



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ



***SACCHAROMYCES CEREVISIAE* MAYA TÜRÜNDE NRG1
PROTEİNİNİN *NTH1* GEN EKSPRESYONUNA ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

Gamze DOĞAN

Biyoloji Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

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

***SACCHAROMYCES CEREVISIAE* MAYA TÜRÜNDE NRG1
PROTEİNİNİN *NTH1* GEN EKSPRESYONUNA ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

Gamze DOĞAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 10/11/2017

Tez Danışmanı:

Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ

ÇANAKKALE

Gamze DOĞAN tarafından Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ yönetiminde hazırlanan ve **10/11/2017** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “*Saccharomyces cerevisiae* Maya Türünde Nrg1 Proteininin *NTH1* Gen Ekspresyonuna Etkisinin Belirlenmesi” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ

Başkan

Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR

Üye

Doç. Dr. Burhan ŞEN

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: FYL-2016-829

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.

Gamze DOĞAN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince benden tecrübelerini, bilgilerini, yardımlarını eksik etmeyen, değerli vaktini benim için ayıran değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ'e;

Araştırmalarım boyunca gece-gündüz demeden benimle çalışan ve deneylerimde yardımlarını eksik etmeyen değerli hocalarım ve arkadaşım; Mehmet Şerafeddin SOLAK, Melih GÜNAY ve Burak SERVİLİ'ye;

Tez çalışmam süresince benden biran olsun maddi ve manevi yardımını eksik etmeyen, her karşılaştığım sorunda motivasyonumu artıran ve destekleyen, hakkını ödeyemeyeceğim çok değerli ve çok sevgili canım hocam Arş. Gör. Nihan AKINCI'ya;

Gerek tez çalışmamda gerek normal hayatın akışında dostluğun ne demek olduğunu gösteren, dolu dolu geçirdiğimiz bu iki yılda birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk ve kıvanç duyduğum ve duyacağım canım kardeşim, biricik dostum Selen ÇAKAS'a;

Bu çalışmayı FYL-2016-829 numaralı proje kapsamında destekleyen Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na;

Her zaman arkamda olan, aldığım kararlarda beni destekleyen, güven ve sevgilerini her daim hissettiren çok sevgili annem Zeynep, babam Mustafa, abim Ahmet Furkan DOĞAN'a; canım anneannem Ayşe, dedem Dursun DURSUN'a; sevgili teyzelerim Zuhâl, Nihal, Meral, Emine, Tuğba'ya; dayım Rıdvan'a; biricik kuzenlerim Melisa, Cemre, Kayra, Ömer'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Gamze DOĞAN
Çanakkale, Kasım 2017

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
Δ	Delta/Delesyon
%	Yüzde
g	Gravity
μm	Mikron
gr	Gram
mg	Miligram
μg	Mikrogram
ml	Mililitre
μl	Mikrolitre
M	Molar
mM	Milimolar
nmol	Nanomol
DA	Dalton
kDA	Kilodalton
Dk	Dakika
Bç	Baz çifti
Kbç	Kilobaz çifti
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
OD	Optik yoğunluk
DNA	Deoksi Ribonükleik Asit
lacZ	Beta-Galaktozidaz geni
ATP	Adenozin trifosfat
UDP	Uridin Di Fosfat
cAMP	Halkasal Adenozin Monofosfat
TE	Tris-EDTA
ONPG	O-Nitro-Fenil- β -D- Galaktozidaz
LiOAc	Lityum asetat
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
PEG	Polietilen glikol

URA

Urasil



ÖZET

SACCHAROMYCES CEREVISIAE MAYA TÜRÜNDE NRG1 PROTEİNİNİN NTH1 GEN EKSPRESYONUNA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Gamze DOĞAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ

10/11/2017, 58

İndirgenmemiş disakkarit olan trehaloz, *Saccharomyces cerevisiae* maya hücreleri tarafından enerji yedeği olarak normal koşullarda biriktirilir. Ayrıca farklı çevresel streslere karşı hücre içi trehaloz miktarının strese yanıt olarak artış gösterdiği bilinmektedir. Aynı zamanda, trehaloz, sinyal molekülü ve stres metaboliti olarak işlev görür. Stres koşulları sona erdiğinde ise biriktirilen trehalozun hızlı bir şekilde glukozaya yıkımı gerçekleşir. Trehaloz şekerinin sentezi TPS enzim kompleksi ile gerçekleşirken, yıkımı ise nötral trehalaz enzimi tarafından gerçekleşir ve hücre içerisindeki miktarı belli bir seviyede tutulur. Bu nedenle trehaloz metabolizmasıyla ilgili genlerin iyi bir şekilde kontrol edilmesi gerekir. Farklı stres koşullarında *NTH1* geninin transkripsiyonunun aktive olduğu ve bu aktivasyonun gerçekleşmesi içinde *NTH1* geninin promotor bölgesinde bulunan Stress Response Element (STRE) olarak adlandırılan nükleotid dizilerinin gerekli olduğu bilinmektedir. Transkripsiyonel represör aktivitesi olan Nrg1 proteini farklı streslere karşı oluşturulan cevaplarda ve karbon stresinde görev alan genlerin regülasyonunda görev almaktadır. Nrg1 proteininin STRE ve PDS elementlerine bağlanabildiği bilinmektedir. *NTH1* geninin promotor bölgesinde 3 adet olası Nrg1p bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Bu nedenle bu tez araştırmasında Nrg1 transkripsiyon faktörünün *NTH1* gen ekspresyonunun regülasyonundaki rolü incelendi. Yapılan biyoinformatik çalışmalarla Nrg1 proteininin *NTH1* promotorunda bulunan STRE elementlerine yaklaştığı gözlemlendi. Çalışmada *SUC2-LacZ* ve *NTH1-LacZ* gen füzyonu içeren plazmidler, çoğaltılıp saflaştırıldıktan sonra yaban tip ve $\Delta nrg1$ mutasyonu bulunduran *S. cerevisiae* maya suşlarına transfer edildi. Azot stresi koşullarında *NTH1* gen ekspresyonunun arttığı bilinmektedir. Bu nedenle farklı azot

kaynaklarında üretilen transformant *S. cerevisiae* maya hücrelerinden örnekler alınarak, *NTH1* gen aktivasyonu ve biriktirilen trehaloz miktarı enzimatik yöntemle belirlendi. Araştırmada Nrg1 proteininin normal şartlarda *NTH1* transkripsiyonunun baskılanması için gerekli olduğu bulundu.

