$ μg glukoz/mg yaş ağırlığı seviye belirlendi. Elde edilen veriler Çizelge 4.5.'de gösterildi.

Çizelge 4.5. Tec1 proteininin farklı azot kaynaklarının hücre içi trehaloz birikimine etkisi

Gen Fizyonu	Hücre içi trehaloz miktarı (±SD)*			
	Maya Suşları	Amonyom Sülfat	Glutamin	Prolin
<i>NTH1-LacZ</i>	Yaban tip	472,8±76,8	173,5±27,1	656,1±2,6
	<i>Δtec1</i>	617,4±5,4	47,4±12,1	802,2±3,7
<i>SUC2-LacZ</i>	Yaban tip	1794±396	319±43	2344±198
	<i>Δtec1</i>	1980±270	135±95	1550±26

*µg glukoz/mg yaş ağırlığı

±SD: Standart sapma

NTH1-LacZ gen füzyonu içeren yaban tip ve *Δtec1* maya suşlarında hücre içerisinde biriktirilen trehaloz miktarları karşılaştırıldığında, normal koşul varlığında *Δtec1* maya suşundaki trehaloz birikiminde 10 katlık bir azalma olduğu saptandı. Amonyum sülfat kültür ortamında ise, yaban tip maya suşu ve *Δtec1* maya suşunda trehaloz birikiminin birbirine yakın değerler olduğu belirlendi. Ayrıca azot uygulaması (prolin ve glutamin) sonuçlarına göre *Δtec1* maya suşunda zayıf azot kaynağı varlığında biriktirilen hücre içi trehaloz miktarı, yüksek azot kaynağına oranla 17 kat fazla olduğu gözlemlendi. Dolayısıyla maya hücreleri azot stresini algılayarak hücre içi trehaloz miktarını arttırdığı saptandı.

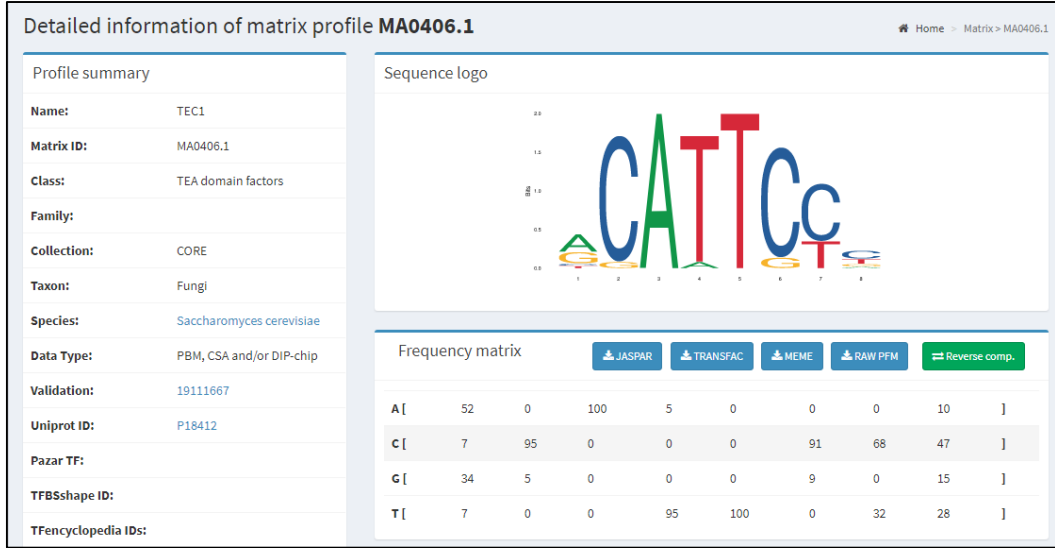
SUC-LacZ genfüzyonu içeren transformant maya hücreleri logaritmik aşamaya kadar üretildi. Daha sonra AS içerisinde üretilen maya kültürleri 3 gruba ayrılarak farklı azot kaynakları içeren (glutamin, prolin ve AS) üreme ortamlarında 4 saat süresince üretildi. İnkübasyon sonunda farklı azot kaynakları bulunan üreme ortamlarından örnekler toplanılarak hücre içi trehaloz birikimleri belirlendi. AS içeren üreme ortamında hücre içi trehaloz miktarı yaban tip maya suşunda 1794±396 µg glukoz/mg yaş ağırlığı, *Δtec1* maya suşunda ise 1980±270 µg glukoz/mg yaş ağırlığı olarak belirlendi. Kuvvetli azot kaynağı varlığında üretilen yaban tip maya suşunda 319±43 µg glukoz/mg yaş ağırlığı, *Δtec1* maya suşunda 135±95 µg glukoz/mg yaş ağırlığı saptandı. Zayıf azot kaynağı üreme koşulunda yetiştirilen yaban tip maya suşunda hücre içi trehaloz miktarı 2344±198 µg glukoz/mg yaş

ağırlığı iken, *Atec1* maya suşunda ise 1550 ± 26 µg glukoz/mg yaş ağırlığı olarak belirlendi. Elde edilen veriler çizelge 4.5.'de gösterildi.

Aynı zamanda *SUC2-LacZ* gen fizyonu içeren yaban tip ve *Atec1* maya hücrelerindeki farklı azot kaynaklarında biriktirilen hücre içi trehaloz miktarı saptanarak Çizelge 4.5.'da verildi. *SUC2-LacZ* gen füzyonu içeren transformant *S. cerevisiae* maya suşları (yaban tip ve *Atec1*) karşılaştırıldığında, stres öncesi durumda *Atec1* maya suşunda trehaloz birikiminde yaklaşık 3 kat azalma olduğu belirlendi. Amonyum sülfat kültür ortamında, yaban tip ile karşılaştırıldığında *Atec1* maya suşunda trehaloz birikiminde artma olduğu ortaya koyuldu. Zayıf azot (prolin) uygulamasında yaban tip ile karşılaştırıldığında *Atec1* maya suşunda trehaloz birikiminin yaklaşık 1,5 kat azaldığı ortaya koyuldu. Kuvvetli azot (glutamin) uygulaması varlığında *Atec1* maya suşunda yaklaşık 2 kat azalma olduğu gözlemlendi.

4.7. Tec1 Transkripsiyon Faktörünün *NTH1* Promotoruna *in silico* Bağlanma modeli

Tec1 transkripsiyon faktörü, invazif büyümeden kaskadında görev alan genlerin düzenlenmesinde yer alan homeodomain ailesinin bir üyesidir. Tec1 proteini, Helix-Turn-Helix DNA motifine sahip olup, TEA/ATTS konsensus dizisine ((A(G/C/T)C(G)AT(A)TC(G)C(T)C(T/G/A)) sahip genlerin promotorlarına bağlanarak ekspresyonlarını regüle ederler. Tec1 transkripsiyon faktörünün DNA bağlanma bölgesi (ID MA0406.1) JASPAR CORE veritabanı vasıtasıyla tespit edildi (Şekil 4.5.). *NTH1* promotor bölgesinde Tec1p bağlanması için TEA/ATTS elementi içermektedir. Bu nedenle çalışmamızda Tec1 transkripsiyon faktörünün *NTH1* promotoruna bağlanmasının *in silico* modellenmesi yapılmıştır.



Şekil 4.5. Tec1 transkripsiyon faktörünün olası DNA bağlanma bölgesi (Jaspar Core: ID MA0406.1)