Anahtar sözcükler: *Saccharomyces cerevisiae*, Nrg1p, *NTH1*, Trehaloz, TPS



ABSTRACT

THE EFFECT OF NRG1 PROTEIN ON *NTH1* GENE EXPRESSION IN YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Gamze DOĞAN

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Animal Science

Advisor : Assist. Prof. Dr. Tülay TURGUT GENÇ

10/11/2017, 58

Trehalose, an unreduced disaccharide, is deposited by *Saccharomyces cerevisiae* under normal conditions as energy reserve. It is known that the amount of intracellular trehalose increases in response to environmental stress. When stress conditions ended, accumulated trehalose rapidly degrades to glucose. Synthesis of the trehalose is effected by the TPS enzyme complex, whereas degradation is effected by the neutral trehalase enzyme and the amount of trehalose in the cell is maintained at a certain level. Under different stress conditions, it is known that the transcription of the *NTH1* gene is active and the nucleotide sequences, called Stress Response Element (STRE), are required for this activation. It is known that Nrg1 protein can bind to STRE and PDS elements. There are 3 possible Nrg1p binding sites in the promoter region of the *NTH1* gene. Therefore, in this thesis, the role of the Nrg1p in the regulation of *NTH1* expression was examined. The bioinformatics studies showed that the Nrg1p approached to the STRE elements in the *NTH1* promoter. In this study, after amplification of plasmids containing the *NTH1*-LacZ and *SUC2*-LacZ gene fusions were transferred into wild-type and $\Delta nrg1$ *S. cerevisiae* yeast strains. It is known that expression of *NTH1* is increased under nitrogen stress conditions. Therefore, the *NTH1* activation and the amount of trehalose accumulated were determined by enzymatic methods using samples from transformant *S. cerevisiae* yeast cells produced in different nitrogen sources. In this study, it was found that Nrg1p is required for suppression of *NTH1* transcription under normal conditions.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Nrg1p, *NTH1*, Trehalose

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	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1. Glukoz Sinyal Sistemi.....	4
2.2. Azot Sinyal Sistemi.....	9
2.3. Trehaloz Metabolizması.....	14
2.4. <i>NTH1</i> Gen Yapısı ve İşlevi	17
2.5. <i>NRG1</i> Gen Yapısı ve İşlevi.....	18
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Maya Suşları.....	20
3.2. Maya Suşların Üreme Eğrilerinin Oluşturulması.....	20
3.3. Plazmidlerin Yapıları ve Özellikleri	20
3.4. Plazmidlerin Çoğaltılması ve Maya Suşlarına Transformasyonu	21
3.5. Maya Transformant Hücrelerinin Üreme Koşulları ve Örnekleme Yapımı	21
3.6. Beta-Galaktozidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	22
3.7. Hücre İçi Trehaloz Miktarının Belirlenmesi	23
3.8. Biyoinformatik Araştırmalarda Faydalanılan Programlar ve Kaynaklar	23
BÖLÜM 4	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	25
4.1. Maya Suşların İkilenme Süreleri.....	25
4.2. <i>Nrg1</i> Proteinin <i>NTH1</i> Gen Ekspresyonuna Etkisi.....	30
4.3. <i>Nrg1</i> Proteinin Hücre İçi Trehaloz Birikimine Etkisi	34
4.4. Biyoinformatik Çalışmalardan Alınan Sonuçlar	37

BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	46
KAYNAKLAR	50
EKLERİ	I
EK 1. Araştırmada Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması.....	II
EK 2. Araştırmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	IV
ÖZGEÇMİŞ	V



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Düşük glukoz sinyal iletim yolağı	6
Şekil 2.2. Normal glukoz ve yüksek glukoz sinyal iletim yolağı	8
Şekil 2.3. Kuvvetli azot varlığında sinyal iletimi	11
Şekil 2.4. Düşük azot ve rapamisin varlığında sinyal iletimi	13
Şekil 2.5. Trehaloz sentezi	16
Şekil 2.6. Trehaloz yıkımı	17
Şekil 2.7. Nrg1 proteinin hücre içi lokalizasyonu	19
Şekil 4.1. Yaban tip maya suşunun üreme eğrisi	26
Şekil 4.2. <i>Δnrg1</i> mutant maya suşunun üreme eğrisi	27
Şekil 4.3. Yaban tip maya suşunun ikilenme süresi (t_d) ve spesifik büyüme oranı (μ)	28
Şekil 4.4. <i>Δnrg1</i> mutant maya suşunun ikilenme süresi (t_d) ve spesifik büyüme oranı (μ)	29
Şekil 4.5. Stres öncesi yaban tip ve <i>Δnrg1</i> mutant maya hücrelerinde <i>NTH1</i> gen ifadesi	31
Şekil 4.6. Azot açlığında yaban tip ve <i>Δnrg1</i> mutant maya hücrelerinde <i>NTH1</i> gen ifadesi	32
Şekil 4.7. Kuvvetli azot kaynağında yaban tip ve <i>Δnrg1</i> mutant maya hücrelerinde <i>NTH1</i> gen ifadesi	33
Şekil 4.8. Stres öncesi yaban tip ve <i>Δnrg1</i> mutant maya hücrelerinde trehaloz birikimi	35
Şekil 4.9. Azot açlığında yaban tip ve <i>Δnrg1</i> mutant maya hücrelerinde trehaloz birikimi	36
Şekil 4.10. Kuvvetli azot kaynağında yaban tip ve <i>Δnrg1</i> mutant maya hücrelerinde trehaloz birikimi	36
Şekil 4.11. Nrg1 proteininin JASPAR TF Bağlanma bölge profili	37
Şekil 4.12. <i>NTH1</i> promotörü ve üzerindeki olası Nrg1p bağlanma bölgeleri (5'-CCCCT-3')	38
Şekil 4.13. Nrg1p amino asit dizisi ve çinko-parmak DNA bağlanma bölgesi	38
Şekil 4.14. <i>NTH1</i> promotörü ve Nrg1p bağlanma modeli	40
Şekil 4.15. Arg ¹⁸ – G ₉₆ atomları arasındaki uzaklık	41
Şekil 4.16. Arg ⁸ – G ₉₆ atomları arasındaki uzaklık	42
Şekil 4.17. His ¹⁵ – G ₉₇ atomları arasındaki uzaklık	43
Şekil 4.18. His ¹⁵ – G ₉₈ atomları arasındaki uzaklık	44
Şekil 4.19. Thr ¹² – A ₉₉ atomları arasındaki uzaklık	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. Trehaloz metabolizmasında görev alan genler ve kodladıkları enzimler	15
Çizelge 4.1. Farklı azot kaynaklarının <i>SUC2</i> gen ekspresyonuna etkisi	34



BÖLÜM 1

GİRİŞ

Mayalar, tek hücreli ökaryotik mikroorganizma olup, fungi aleminin Ascomycetes sınıfında yer almaktadır. Morfolojik terim olarak ‘Yeast’ bir hücreli mantar anlamına gelmektedir. Hem eşeyli hem de eşeysiz üreyebilme yeteneğine sahip olan mayalar çoğunlukla tomurcuklanma (eşeysiz üremenin bir şekli) ile ürerler.