Çalışmada SGD (*Saccharomyces* Genome Database) veri tabanından alınan 1000 bç uzunluğundaki *NTH1* promotor bölgesi kullanıldı. *NTH1* promotörü (3'→5') ve potansiyel Tec1p bağlanma bölgeleri gösterilmiştir. *NTH1* promotörüne olası Tec1p bağlanma bölgeleri sırası ile 124-128 bç (3'-CATTC-5'), 134-138 bç (3'-CATCG-5'), 140-144 bç (3'-CATCG-5'), 429-433 bç (3'-CATTC-5') ve 634-638 bç (3'-CATCG-5')'dir (Şekil 4.6.).

```

1 TATTCTGGAGCAATGATGTGGTTAGCACAAATCTTTAAGGCTTGTCTCTTCATCAAT
61 ATTCTAACCTTGTTAGTCTTTTTGTTCTTCAAGAACTTACAGTCACCACTACCTCTTTCT
121 TTCATTCCCTTGGCATCGGCATCGAATCTGAAAAGCTTGGCTCTGACCTTGTAAGAAGCT
181 TCTTCGTCTTCTCCATTGTCTTAACATCTACCTTTCCAGGTGAACCACTGGTTCAAAA
241 TGGATATCTGGTGATTCTGGAGCATCATCACCTTCTTCTTGGTTTCTCCTTGGTATCT
301 TCTTCGTCTTTCTTGGTTTCTGGCTTTTCGGCCTTCTTACCACCAACATGGAGAAGACA
361 GCAGAGGATGGTGGCTTTGGAGCAGCCTTCTCCTTCTTGTGACGACAGGTTTCTTATCT
421 TCGCTAGACATTCCTTTTCTATAGTTGTGTTTATCTTCTTGTCTTTATTTCAAATTAAC
481 AAGATCTTTCTTCTTCTCCAATTGAATATCAATTTTCATCATCAGATTTTAGTTTCTGTT
541 TTATTTTTTATTTTTTATTTTTTTTTGTTTCTTGTCTTCCGCGTACTTCCCGCTGGGC
601 GAAAAAAGAAATGAAAAAAGAAACGACAGGAGCATCGTGTAGGACGAAGCCCTTATCC
661 CCTAGTTACCGAAGAAGGCCACCAATCTTAAGTTTGATAGAGCAGTACTTATATAAGGCT
721 ATATATAGACTGGTTCACAAGGTTATCAATATGAAACTTGCAGGATCACCGATTTACGGG
781 ATTTTTTCAGGAGCGAGGTACAAGATTTGTTGGCCTGAAAAGATCGCAAACATTAGCTAG
841 AAATTTTCCCTTATCGTTTTCCGTAGAGTAAATATAATATCAAGAAGATAGTTTTATAT
901 TGACTGATTTCAACAACACTGCATAGATATAAGGAGATTACTAGATACAAGAACGCCTG
961 ATAAACAAAAAAGAAAAATTAACAAAAAATCAGTAGAATG

```

Şekil 4.6. Tec1p' nin *NTH1* promotor bölgesindeki olası bağlanma bölgeleri (SnapGene)

Tec1 proteininin DNA bağlanma bölgesine ait 66 amino asit uzunluğundaki dizi belirlendi (Uniprot/SGD)(Şekil 4.7.). Yüksek oranda korunmuş olan bu amino asit sekansı I-TASSER programına gönderilerek 3 boyutlu hale getirildi.

```
1 MSLKEDDFGK DNSRNIESYT GRIFDVYIQK DSYSQSALDD MFPEAVVSTA ACVKNEAEDN
61 INLIDTHPQF ELVNTGLGAK SDDLKSPSAK ATFTDKQRKN EVPNISVSNY FPGQSSETSS
121 TTESWTIGCD KWSEKVEEAF LEALRLIMKN GTTKIKIRNA NFGRNELISL YIKHKTNEFR
181 TKKQISSHIQ VWKKTIQNKI KDSLTLSSKE KELLHLIEHG AEQTTENSNL FYDIFEEIID
241 SLPSVSDSGS LTPKNLYVSN NSSGLSVHSK LLTPITASNE KKIENFIKTN AASQAKTPLI
301 YAKHIYENID GYKCVPSKRP LEQLSPTE LH QGDRPNKASF SNKKAILESA KKIEIEQRKI
361 INKYQRISRI QEHESNPEFS SNSNSGSEYE SEEEVVP RSA TVTQLQSRPV PYYKNGMPY
421 SLSKVRGRPM YPRPAEDAYN ANYIQGLPQY QTSYFSQLLL SSPQHYEHSP HQRNFTPSNQ
481 SHGNFY*
```

Şekil 4.7. Tec1p'nin TEA/ATTS DNA bağlanma bölgesine ait 66 amino asitlik dizi (Uniprot/SGD)

NTH1 promotorunda Tec1p TEA/ATTS-DNA bağlanma elementlerinin bulunduğu DNA fragmentleri 3D-DART webserver programına gönderilerek Pdb formatı haline dönüştürüldü.

aacttacagtcaccagtcacctcttttccattccttGGCATCGgcatcgaatctgaaaagctt/65 bp –
tgctgacgacaggttcttatcttcgctagaCATTCttttctatagttgtgtttatcttcttc/65 bp sırası ile
“tec1p_tea1.pdb/tec1p_tea2.pdb” olarak kaydedildi.

I-TASSER programından gönderilen 7686 atomlu Tec1 proteinin 3D yapısı Visual Molecular Dynamics (VMD) programı ile hidrojen atomları uzaklaştırılarak 3798 atom sayısına düşürülerek “tec1_nonH.pdb” şeklinde kaydedilmiştir.

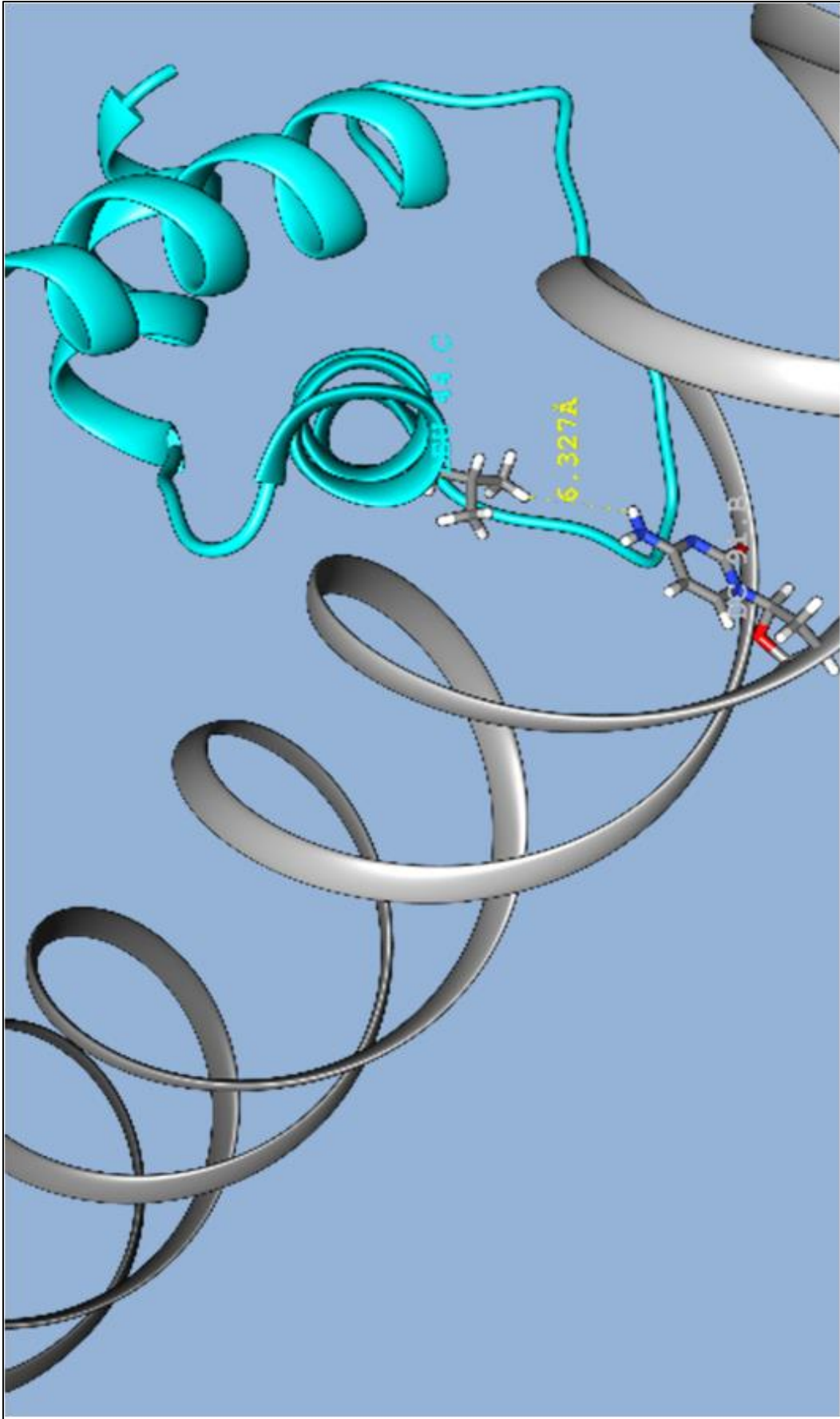
Atom sayısı azaltılarak *in silico* çalışmalar sırasında oluşabilecek gecikmelerin engellenmemesi amaçlanmış dolayısıyla docking programlarının kullanılması için hazır hale getirilmiştir.

I-TASSER ve VMD programı ile elde ettiğimiz Pdb dosyaları ile 3D-DART webserver programından gelen Pdb NPDock-Genesilico.pl sitesine gönderilerek Docking çalışması gerçekleştirildi.