Saccharomyces cerevisiae, mayaların en önemli ve en çok bilinen türüdür. Latince “*Saccharomyces*” şeker fungusu anlamını taşımaktadır. Heterotrof canlılar olduklarından dolayı besinlerini dışarıdan alırlar. En çok tercih ettikleri besin kaynaklarının başında glukoz gelmektedir. *S. cerevisiae*'nin glukozu parçalaması iki metabolik yolak ile gerçekleşir. Bunlardan birincisi oksijenli solunum, diğeri ise oksijensiz solunum veya mayalara özgü adı ile alkolik fermentasyondur. Bulunduğu ortamda oksijen olmadığı durumda oksijensiz solunum ile glukozu parçalayarak CO₂ ve etil alkol oluşturur. Fermentasyon sonucunda oluşturulan karbon dioksit, yiyecek üretiminde örneğin ekmek yapımında hamurun mayalanmasında kullanılırken, yine fermentasyon sonucunda oluşturulan etil alkol bira, şarap gibi içeceklerin üretiminde kullanılır (Madigan ve Martinko, 2010). *S. cerevisiae* gıda endüstrisindeki öneminin yanında bilimsel çalışmalarda da öneme sahip bir mikroorganizmadır. *S. cerevisiae*'nin küçük olmakla birlikte kısa jenerasyon süresine sahip olması, kolay kültüre edilebilir olması, mayoz ve mitoz bölünmenin kolaylıkla incelenebilmesi, homolog rekombinasyon yoluyla yeni genlerin eklenip çıkarılabilmesi ve transformasyon yapılabilir olması gibi nedenlerden dolayı genetik çalışmalarda model organizma olarak kullanılır.

S. cerevisiae genom dizilimi yapılmış olan ilk ökaryotik mikroorganizma olması, genetik ve metabolik yollar ve bu yollarda görev alan faktörlerin diğer canlılarla benzerlik göstermesi, insanda yapılabilecek genetik çalışmalarda kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır. *S. cerevisiae* genomu yaklaşık 12.068 kilobaz içeren 16 kromozomdan oluşur (Goffeau ve ark., 1996). Genomun %70'ini açık okuma çerçeveleri (ORF: open reading frames) oluşturmakta olup ortamala ORF uzunluğu 1450 baz çiftidir (Dujon, 1996). Genomdaki intron oranı %4 olup yüksek ökaryotik organizmalara göre oldukça düşük seviyededir. Genomda proteinleri kodlayan yaklaşık 5885 gen bulunmaktadır. Hücrenin içinde görevi olan yaklaşık 430 protein vardır ve 250 protein yapısal role sahiptir. Bu proteinlerin %11'i metabolizma, %3'ü DNA replikasyonu, %3'ü enerji üretimi ve

depolanması, %7'si transkripsiyon ve %6'sı da translasyona ayrılmıştır. (Goffeau ve ark., 1996).

Tokyo Teknoloji Enstitüsü'nden Yoshinori Ohsumi ve çalışma arkadaşları *S. cerevisiae* otofaji genleri ile ilişkili yaptıkları çalışma ile 2016'da Nobel tıp ödülünü almışlardır. Çalışmanın sonucunda otofajide rol oynayan genleri tespit etmişler ve *S. cerevisiae*'deki otofaji mekanizmasından yola çıkarak insandaki hücrelerde de bu mekanizmanın benzer şekilde işlediğini ortaya çıkarmışlardır. Otofaji mekanizmasının sağlıklı şekilde işlemesi kanser ve diyabetik hastalıkların engellenmesini sağlar. Bu mekanizmada rol oynayan genlerin tanımlanması ve daha sonra çeşitli hastalıkların önlenmesine yönelik yapılacak çalışmalara öncülük etmesi önem arz etmektedir.

Mikroorganizmalar, doğal ortamlarında hayatta kalabilmek için besin bulunabilirliği, sıcaklık, pH, ozmolarite ve oksidatif ajanların varlığı gibi çevresel değişikliklere adapte olmak zorundadır. Mikroorganizmaların adaptasyon mekanizmalarından biri gen ifadesini değiştirmektir (Vyas ve ark., 2005). *S. cerevisiae*, gen setlerinin ifadesini hızla değiştirerek çevresel strese yanıt oluşturmaktadır. Farklı streslere özgü ortaya çıkan gen ekspresyon programı, etkilenen genlere, RNA seviyelerindeki değişikliğin büyüklüğüne ve ekspresyonun zamansal değişimlerine göre ayarlanır. Bununla birlikte, genlerin büyük bir kısmı, çeşitli çevresel değişikliklere karşı 'Çevresel Stres Yanıtı' (ESR, Environmental Stress Response) olarak adlandırılan benzer yanıtı oluşturmaktadır. ESR yaklaşık 900 genin aktifleştirilmesini ve yaklaşık 500 genin baskılanmasını içeren yüksek oranda kontrol edilen bir sistemdir. İndüklenen genlerin çoğu, enerjinin üretilmesi veya strese karşı korumada görev alır. Baskılanan genlerin birçoğu da protein sentezi ve büyümede görev alır. Stres tepkilerinin en belirgin özelliği (besin değişikliklerine adaptasyon haricinde), gen ifadesinde yapılan değişikliğin hızlı fakat geçici olmasıdır (Gasch ve ark., 2000; Vyas ve ark., 2005). Hücrenin değişen ortama uyum sağlamasıyla, gen ifadesi, stres öncesi gözlemlenen gen ifadesine yakın bir değere dönüşür. *S. cerevisiae*'de stres yanıt genleri birçok mekanizma tarafından düzenlenir. Bu mekanizmalardan bazıları belirli stres koşullarına özgüdür; örneğin, *YAP1* (Yeast AP-1) transkripsiyonel aktivatörü, oksidatif strese yanıtta etkin rol alırken *HOT1* (High-Osmolarity-Induced Transcription 1) transkripsiyon faktörü ozmotik stres koşullarında etkindir (Vyas ve ark., 2005).

S. cerevisiae maya hücreleri değişken çevre koşullarının oluşturduğu olumsuz çevre koşullarına karşı koyabilmek veya uyum sağlayabilmek için trehaloz biriktirmektedir. Stres koşulları ortadan kalktığında ise trehalozu parçalayarak glukoz açığa çıkarmakta ve bu molekülü enerji kaynağı olarak kullanmaktadır. Trehaloz, maya hücrelerinde olduğu gibi

bakteri ve bitkilerde de stres koruyucu bir metabolit olarak kullanılmaktadır (Singer ve Lindquist, 1998; François ve Parrou, 2001).