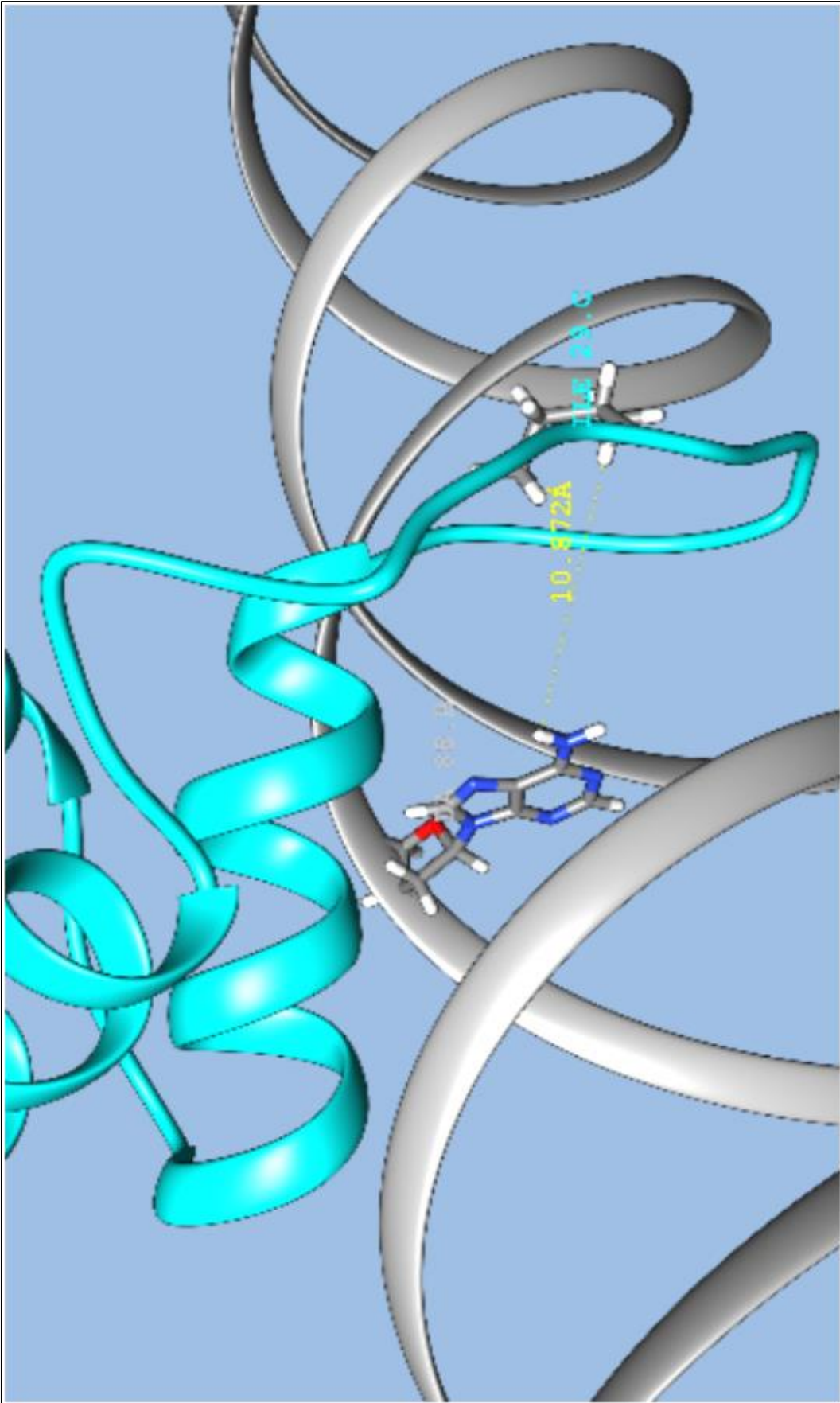
Tec1p, *NTH1* promotoruna olan olası uzaklığı VMD programı ile hesaplandı. *NTH1* promotorun üzerinde Tec1 proteinin bağlanmasını gösteren 3D modeli Şekil 4.12.' de gösterildi.

NTH1 promotoru üzerindeki Tec1 proteini bağlanma bölgesindeki bazlar ile Tec1p DNA bağlanma bölgesindeki amino asitler arasındaki uzaklık Anström birimi olarak gösterildi (Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10., Şekil 4.11.). *NTH1* promotorundaki 91. Sitozin bazı ile Tec1 proteininin 44. Lösin (Leu44) amino asiti arasındaki olası mesafe 6.327 Å saptanarak Şekil 4.8.' de gösterildi. *NTH1* promotorundaki 88. Adenin bazı ile Tec1 proteinin 29. İzölösin (Ile29) amino asiti arasındaki Anström değeri 10.872 Å olarak belirlenerek, Şekil 4.9.' de gösterildi. *NTH1* promotoru üzerindeki 89. Timin bazı ile Tec1 proteinin 47. Lizin (Lys47) amino asiti arasındaki uzaklık 5.260 Å saptanarak, Şekil 4.10.' de gösterildi. *NTH1* promotoru üzerindeki 90. Guanin bazı ile Tec1 proteinin 47. Lizin amino asit arasındaki uzaklık 4.352 Å belirlenerek, Şekil 4.11.' de gösterildi.

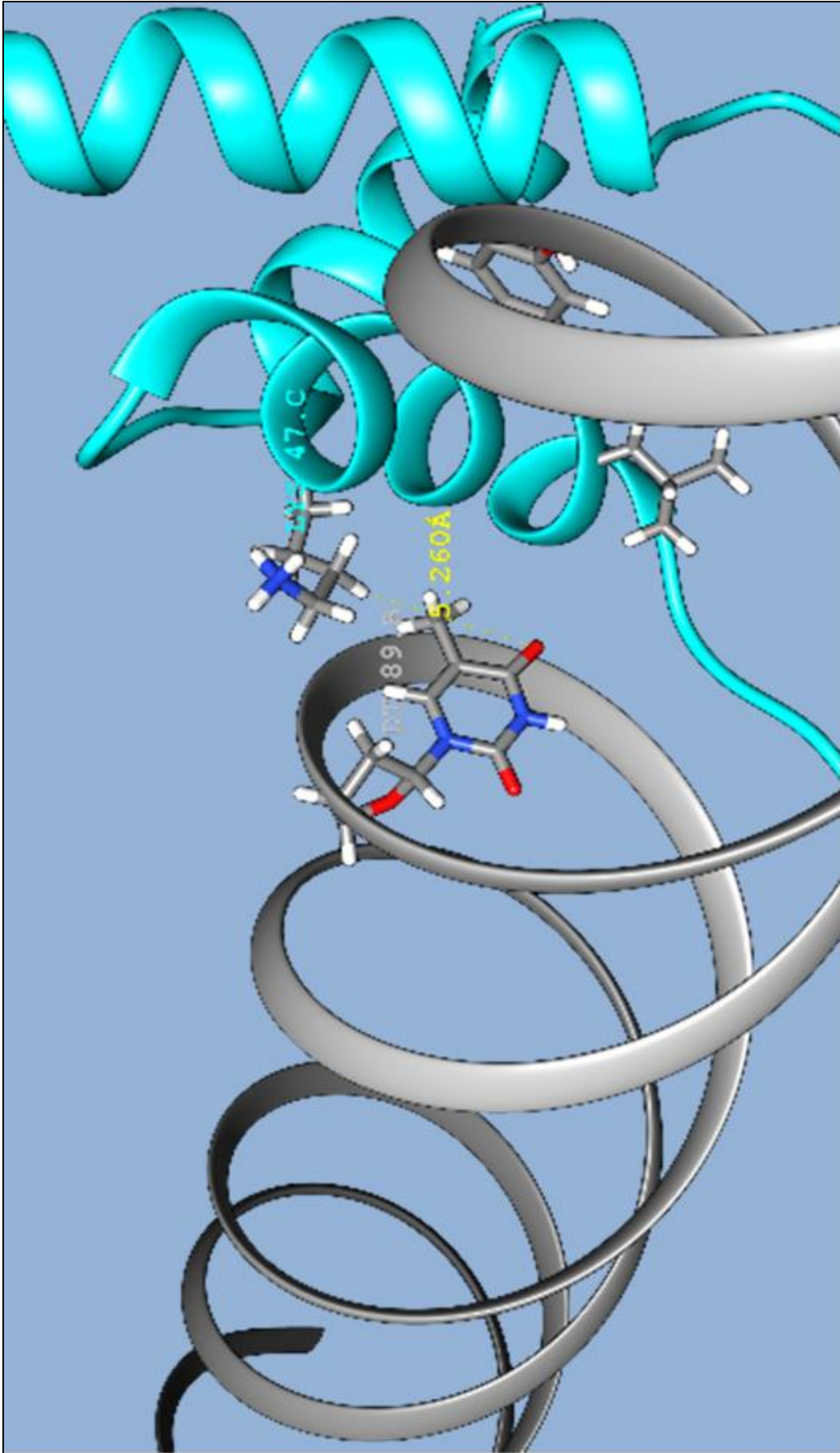




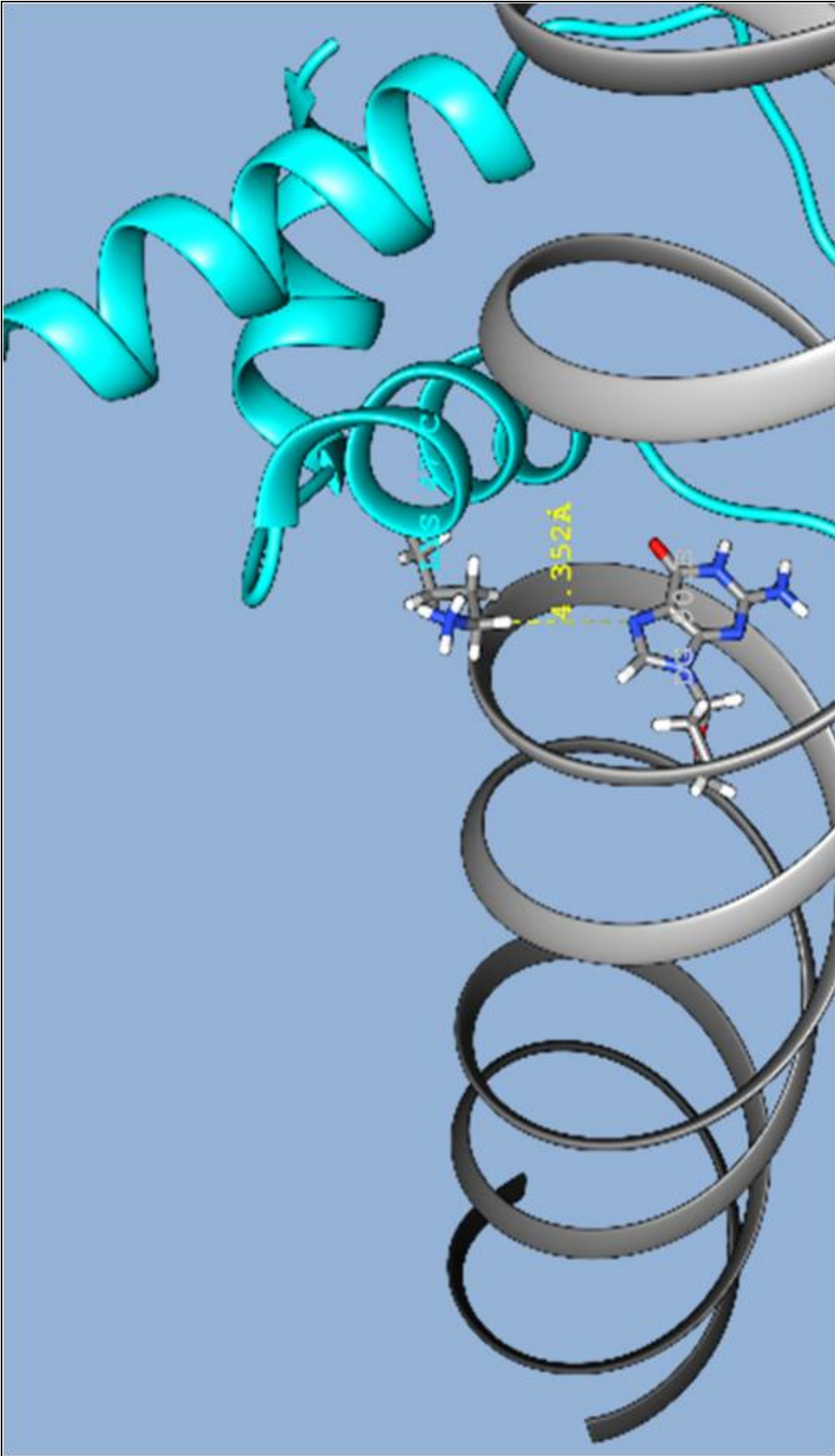
Şekil 4.8. Leu⁴⁴ – C₉₁ (6.327 Å)



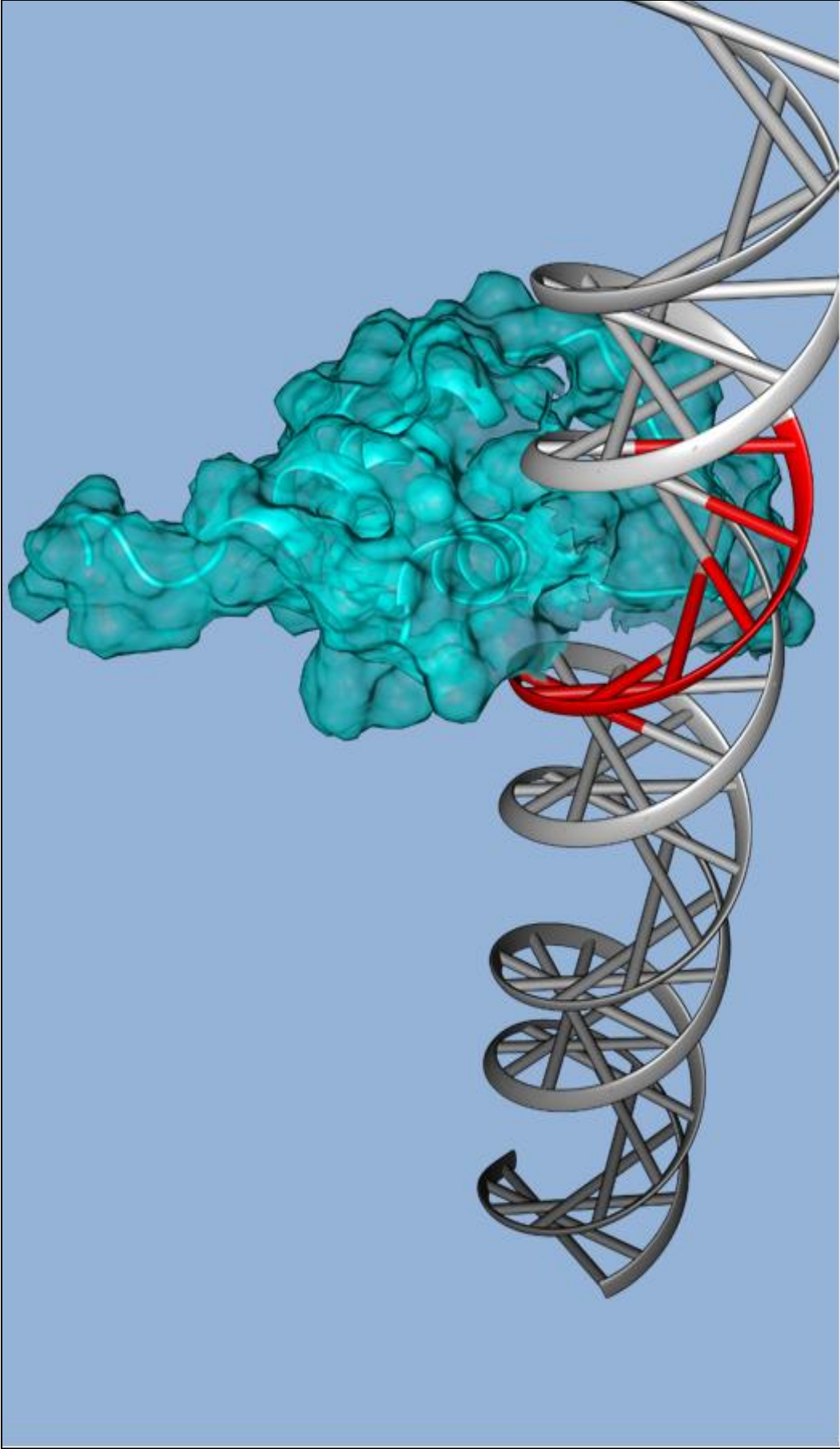
Şekil 4.9. Ile²⁹ – A₈₈ (10.872 Å)



Şekil 4.10. Lys⁴⁷ – T₈₉ (5.260 Å)



Şekil 4.11. Lys⁴⁷ – G₉₀ (4.352 Å)



Şekil 4.12. *NTH1* Promotoru üzerinde olası Tec1p DNA bağlanma bölgesi

4.8. Çeşitli Canlı türlerinde Bulununan TEA Domain Bölgesinin Blast Analizi

Tec1 transkripsiyon faktörünün (P18412) sahip olduğu TEA-DNA bağlanma bölgesi **WTIGCDKWSEKVEEAFLEALRLIMKNGTTKIKIRNANFGRNELISLYIKHKTNEFRT KKQISSHIQVWKKTIQNK** (125a.a-199a.a) Uniprot webserver programı kullanılarak tespit edildi.