S. cerevisiae'de trehaloz biyosentezi Trehaloz Fosfat Sentaz (TPS) enzim kompleksi üzerinden gerçekleştirilir. Hücre içinde biriktirilen veya hücre dışından alınan trehalozun hidrolizi ise trehalaz enzimleri tarafından yapılır. *S. cerevisiae*'de nötral ve asidik trehalaz olmak üzere iki trehalaz enzimi bulunmaktadır. Nötral trehalaz enzimi *NTH1* geni tarafından, asidik trehalaz enzimi ise *ATH1* geni tarafından kodlanmaktadır (François ve Parrou, 2001). Trehaloz biyosentezi sırasında ara bileşik olarak oluşan trehaloz-6-fosfat, glukozun hücre içine alınması ve glikolitik yolun kontrolü için önemlidir. Bu bileşiğin glukozu fosforile eden hekzokinaz enzimlerinin inhibitörü olarak görev yaptığı ve bu enzimlere etki ederek glukozun kontrollü bir şekilde glikolitik yola girişini sağladığı bilinmektedir (Thevelein ve Hohmann, 1995). Bu sebepten dolayı trehaloz biyosentezi normal koşullarda bazal seviyede yapılmaktadır. Hücre içi trehaloz miktarının belirli bir seviyede tutulması gerektiğinden trehalozun biyosentezinde ve hidrolizinde görev alan genlerin kontrollü bir şekilde çalışması gerekmektedir. Trehaloz metabolik yolların doğrudan veya dolaylı olarak düzenlenmesinde rol almaktadır. Ayrıca glikolitik yolda regülatör olarak görev aldığı da bilinmektedir (Attfield, 1987; Thevelein ve Hohmann, 1995). Isı şoku ile muamele edilen *S. cerevisiae* hücrelerinde *NTH1* gen ifadesi ve Nth1 proteininin enzimatik aktivitesi artmaktadır. Stress Response Element (STRE) olarak adlandırılan (CCCCT/AGGGG) nükleotid dizilerine, genel strese yanıtta rol alan transkripsiyon faktörleri bağlanmaktadır. *NTH1* geninin transkripsiyonel aktivasyonunda promotor bölgesinde bulunan STRE dizilerin önemli rol oynadığı bilinmektedir. *NTH1* geninin transkripsiyonel aktivasyonu oksidatif stres, metal stresi ve ısı stresinde de artmaktadır (Zahringer ve ark., 1997). Bu genin transkripsiyonel düzenlenmesinde görev alan genlerin bazıları hala belirlenememiştir. Bu nedenle tez çalışmasında daha önce *NTH1* geni ile ilişkisi incelenmemiş ancak transkripsiyonel düzenleyicisi olabileceği düşünülen Nrg1 proteininin, *NTH1* geninin transkripsiyonuna olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Glukoz Sinyal Sistemi

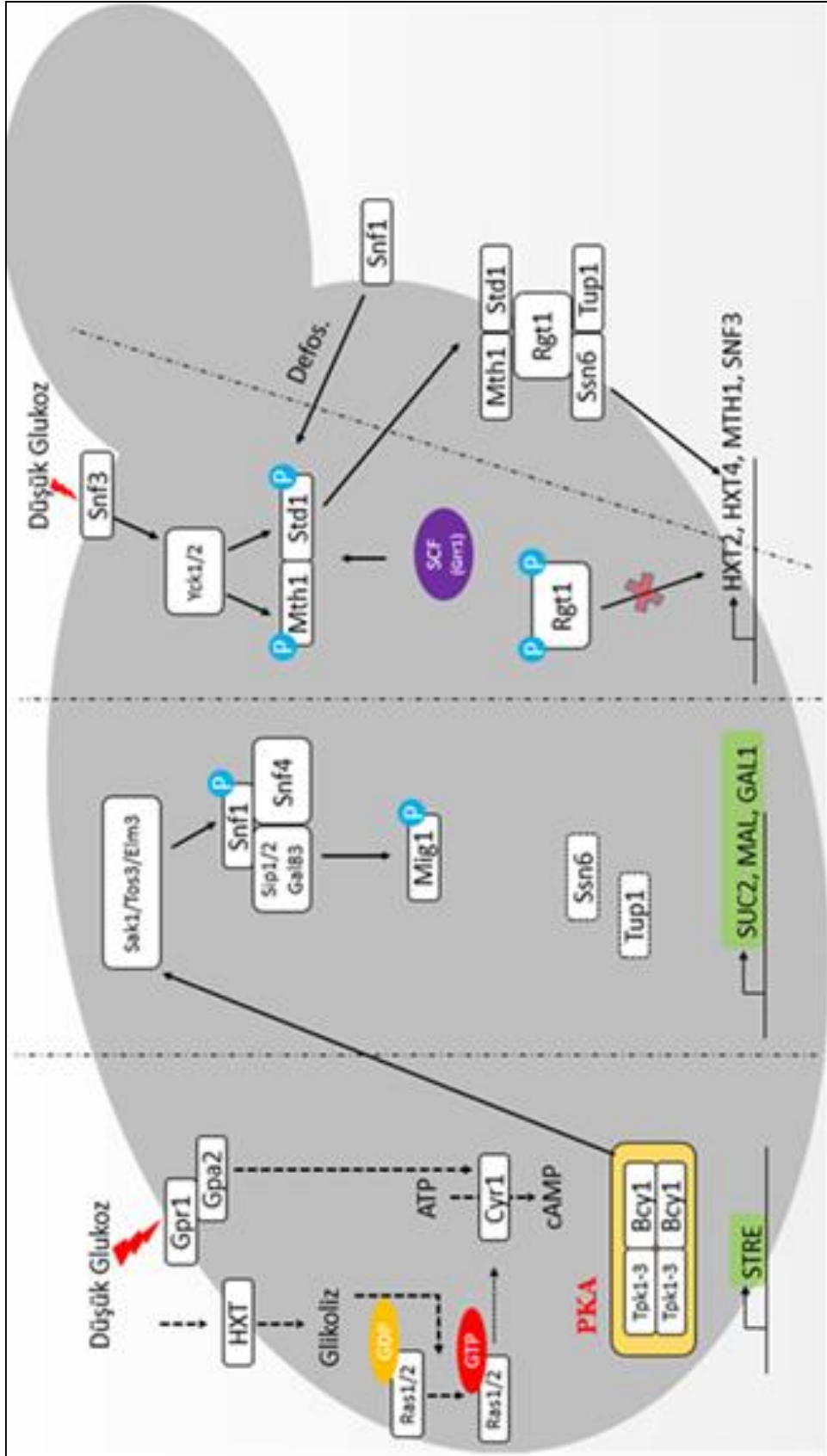
Glukoz molekülü *S. cerevisiae* hücreleri tarafından tercih edilen bir karbon ve enerji kaynağıdır. *S. cerevisiae* hücrelerinin üreme ortamında bulunan glukozun miktarı hücre içinde farklı sinyal iletim yollarının aktivasyonunu sağlar (Belinchon ve Gancedo, 2007). Üreme ortamında bulunan glikozun miktarı %2'den fazla olduğunda galaktoz, sukroz, gliserol, etanol, maltoz gibi alternatif enerji ve karbon kaynaklarının kullanımı için gerekli olan genlerin transkripsiyonu baskılanmaktadır. Bu durum mayalarda glukoz baskılaması (glucose repression) olarak adlandırılmaktadır (Gancedo, 1998). Nonfermentatif karbon kaynaklarının (gliserol, laktat gibi) bulunduğu ortamda üretilen *S. cerevisiae* maya hücreleri glukoz içeren üreme ortamına geçirildiklerinde, genlerin %30'nun ifadesinde değişiklik meydana gelmektedir (DeRisi ve ark. 1997; Wang ve ark., 2004). Nonfermentatif olarak üretilen maya hücrelerinin üreme ortamına ilave edilen glukoz sonrasında maya hücrelerinin üreme hızında artış meydana gelmektedir. Bütün metabolik faaliyetler yeniden programlanarak hücreler fermantatif üreme moduna girmektedir. *S. cerevisiae* maya türünde glukoz sensör-sinyal sistemleri genel olarak cAMP-Protein Kinaz A sinyal sistemi, Rgt2p/Snf3p sinyal sistemi ve Snf1 kinaz sinyal sistemi olmak üzere 3 grupta toplanmaktadır.