İlgili TEA Domain bölgesine sahip çeşitli canlılardaki transkripsiyon faktörleri NCBI webserver programı kullanılarak blast sonuçları ile belirlendi.

Fungi türleri ve diğer türlerdeki TEA bölgeleri fasta formatında iki farklı dosya halinde kaydedildi.

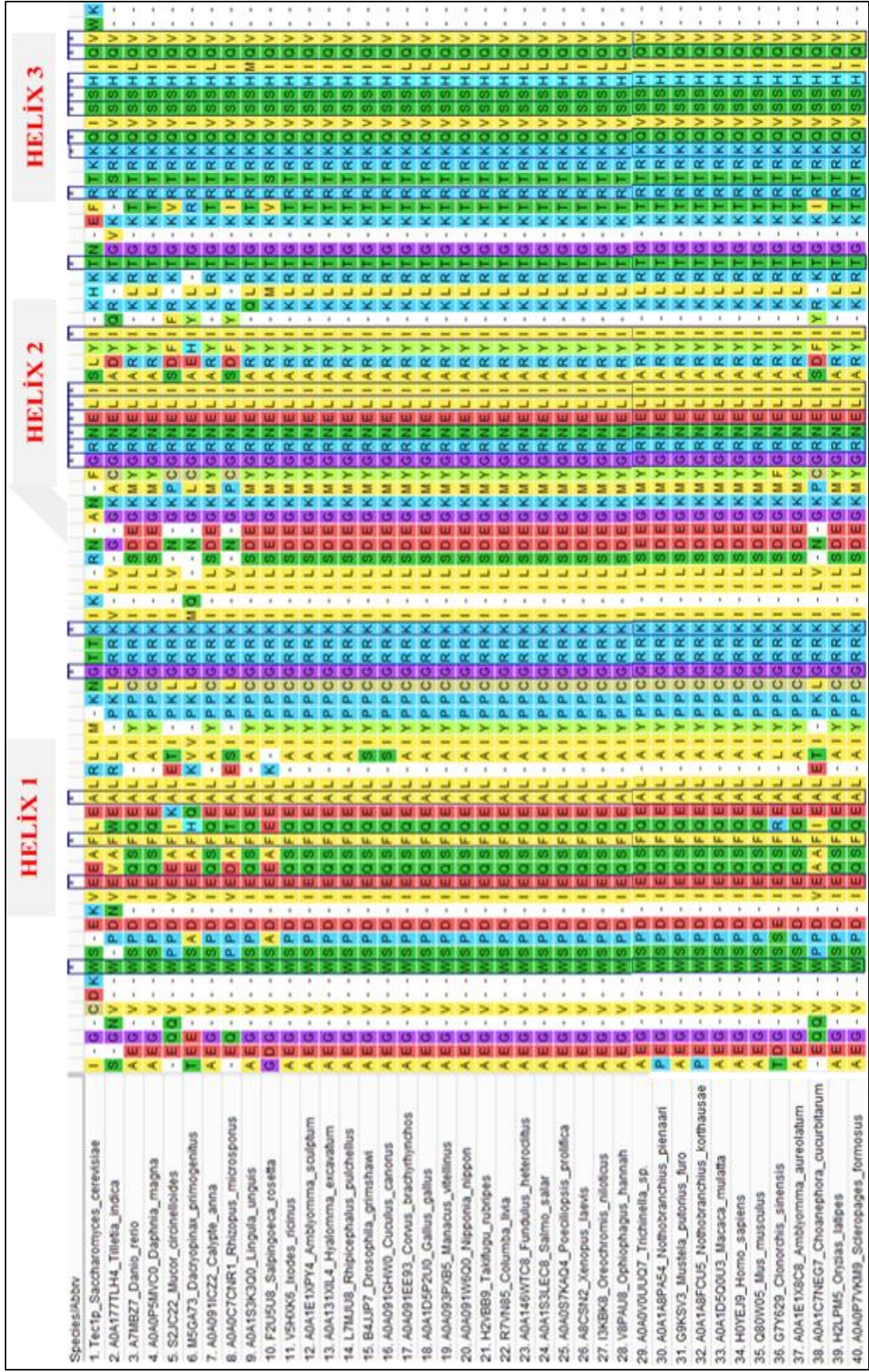
MEGA7 programı vasıtası ile çeşitli canlılardaki TEA domain bölgesine sahip transkripsiyon faktörleri aling edilerek yüksek oranda korunmuş bölgeler görselleştirildi (Çizelge 4.6., Çizelge 4.7.) (Şekil 4.13., Şekil 4.14.).

Çizelge 4.6. Çeşitli fungi türlerinde TEA/ATTS DNA helix bölgeleri ve karşılık geldiği korunmuş bölgeler

Helix Bölgeleri	Helix Bölge Uzunlukları	Korunmuş Bölgeler
Helix 1	134-146bç	EKVEEAFLEALRL
Helix 2	164-176bç	GRNELISLYIKHKT
Helix 3	182-191bç	KKQISSHIQV

Çizelge 4.7. Çeşitli canlı türlerinde TEA/ATTS DNA helix bölgeleri ve karşılık geldiği korunmuş bölgeler

Helix Bölgeleri	Helix Bölge Uzunlukları	Korunmuş Bölgeler
Helix 1	134-146bç	EKVEEAFLEALRL
Helix 2	164-176bç	GRNELISLYIKHKT
Helix 3	182-191bç	KKQISSHIQV



Şekil 4.14. Çeşitli türlerdeki korunmuş TEA domain bölgeleri

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

S. cerevisiae maya hücreleri stres koşulları varlığında prolin ve trehaloz gibi önemli metabolitler sentezlemektedirler. Maya hücrelerinde prolinin stres koruyucu etkisi, hücre içi lokalizasyonu ve konsantrasyonuna göre değişmektedir (Takagi, 2008). Strese karşı trehaloz yerine prolin biriktiren *S. cerevisiae* maya suşu kullanılarak yapılan çalışmada, biriktirilen prolinin trehalozun fonksiyonel olarak yerini tutmadığı belirlenmiştir. Diğer bir stres metaboliti olan trehaloz molekülü, enerji kaynağı olarak da görev almaktadır.

Stres varlığında hücre bütünlüğünün korunmasında Tps1 proteinin rol aldığı belirtilmiştir (Petitjean ve ark., 2015). *TPS1* geni trehaloz-fosfat sentetaz enzimini kodlamaktadır. *Δtps1* varlığında trehaloz-6-P oluşturulamadığından dolayı maya hücreleri strese karşı dayanıksız hale gelmektedir. *NTH1*, stres koşullarında sentezlenen trehalozu normal üreme koşullarına geçilmesiyle hızla yıkıma uğratmaktadır. Ancak *NTH1* geninin aktive olabilmesi için postrankripsiyonel modifikasyonlara gerek duyulmaktadır. Bu genin stres varlığında aktivasyonu promotor bölgesinde bulunan STRE elementleriyle gerçekleştirilir (Nwaka ve ark., 1995a, 1995b). *NTH1* geninin transkripsiyonel düzenlenmesi ve bu düzenlemeden sorumlu TF'ler henüz tam anlamıyla belirlenmemiştir.

Çalışmamızda *NTH1* gen regülasyonu ile ilişkisi belirlenmemiş Tec1 transkripsiyon faktörünün *NTH1* geninin transkripsiyonuna etkisi ortaya koyulmuştur. Tec1 proteini, promotor bölgesinde TEA/ATTS elementlerine sahip genlere bağlanarak, ekspresyonlarını regüle etmektedir. *NTH1* geninin transkripsiyonel regülasyonu TOR sinyal sistemi üzerinden gerçekleşmekte olup, promotor bölgesinde Tec1p bağlanması için gerekli TEA/ATTS elementi içermektedir.

Tez çalışmamızda, normal koşul varlığında yaban tip maya suşu ile karşılaştırıldığında, *Δtec1* maya suşunda *NTH1* transkripsiyon seviyesinde yaklaşık olarak 7 kat artma olduğu saptanmıştır. Çalışma sonuçları *Δtec1* maya suşunda, Tec1 proteini bulunmadığından dolayı, *NTH1* promotorunda bulunan TEA/ATTS elementlerine bağlanamadığını belirtmektedir. Dolayısıyla Tec1 proteini yokluğunda ve diğer hücre içi aktivatörlerinin varlığından dolayı *NTH1* transkripsiyon seviyesinde artış meydana geldiği düşünülmektedir. Eğer Tec1 proteini *NTH1* promotoruna bağlanmış olsaydı, *NTH1* transkripsiyonel aktivitesini, yaban tip suş ile karşılaştırıldığında daha düşük olması beklenirdi. Sonuçlar baz alındığında, *NTH1* transkripsiyonel regülasyonunda, Tec1 transkripsiyon faktörünün negatif regülatör (represör) olarak rol oynamaktadır.

Tec1 transkripsiyon faktörü, çeşitli stres koşulları varlığında aktivatör veya represör olarak rol oynamaktadır. Zayıf N varlığında, Tec1 transkripsiyon faktörü TOR yoluğ üzerinden regüle edilerek stres koşulları varlığında aktive olduğı saptanmıştır (Brückner ve ark., 2011). Sonuçlar baz alındığında, Tec1 transkripsiyon faktörünün normal koşul varlığında bazal *NTH1* transkripsiyonu ve stres koşulları varlığında *NTH1* gen ekspresyonunun regülasyonu için ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak stres koşulları varlığında, Tec1 proteinin aktivasyonu için, farklı proteinler aktivatör veya represör olarak görev almaktadır. Dig1/2 proteinleri ve Ste12 proteini bu regülasyonda Tec1 proteinini aktive veya inhibe edilmesini tetikleyebilmektedir.

Daha önce yapılan çalışmalarda, *Saccharomyces cerevisiae* ve ilgili maya türlerinde, Tec1 transkripsiyon faktörü, Ste12 transkripsiyon faktörü ile birlikte hücre adhezyonu ve filament oluşumu dahil hücre gelişiminin kontrolünde rol almaktadır. Tec1p ve Ste12p kompleksi, kooperatif DNA bağlanma için feromon yanıt elementleri (PREs) bağlanma alanları bulunan Ste12 ile TEA konsensus dizilerine (TCSs) sahip Tec1 bağlanma bölgeleri sayesinde hedef genleri kontrol ederler. Tec1p/Ste12p komplekslerinin aktivitesi, upstream sinyal yolları tarafından Dig1p ve Dig2p transkripsiyonel korepressörlerinin negatif kontrolü altında düzenlenirler. Tec1p/Ste12p'nin transkripsiyonel koregülatörü olan Msa1p ve Msa2p, G₁ evresinin spesifik transkripsiyonunu kontrol edebilmek için hücre döngüsü transkripsiyon faktörleri kompleksleri olan SBF (Swi4/Swi6 hücre döngüsü TF box) ve MBF (Mbp1/Swi6 hücre döngüsü TF box) ile ilişkili olduğı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Ashe ve ark., 2008; van der Felden ve ark., 2014). Dig1 proteininin aksine, Msa1/2'nin Tec1 ve Ste12 kompleksinin aktivitesini arttırdığı belirtilmiştir (van der Felden ve ark., 2014). Tec1 proteininin Ste12'den bağımsız mekanizmalarla hedef genlerin aktivasyonundan sorumlu olduğı belirlenmesine rağmen, Tec1p ile etkileşen transkripsiyon faktörleri henüz tam olarak belirlenememiştir.

Tec1 proteininin, N-terminal bölümünde 66-76 korunmuş amino asitlerden (aa) oluşan bir DNA bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Bu bölge memeli, kuş, nematod, böcek ve mantar üyelerinde evrimsel olarak korunmaktadır. *Aspergillus nidulans* AbaA proteini, *S.cerevisiae*'daki Tec1 proteini TEA/ATTS bölgesi (Timberlake ve Andrianopoulos, 1991; Laloux ve ark., 1994) ve TEA/ATTS sınıfındaki diğerkökaryotik transkripsiyon faktörleri yüksek oranda benzerlik göstermektedir (Stewart ve ark., 1994). ATTSR-EA (AbaA, IEF1, IEC1) transkripsiyon faktörleri gelişim fonksiyonlarını yönetir (Andrianopoulos ve Timberlake; Burglin, 1991). *Drosophila melanogaster*'de nöronal gelişimin düzenlenmesinde (Campbell ve ark., 1992) ve miyogenezde rol oynayan tavuk embriyonik

transkripsiyon faktörleri M-CAT elementleri (5'-CATTCCT-3') bağlanan diziler içermektedir (Stewart ve ark., 1994). TEA/ATTS proteinleri arasındaki benzerlik gösteren bölgeler insan Tef1 proteininin DNA bağlanma bölgesine denk geldiği gösterilmiştir (Xiao ve ark., 1991).

Bu tez çalışmasında Tec1 transkripsiyon faktörünün sahip olduğu TEA/ATTS bölgesinin diğer canlılarda benzerlik gösteren transkripsiyon faktörleri blast yapılarak belirlenmiştir. Bu transkripsiyon faktörlerinde TEA/ATTS bölgelerinin yüksek oranda korundukları MEGA7 programı kullanılarak görselleştirilmiştir.

S. cerevisiae'da RLS ve CLS yaşlanma süreçleri, diğer ökaryotik canlılar ile karşılaştırıldığında, yüksek oranda korunmuş olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda maya yaşlanma mekanizmalarının TOR/Sch9 (Kaeberlein ve ark., 2005) ve Ras/cAMP/PKA (Wei ve ark., 2008) tarafından modüle edildiği saptanmıştır. Garay ve arkadaşlarının (2014) *S. cerevisiae* yaşlanma mekanizması ile ilişkili yapmış oldukları çalışmada 5600 tek veya çift gen mutasyonlarını kullanarak sabit fazdaki (stationary phase) mayaların kronolojik yaşam sürelerini belirlemişlerdir. Çalışma sonunda maya genomunun, %14'lük kısmının maya yaşam süresinin regülasyonunda rol oynadığı saptanmıştır. Diğer bir çalışmada ise, zamana bağlı büyüme ve besin sınırlaması koşullarının, maya kronolojik yaşam süresinin düzenlenmesinde görevli metabolik yollar ve bu yollar ile ilişkili transkripsiyon faktörleri belirlenmiştir (Wanichthanarak ve ark., 2015).

Tec1 transkripsiyon faktörü; açlık koşullarında, yağ asit degradasyonu, gliserol metabolizması (gliserolipid mekanizması), glikojen ve trehaloz mekanizmalarında rol oynamaktadır. Gliserol ve hücre aldehit metabolizmaları, yağ asiti beta oksidasyonu, etanol katabolik ve asetat biyosentetik süreçleri, glukoneogenezin negatif düzenlenmesi, glikojen biyosentetik süreç ve Otofaji indüklenmesi gibi önemli metabolik olayların düzenlenmesinde Tec1 transkripsiyon faktörü görev almaktadır (Wanichthanarak ve ark., 2015). Aynı zamanda Tec1p'i, MAPK (mitogen-activated protein kinase) ve TORC1 (target of rapamycin) yolları üzerinden Kronolojik Yaşam Süresini (CLS) artırılmasından sorumlu olduğu saptanmıştır (Brückner ve ark., 2011; Campos ve ark., 2017).

Tec1 proteininin, *Atec1* maya suşları kullanılarak yapılan yaşlanma çalışmalarındaki rolü gösterilmiştir (Wanichthanarak ve ark., 2015, Campos ve ark., 2017). Dolayısı ile Tec1 transkripsiyon faktörü ile ilişkili yaşlanma deneyi tez çalışmamızdan çıkartılmıştır.

KAYNAKÇA

- Alizadeh P., Klionsky D. J., 1996. Purification and biochemical characterization of the ATH1 gene product, vacuolar acid trehalase, from *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS, 391 (3): 273-278.
- Arlia-Ciommo A., Leonov A., Piano A., Svistkova V.ve Titorenko V. I., 2014. Cell-autonomous mechanisms of chronological Aging in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbial Cell, 1: 163-178.
- Ashe M., de Bruin R. A., Kalashnikova T., McDonald W. H., Yates J. R., Wittenberg C., 2008. The SBF- and MBF-associated protein Msa1 is required for proper timing of G1-specific transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal Biological Chemistry, 283 (10): 6040–6049.
- 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.
- Barbet N. C., Schneider U., Helliwell S. B., Stansfield I., Tuite M. F., Hall M. N., 1996. TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. Molecular Biology Cell, 7: 25–42.
- Baur M., Esch R. K., Errede B., 1997. Cooperative Binding Interaction Required for Function of the Ty1 Sterile Responsive Element, Molecular and Cellular Biology, 17: 4330–4337.
- Becker A., Schloder P., Steele J. E., Wegener G., 1996. The regulation of trehalose metabolism in insects. Experientia, 52 (5): 433-439.
- Behm C. A., 1997. The role of trehalose in the physiology of nematodes. International Journal for Parasitology, 27 (2): 215-229.
- Brückner S., Kern S., Birke R., Saugar I., Ulrich H. D., Mösch H. U., 2011. The TEA Transcription Factor Tec1 Links TOR and MAPK Pathways to Coordinate Yeast Development. Genetics, 189 (2): 479-494.
- Campbell S., Inambar M., Rodrigues V., Raghavan K. V., Plazzolo M., Chovnick A., 1992. The scalloped gene encodes a novel, evolutionarily conserved transcription