cAMP-Protein Kinaz A (PKA) sinyal iletim sistemi hücre zarında bulunan Gpr1p (G-protein coupled receptor 1) sensör proteini ile aktive edilmektedir. Glukoz konsantrasyonu yüksek olduğunda Gpr1p hızlı bir şekilde hücre içi cAMP sentezini artırılmasını sağlar. Yüksek konsantrasyona ulaşan cAMP ise PKA'yı aktive eder. Aktif PKA hedef proteinlerini fosforlayarak aktivasyonlarını/inaktivasyonlarını sağlar ve böylece glukoz sinyaline hücresel yanıt oluşturulur (Santangelo, 2006; Gancedo, 1998).

S. cerevisiae hücre zarında bulunan Rgt2p ve Snf3p, hekzoz taşıyıcı proteinler (Hexose transporters, Hxtp) ailesinde yer almalarına rağmen asıl görevleri glukoz sinyal iletimidir. Rgt2p yüksek glukoz sinyalinin iletiminde, Snf3p ise düşük glukoz sinyalinin iletiminde görev almaktadır. Rgt2p/Snf3p sinyal iletimi çinko-parmak DNA bağlanma motifine sahip Rgt1p transkripsiyon faktörü aracılığıyla gerçekleşmektedir. Üreme ortamında glukoz tükendiğinde veya konsantrasyonu düştüğünde (%0.1), Snf3p (Sucrose non-fermenting 3) membran sensörü aktif hale gelir ve hücre içinde düşük glukoz sinyali oluşturur. Snf3p'nin oluşturmuş olduğu sinyal ile Rgt1p transkripsiyon faktörü Ssn6p- Tup1p kompleksine,

Mth1p/Std1p aracılığıyla bağlanarak represör kompleksi oluşturur ve HXT genlerinin promotorlarına bağlanarak baskılar (Shashkova ve ark., 2015). Hücre dışı glukoz miktarı yüksek olduğunda (%1'den daha fazla) Rgt2p (Restoration of glucose transport 2) membran sensörü aktive olur ve hücre içinde yüksek glukoz sinyali oluşturulur. Rgt2p'nin oluşturmuş olduğu sinyalle Rgt1p hiperfosforile edilerek HXT genlerinin üzerindeki baskısı kaldırılır ve genler aktive edilerek glukozun hücre içine transportu başlar (Flick ve ark., 2003).

S.cerevisiae maya türünde, Snf1p *SNF1* (Sucrose nonfermenting) geni tarafından kodlanır. *SNF1* geninin sistematik adı YDR477W olup 4. kromozom üzerinde lokalize olmaktadır. Snf1p, 4 alt birime (Snf4, Sip1, Sip2 ve Gal83) sahip olup heterodinamik bir yapıdadır (Shashkova ve ark., 2015). Snf1p kinazlar metabolik regülasyonda, glikojen birikiminde, stres yanıtı oluşturulmasında, mayoz bölünmede ve sporulasyonda, invazif büyümede ve yaşlanmada rol oynamaktadır (Vyas ve ark., 2001). *S.cerevisiae* maya türünde, Snf1p glukoz sinyal iletim yolağının anahtar bir bileşenidir. Glukoz açlığına yanıtta birçok glukoz baskılı genin transkripsiyonu için önemlidir. Snf1p'nin glukoz varlığına yanıtta transkripsiyonel aktivatörlerin ve represörlerin aktivasyon ve fonksiyonlarını düzenlediği gösterilmiştir (Vyas ve ark., 2001). Snf1p'nin transkripsiyonu düzenlediği bu mekanizmalardan bir tanesi transkripsiyonel baskılayıcı Nrg1p'nin fonksiyonunun düzenlenmesidir (Vyas ve ark., 2001), diğeri ise transkripsiyonel baskılayıcı Mig1p'nin fonksiyonunun düzenlenmesidir. Glukoz miktarı düştüğünde, Snf1p kompleksi aktive olurken glukoz miktarı arttığında inaktif olur. Snf1p'nin inaktivasyonu Mig1p'nin aktif olmasına neden olur. Aktif Mig1p, Ssn6-Tup1 korepresörü ile kompleks oluşturur ve alternatif karbon kaynaklarının kullanımı ile ilgili genlere bağlanarak onların baskılanmasını sağlar. Mig1p inaktif olduğunda Ssn6-Tup1 (Cyc8-Tup1) ile kompleks oluşturamaz ve hedef genleri baskılayamaz. Böylece alternatif karbon kaynaklarının kullanımı ile ilgili genler aktif hale gelir (Shashkova ve ark., 2015) (Şekil 2.1).