- factor required for sensory organ differentiation in *Drosophila*. *Genes Development*, 6: 367-379.
- Campos S. E., Garay E., Avelar-Rivas J. A., Juárez-Reyes A., DeLuna A., 2017. Genome-Wide Mechanisms of Lifespan Extension by Dietary Restriction in Yeast. *Biorxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/126797>.
- Conte D.ve Curcio J. M., 2000. Fus3 controls Ty1 transpositional dormancy through the invasive growth MAPK pathway. *Molecular Microbiology*, 35 (2): 415-427.
- Conrad M., Schothorst J., Kankipati H. N., Van Zeebroeck G., Rubio-Teixeira M., Thevelein J. M., 2014. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 38 (2): 254-299.
- Cooper T. G., 2002. Transmitting the Signal of Excess Nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor Proteins to the GATA Factors: Connecting the Dots. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS), Microbiological Reviews*, 26 (3): 223-238.
- Coutinho C., Bernardes E., Felix D., Panek A. D., 1998. Trehalose as cryoprotectant for preservation of yeast strains. *Journal of Biotechnology*, 7 (1): 23-32.
- Cox K. H., Rai R., Distler M., Daugherty J. R., Coffman J. A. Cooper T. G., 2000. *Saccharomyces cerevisiae* GATA Sequences Function as TATA Elements during Nitrogen Catabolite Repression and When Gln3p Is Excluded from the Nucleus by Overproduction of Ure2p. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 17611-17618.
- Crowe J. H., Crowe L. M., Chapman D., 1984. Preservation of Membranes in Anhydrobiotic Organisms: The Role of Trehalose. *Science*, 223 (4637): 701-703.
- Deroover S., Ghillebert R., Broeckx T., Winderickx J., Rolland F., 2016. Trehalose-6-phosphate synthesis controls yeast gluconeogenesis downstream and independent of SNF1. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS)*, 16 (4): fow036.
- De Silva-Udawatta M. N., Cannon J. F., 2001. Roles of trehalose phosphate synthase in yeast glycogen metabolism and sporulation. *Molecular Biology*, 40 (6): 1345-1356.

- De Wever V., Reiter W., Ballarini A., Ammerer G., Brocard C., 2005. A dual role for *PPI* in shaping the Msn2-dependent transcriptional response to glucose starvation. *EMBOJ*, 24 (23): 4115-4123.
- Eleutherio E. C. A., Araujo P. S., Panek A. D., 1993 (a). Protective Role of Trehalose during Heat Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cryobiology*, 30 (6): 591-596.
- Eleutherio E. C. A., Araujo P. S., Panek A. D., 1993 (b). Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1156 (3): 263-266.
- Eleutherio E. C., Maia F. M., Pereira M. D., Degre R., Cameron D., Panek A. D., 1997. Induction of desiccation tolerance by osmotic treatment in *Saccharomyces uvarum* var. *carlsbergensis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 43 (5): 495-498.
- Eleutherio E., Panek A., De Mesquita J. F., Trevisol E., Magalhães R., 2014. Revisiting yeast trehalose metabolism. *Current Genetics*, doi: 10.1007/s00294-014-0450-1
- Elbein A. D., Pan Y. T., Pastuszak I., Carroll D., 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13 (4): 17R-27R.
- Endüstriyel Mikrobiyoloji-4, (2 Kasım 2015)
http://content.lms.sabis.sakarya.edu.tr/Uploads/71924/34212/endustriyel_mikrobiyoloji4.pdf. (web kaynakça 3)
- Fadri M., Daquinag A., Wang S., Xue T., Kunz J., 2005. The Pleckstrin Homology Domain Proteins Slm1 and Slm2 Are Required for Actin Cytoskeleton Organization in Yeast and Bind Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate and TORC2. *Molecular Biology Cell*, 16 (4): 1883-1900.
- Feldmann H., 2012. *Yeast: Molecular and Cell Biology*, Second Edition. 285p.
- França M. B., Panek A. D., Eleutherio E. C. A., 2007. Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology (CBP)*, 146 (4): 621-631.
- 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.

- Gavrias V., Andrianopoulos A., Gimeno C. J., Timberlake W. E., 1996. *Saccharomyces cerevisiae* *TEC1* is required for pseudohyphal growth. *Molecular Microbiology*, 19: 1255-1263.
- Gietz R. D., Woods R. A., 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymology*, 350: 87-96.
- 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.
- 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.
- Hallett J. E. H., Luo X., Capaldi A. P., 2015. Snf1/AMPK promotes the formation of Kog1/Raptor-bodies to increase the activation threshold of TORC1 in budding yeast. *eLIFE*, 4: e09181.
- Herdeiro R. S., Pereira M. D., Panek A. D., Eleutherio E. C., 2006. Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760 (3): 340-346.
- Hnisz D., Majer O., Frohner I. E., Komnenovic V., Kuchler K., 2010. The Set3/Hos2 histone deacetylase complex attenuates cAMP/PKA signaling to regulate morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Plos Pathogens*, 6 (5): e1000889.
- Hnisz D., Bardet A. F., Nobile C. J., Petryshyn A., Glaser W., Schock U., Stark A., Kuchler K., 2012. A Histone Deacetylase Adjusts Transcription Kinetics at Coding Sequences during *Candida albicans* Morphogenesis. *Plos Genetics*, 8 (12): e1003118.
- Inoki K., Guan K. L., 2006. Complexity of the TOR signaling network. *Cell*, 16 (4): 206–212.
- Jacinto E., Loewith R., Schmidt A., Lin S., Ruegg M. A., Hall A., Hall M. N., 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology*, 6 (11): 1122-1128.

- Jules M., Guillou V., François J., Parrou J., 2004. Two Distinct Pathways for Trehalose Assimilation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (5): 2771–2778.
- Jules M., Beltran G., Francois J., Parrou J. L., 2008. New insights into trehalose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*: *NTH2* encodes a functional cytosolic trehalase, and deletion of *TPS1* reveals Ath1p-dependent trehalose mobilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3): 605-614.
- Kaasen I., McDougall J., Strøm A. R., 1994. Analysis of the *otsBA* operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology of the OtsA and OtsB proteins to the yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex. *Gene*, 145 (1): 9-15.
- Kaeberlein M., Powers R. W., Steffen K. K., Westman E. A., Hu D., Dang N., Kerr E. O., Kirkland K. T., Fields S., Kennedy B. K., 2005. Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science*, 310 (5751): 1193-1196.
- Kaeberlein M., Burtner C. R., Kennedy B. K., 2007. Recent Developments in Yeast Aging. Review, *PLoS Genetics*, 3 (5): 0655- 0660.
- Kim T. S., Kim H. Y., Yoon J. H., Kang H. S., 2004. Recruitment of the Swi/Snf Complex by *Ste12-Tec1* Promotes Flo8-Mss11-Mediated Activation of *STAI* Expression, *Molecular and Cellular Biology*, 24 (21): 9542–9556.
- Li C., Du Q., Deng W., Xie J., 2012. The biology of Mycobacterium cord factor and roles in pathogen–host interaction. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 22 (4): 289-297.
- 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 W. S., Dranginis A. M., 1998. The Cell Surface Flocculin Flo11 is Required for Pseudohyphae Formation and Invasion by *S. cerevisiae*. *Molecular and Biological*

Cell, 9: 161-171.

- Laloux I., Jacobs E., and Dubois E., 1994. Involvement of SRE element of Ty1 transposon in-dependent transcriptional activation. *Nucleic Acids Research*, 22: 999-1005.
- Loewith R., Jacinto E., Wullschleger S., Lorberg A., Crespo J. L., Bonenfant D., Oppliger W., Jenoe P., Hall M. N., 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular cell*, 10 (3): 457-468.
- Lowry, 1951. Lowry Protein Assay. *Journal of Biological Chemistry*, 265–275.
- Lunn J. E., Delorge I., Figueroa C. M., Van Dijck P., Stitt M., 2014. Trehalose metabolism in plants. *Plant Journal*, doi:10.1111/tpj.12509.
- Macakova E., Kopecka M., Kukacka Z., Veisova D., Novak P., Man P., Obsil T., Obsilova V., 2013. Structural basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Biochimica Biophysica Acta*, 1830 (10): 4491-4499.
- Madhani H. D., Fink G. R., 1997. Combinatorial Control Required for the Specificity of Yeast MAPK Signaling. *Science*, 275 (5304): 1314-1317.
- Magalhaes R. S. S., De Lima K. C., de Almeida D. S. G., De Mesquita J. F., Eleutherio E.C.A., 2017. Trehalose-6-Phosphate as a Potential Lead Candidate for the Development of Tps1 Inhibitors: Insights from the Trehalose Biosynthesis Pathway in Diverse Yeast Species. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181 (3): 914–924.
- Mansure J. J., Panek A. D., Crowe L. M., Crowe J. H., 1994. Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1191 (2): 309-316.
- 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.