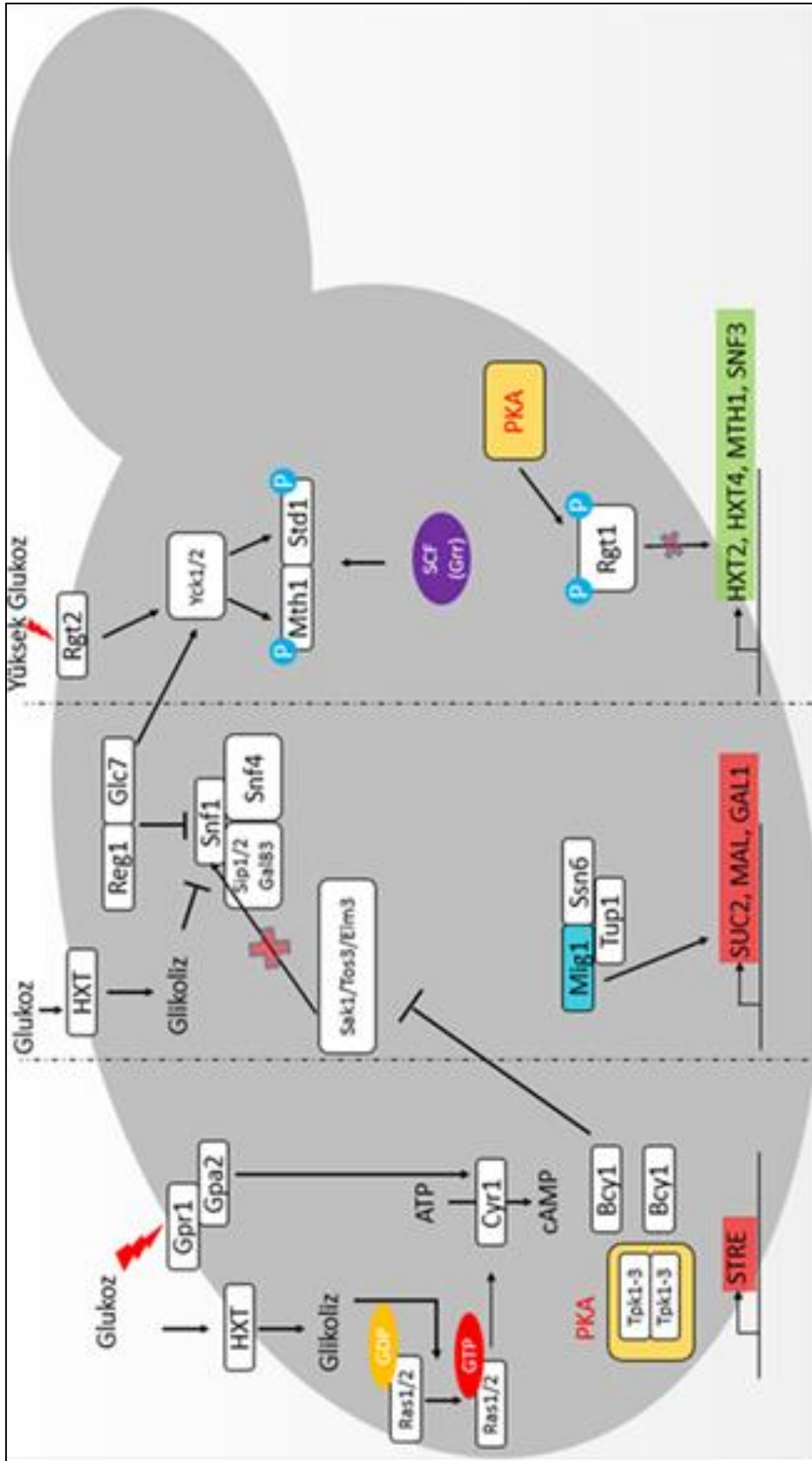


Şekil 2.1. Düşük glukoz sinyal iletim yolağı

Mig1p DNA'ya bağlanabilen bir transkripsiyon faktörü olup çinko parmak motifi içermektedir. Mig1p, 7. kromozom üzerinde bulunan *MIG1* (Multicopy Inhibitor of *GALI*, sistematik adı YGL035C) geni tarafından kodlanır. Transkripsiyonel represör olan Mig1p, alternatif karbon kaynaklarının taşınmasında ve metabolizmasında görevli genlerin ifadesini kontrol eder.

Düşük glukoz koşullarında SNF kompleksi, Sak1p/Tos3p/Elm1p tarafından fosforile edilerek aktif hale gelir. Fosforlanmış olan Snf1p-Snf4p, Mig1p'nin represör aktivitesini inhibe eder ve çekirdekten sitoplazmaya geçişine aracılık eder böylece, alternatif karbon kaynaklarının kullanımı için gerekli olan genler derepres olur. SNF kompleksinin (Snf1-Snf4 kinaz) aktivitesi glukoz miktarına göre düzenlenir ve düzenleme için gerekli sinyal AMP/ATP oranı ile oluşturulur. Üreme ortamında yüksek oranda glukoz varlığı hücrelerin glukozu parçalayarak ATP sentezlenmesini sağlar. Bu durum Snf1-Snf4 protein kinazlarının aktif olmasını engeller. Snf1p'nin inaktif olması ile Mig1p defosforile edilerek çekirdekte kalması sağlanır. Mig1p, Ssn6-Tup1 korepresörü ile kompleks oluşturur ve *GALI*, *SUC2*, *MAL* gibi hedef genlerin promotorlarına bağlanarak onları baskılar (Shashkova ve ark., 2015) (Şekil 2.2). *TPS1* ve *NTH1* genlerinin ifadesi glukoz tarafından düzenlenir. Bu düzenleme transkripsiyonel ve posttranslasyonel olarak gerçekleştirilir (François ve ark., 1991; Panek, 1991).

MSN2, 13. kromozom üzerinde yer alan sistematik adı YMR037C olan bir genidir. *MSN4*, 11. kromozom üzerinde bulunan sistematik adı YKL062W olan bir genidir. *S. cerevisiae*'da *MSN2* ve *MSN4* genel stres yanıtını düzenleyen Msn2/4p transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır (Martinez-Pastor ve ark., 1996; Schmitt ve McEntee, 1996). Msn2p ve Msn4p birçok strese (ısı şoku, ozmotik stres, oksidatif stres, düşük pH, glukoz açlığı, sorbik asit, yüksek etil alkol konsantrasyonu) yanıtta ~200 genin promotor bölgelerinde bulunan STRE elementlerine (5'-CCCCT-3') bağlanarak gen ifadelerini düzenler (Martinez-Pastor ve ark., 1996; Gasch ve ark., 2000). Her iki protein C-terminalinde, STRE elementini tanıyan bir çinko parmak bağlama alanı içerir (Martinez-Pastor ve ark., 1996; Schmitt ve McEntee, 1996).



Şekil 2.2. Normal glukoz ve yüksek glukoz sinyal iletim yolağı

Msn2p'nin DNA bağlanması stres ve cAMP-bağımlı protein kinaz (PKA, Tpk1p, Tpk2p ve Tpk3p ve düzenleyici altbirim Bcylp'den oluşur) ve Gsk3p kinazlar tarafından düzenlendiği düşünülmektedir (Gorner ve ark., 1998; Hirata ve ark., 2003). Çinko parmakla bitişik olan Msn2p ve Msn4p, PKA fosforilasyonu ile inhibe edilen ve protein fosfataz 1 (*PPI*) defosforilasyonu ile aktive edilen bir nükleer lokalizasyon sinyali içerir (Gorner ve ark., 1998; Gorner ve ark., 2002; De Wever ve ark., 2005). Normal koşullar altında, Msn2p ve Msn4p sitoplazmada bulunur (Gorner ve ark., 1998). Stres koşullarında, Msn2/4p hiperfosforile olur, çekirdeğe relokale olur ve sonra periyodik bir nükleositoplazmik salınım davranışı sergiler (Gorner ve ark., 1998; Garreau ve ark., 2000; Jacquet ve ark., 2003). Msn2p'nin nükleer eksportu Msn5p'nin eksportuna bağlıdır ve nükleer lokalizasyon import ve eksport seviyelerinin her ikisi de PKA tarafından düzenlenir (Gorner ve ark., 1998; Gorner ve ark., 2002; Jacquet ve ark., 2003).

2.2. Azot Sinyal Sistemi

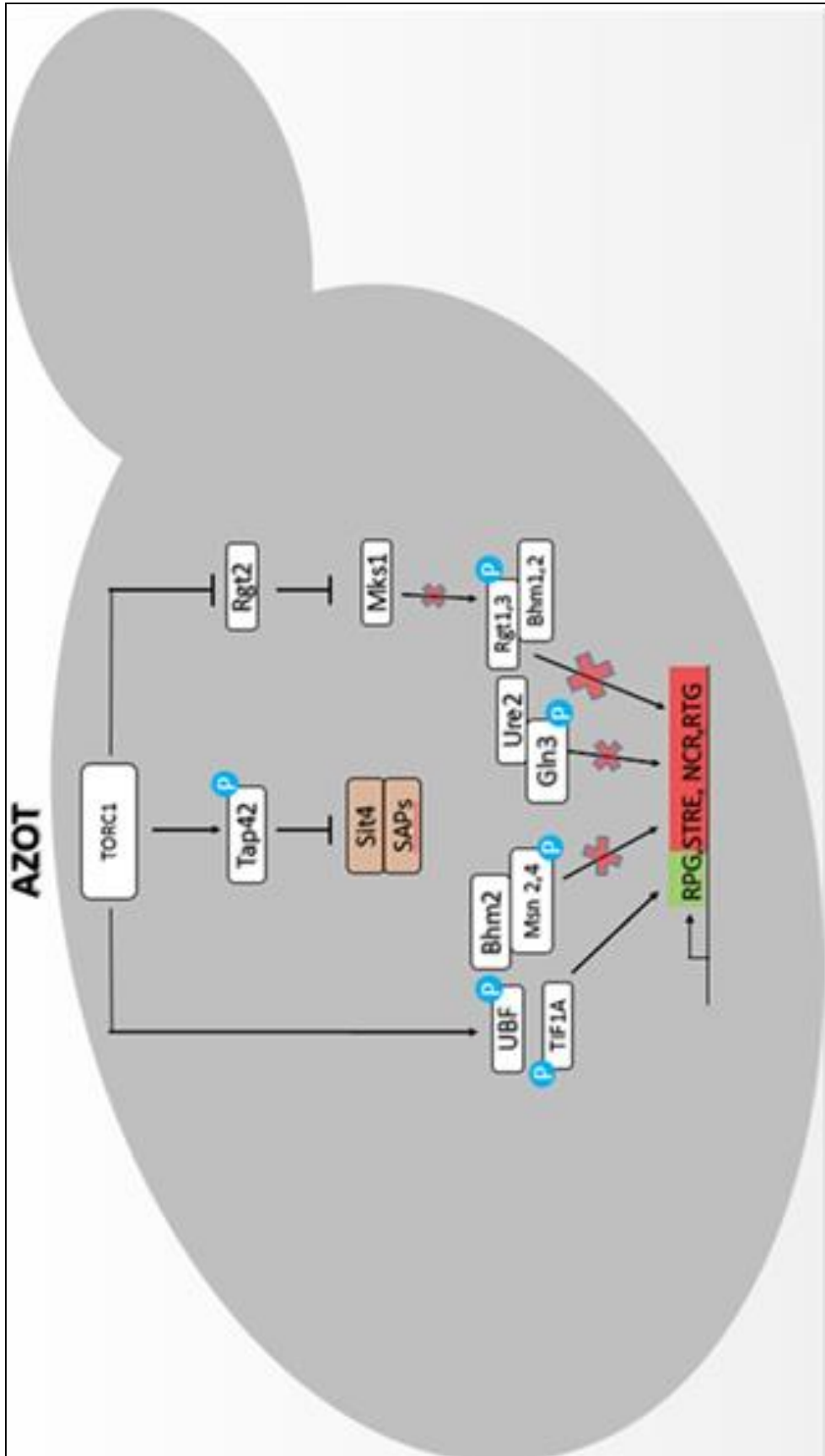
S. cerevisiae'de üreme ortamındaki farklı azot kaynaklarının algılanması (sensör sistemi), hücre içine transportu ve kullanımı bir çeşit sinyal iletim mekanizmasıdır. Bu mekanizmanın çalışması aktif protein kinazlar ile aktivatör ve represörlerin kontrolü ile gerçekleştirilir (Magasanik ve Kaiser, 2002). Amonyum tuzları ve glutamin *S. cerevisiae* tarafından öncelikli olarak tercih edilen azot kaynaklarıdır. Üreme ortamında bu bileşiklerin eksik olması durumunda azot açlığı oluşur. Bu durumda hücreler ortamda bulunan başka azot içerikli bileşikler de azot kaynağı olarak kullanabilmektedir. Bu tip yapısında azot bulduran ve kaynak olarak kullanılabilen bileşiklere alternatif azot kaynakları (serbest aminoasitler, prolin, allantion, üre gibi) denir (Ter Schure ve ark., 2000). Üreme ortamındaki azot kaynağına göre yapılan microarray analizinde, *S. cerevisiae* genlerinin %25'nin gen ifadesinin değiştiği belirlenmiştir (Usaitte ve ark., 2006). *S. cerevisiae* mayasında ~5885 tane protein kodlayan gen olduğunu kabul edecek olursak %25 lik oran 1471 gene tekabül etmektedir.

Maya hücreleri, azot bileşiklerinin varlığını ve kullanılabilirliğini tanıyarak genetik ve metabolik düzenlemeler yapmaktadır. Azot sınırlı olduğunda, büyüme yavaşlar, ribozomal biyogenez ve translasyonda azalma meydana gelir. Bu durum hücre döngüsünün G₁ fazının uzamasına neden olur (Brauer ve ark., 2008). Aşırı azot açlığı durumunda, hücreler diğer tüm gıdaların fazla olmasına karşın büyümeyi durdurur ve azota özgü bir durağan faza girer (Klosinska ve ark., 2011).

S. cerevisiae'de besin açlığına verilen yanıtlarda TOR (Target of Rapamisin) yolağı önemli role sahiptir. Maya hücrelerine rapamisin uygulaması yapılması, hücre döngüsünün G₁ fazında duraksamasına, protein sentezinin baskılanmasına, glikojen birikiminin ve otofajinin artmasına neden olmaktadır (Rohde ve Cardenas, 2003).