- 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 (3): 286-290.
- Nwaka S., Holzer H., 1998. Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Progress in Nucleic Acid Research Molecular Biology*, 58: 197-237.
- OD660 vs Number of Cells. Retrieved July 21, 2000, from <http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/ODvsCells.html>. (web kaynakça 2).
- Paalman J. W., Verwaal R., Slofstra S. H., Verkleij A. J., Boonstra J., Verrips C. T., 2003. Trehalose and glycogen accumulation is related to the duration of the G1 phase of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS*, 3 (3): 261-268.
- 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.
- Powers R. W., Kaeberlein M., Caldwell S. D., Kennedy B. K., Fields S., 2006. Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes development*, 20 (2): 174-84.
- Peeters K., Leemputte F.V., Fischer B., Bonini B. M., Quezada H., Tsytlonok H., Haesen D., Vanthienen W., Bernardes N., Gonzalez-Blas C. B., Janssens V., Tompa P., Versées W., Thevelein J. M., 2017. Fructose-1,6-bisphosphate couples glycolytic flux to activation of Ras. *Nature Communications*, doi:10.1038/s41467-017-01019-z.
- Petitjean M., Teste M. A., François J. M., Parrou J. L., 2015. Yeast Tolerance to Various Stresses Relies on the Trehalose-6-P Synthase (Tps1) Protein, Not on Trehalose. *The Journal of Biological Chemistry*, 10.1074: jbc.M115.653899
- Rose M. D., Winston F., Heiter P., 1990. *Methods in Yeast Genetics. A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press Books.
- Ronne H., 1995. Glucose repression in fungi. *Trends Genet*, 11 (1):12-17.

- Rødkær S. V., Færgeman N. J., 2014. Glucose- and nitrogen sensing and regulatory mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. Federation of European Microbiological Societies (FEMS), 14 (5): 683–696.
- Saccharomyces* Genome Database (n.d.). Retrieved July 21, 2017, from <https://www.yeastgenome.org/locus/S000002408>. (web kaynakça 1).
- Sadeha A., Movshovich N., Volokha M., Gheber L., Aharonia A., 2011. Fine-tuning of the Msn2/4-mediated yeast stress responses as revealed by systematic deletion of Msn2/4 partners. *Molecular Biology of Cell*, 22 (17): 3127–3138.
- Santangelo G. M., 2006. Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70: 253–282.
- Schepers W., Van Zeebroeck G., Pinkse M., Verhaert P., Thevelein J. M., 2012. In vivo phosphorylation of Ser21 and Ser83 during nutrient-induced activation of the yeast protein kinase A (PKA) target trehalase. *Journal of Biological Chemistry*, 287 (53): 44130–44142.
- Scherens B., Feller A., Vierendeels F., Messenguy F., Dubois E., 2006. Identification of direct and indirect targets of the Gln3 and Gat1 activators by transcriptional profiling in response to nitrogen availability in the short and long term. Federation of European Microbiological Societies (FEMS), 6 (5): 777-791.
- Stark C., Cheng Su T., Breikreutz A., Lourenco P., Dahabieh M., Breikreutz B. J., Tyers M., Sadowski I., 2010. PhosphoGRID: a database of experimentally verified *in vivo* protein phosphorylation sites from the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Database (Oxford), 2010: bap026.
- Stewart A. F. R., Larkin S. B., Farrance I. K. G., Mar J. H., Hall D. E., Ordahl C. P., 1994. Muscle-enriched *TEF-1* isoforms bind elements from muscle-specific promoters and differently activate transcription. *Journal Biology Chemistry*, 269: 3147- 3150.
- Sugajska E., Swiatek W., Zabrocki P., Geyskens I., Thevelein J. M., Zolnierowicz S., Wera S., 2001. Multiple effects of protein phosphatase 2A on nutrient-induced signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 40 (4): 1020-1026.

- Takagi H., 2008. Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81 (2): 211-213.
- Tamaki H., 2007. Glucose-stimulated cAMP-protein kinase a pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104 (4): 245-250.
- Thevelein J. M., 1984. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiological Reviews*, 48 (1): 42-59.
- Timberlake W. E., Andrianopoulos A., 1991. ATTS, a new and conserved DNA binding domain. *Plant Cell*, 3: 747-748. Vinod P. K., Neelanjan Sengupta, Bhat P. J., Venkatesh K. V., 2008. Integration of Global Signaling Pathways, cAMP-PKA, MAPK and TOR in the Regulation of *FLO11*. *Journal PLOS*, 3 (2): e1663.
- Trevisol E. T., Panek A. D., Mannarino S. C., Eleutherio E. C., 2011. The effect of trehalose on the fermentation performance of aged cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90 (2): 697-704.
- Trevisol E. T., Panek A. D., De Mesquita J. F., Eleutherio E. C., 2014. Regulation of the yeast trehalose-synthase complex by cyclic AMP-dependent phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1840 (6): 1646-1650.
- Van der Felden J., Weisser S., Bruckner S., Lenz P., Mosch H. U., 2014. The Transcription Factors Tec1 and Ste12 Interact with Coregulators Msa1 and Msa2 To Activate Adhesion and Multicellular Development. *Molecular and Cellular Biology*, 34 (12): 2283-2293.
- Veisova D., Macakova E., Rezabkova L., Sulc M., Vacha P., Sychrova H., Obsil T., Obsilova V., 2012. Role of individual phosphorylation sites for the 14-3-3-protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Biochemical Journal*, 443 (3): 663-670.
- Wanichthanarak K., Wongtosrad N., Petranovic D., 2015. Genome-wide expression analyses of the stationary phase model of ageing in yeast. *Mechanisms of Ageing and Development*, 149: 65-74.

- Wei M., Fabrizio P., Hu J., Ge H., Cheng C., Li L., Longo V. D., 2008. Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genetic*, 4 (1): e13.
- Wera S., De Schrijver E., Geyskens I., Nwaka S., Thevelein J. M., 1999. Opposite roles of trehalase activity in heat-shock recovery and heat-shock survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry journal*, 343: 621-626.
- Winderickx J., de Winde J. H., Crauwels M., Hino A., Hohmann S., Van Dijck P., Thevelein J. M., 1996. Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control? *Molecular General Genetics*, 252: 470–482
- Womersley C., 1981. A micromethod for the extraction and quantitative analysis of “free” carbohydrates in nematode tissue. *Analytical Biochemistry*, 112 (1): 182-189.
- Xiao J. H., Davidson I., Matthes H., Garnier J. M., Chambon P., 1991. Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor *TEF1*. *Cell*, 65: 551-568.
- Zaman S., Lippman S. I., Zhao X., Broach J. R., 2008. How *Saccharomyces* Responds to Nutrients. *Annual Review of Genetics*, 42: 27–81.



EK 1. Çalışma süresince kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1. Lowry solüsyonları

Lowry A çözeltisi

% 2' lik Na_2CO_3 (0.1N NaOH' da çözülmüş)

Lowry B₁ çözeltisi

% 0.5' lik CuSO_4 (%1'lik NaK-tartarat'ta çözülmüş)

Lowry B₂ çözeltisi

% 1,56 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

C-Buffer

9,8 ml A-Buffer (2% Na_2CO_3 ; 0,4% NaOH)

100 μl B1-Buffer (1,56% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

100 μl B2-Buffer (2% $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$)

2. Z-Buffer

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

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

10mM KCl

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

50mM 2-Merkapto Ethanol

3. Lityum Asetat (TE)

S. cerevisiae transformasyonunda hücre por geçirgenliğini arttırmak için kullanılmaktadır.

10 mM Tris pH:8.0, 1 mM EDTA pH:8.0 içerisinde 3.5 ml 250 mM Lityum asetat'ın çözdürülmesiyle elde edildi.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Selen ÇAKAS

Doğum Yeri : Balıkesir/Edremit

Doğum Tarihi : 20/01/1994

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat
Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen
Bilimleri Enstitüsü

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

Çakas S., Genç T., 2017. *In silico* BINDING MODEL OF TEC1 TRANSCRIPTION
FACTOR ON NTH1 PROMOTOR IN *Saccharomyces cerevisiae*. *IDDGC17*, 216.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Çağkent Özel Eğitim Kurumu (Biyoloji Öğretmeni), (2016-
2017).

İLETİŞİM

E-posta Adresi : selen.cakas.004@gmail.com