Mayaloarda, TOR (Tor1p, Tor2p) proteinleri özellikle azot ile karbon miktarını ve kalitesini algılayarak farklı bir sinyalin başlamasına neden olur (Cardenas ve ark., 1999). *S. cerevisiae*'da iki yol ile azot regülasyonu yapılır; bunlardan ilki azot varlığında, azotun kalitesini ve miktarını belirleyen ayırıcı yol, diğeri ise azotun hiç bulunmadığı durumda cevap oluşturulan iz yoludur. GATA (Gln3p ve Gat1p/Nil1p) ve Ure2p transkripsiyon faktörleri nitrojen kalitesine göre hedef genlerin transkripsiyonlarının aktivasyonuna neden olur (Courchesne ve Magasanik, 1988; Stanbrough ve ark., 1995). Glutamin ve amonyum tuzları *S. cerevisiae* maya suşları tarafından tercih edilen güçlü nitrojen kaynaklarıdır. Glutamin ayrıca azot metabolizmasında görev alır ve TOR kompleksinin olası bir düzenleyicisi olarak görev yapar. Glutamin ya da başka bir kuvvetli azot kaynağı varlığında, TOR kompleksi Gln3p, Gat1p, Rtg1p ve Msn2/4p vb. transkripsiyon faktörleri inaktif bir şekilde tutar. Gln3p, NCR (Nitrogen Catabolite Repression) tarafından inhibe edilen genlerin ve Açlık Yanıt Genlerinin (Starvation Response Genes, SRG) aktifleştirilmesinde görev alır. Glukoz ve azot birbirinden bağımsız olarak Gln3p transkripsiyon faktörünün düzenlenmesinde görev alır. Her ikisinde Gln3p'nin nukleer lokalizasyonunu belirler. Güçlü azot varlığında, TOR yolağına bağlı olarak Gln3p fosforlanarak sitoplazmada kalır, defosforile olması durumunda nukleusa geçer ve SRG ve NCR genlerine bağlanarak onları aktive eder (Şekil 2.3).

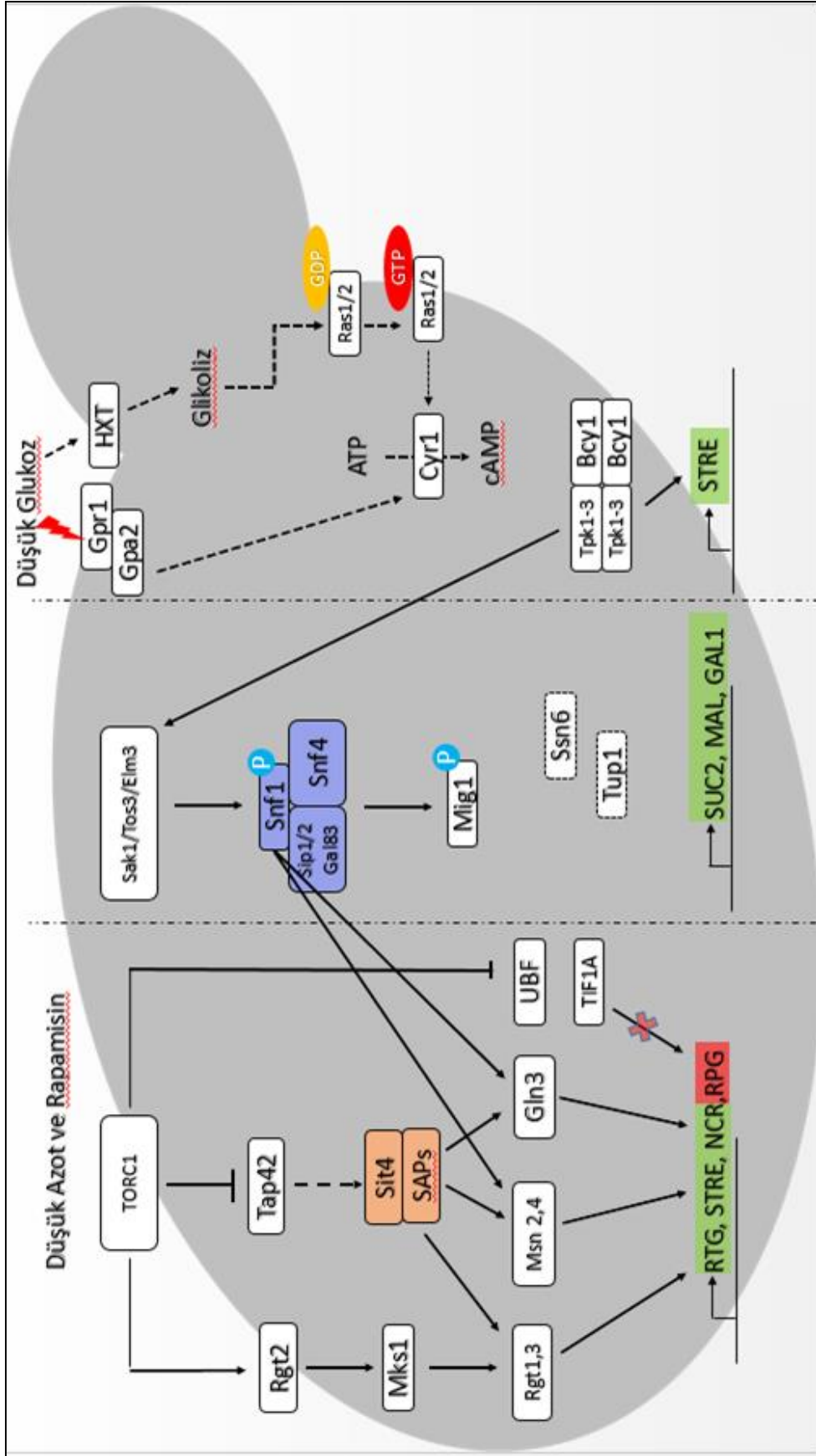
Yüksek glukoz varlığında, Snf1p baskılanır, düşük glukozda ise bu baskılama ortadan kalkar. Gln3p'nin, Snf1p ve TOR tarafından fosforilasyonu, Gln3p'yi zıt yollarla düzenler. Gln3p, TOR tarafından fosforile edildiğinde sitoplazmada kalırken, Snf1 tarafından fosforile edildiğinde çekirdekte lokalize olur (Shashkova ve ark., 2015).



Şekil 2.3. Kuvvetli azot varlığında sinyal iletimi

Yapılan bir çalışmada Snf1'in pseudohifsel farklılaşmanın düzenlenmesindeki rolü incelenmiş ve Snf1p'nin Thr²¹⁰ fosforilasyonu ile kontrol edilen azot sinyalizasyonunda doğrudan yer aldığı belirlenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada Snf1p-Thr²¹⁰ fosforilasyonunun TOR tarafından negatif olarak düzenlendiği de gösterilmiştir. Bu durum Snf1p'in azot ve karbon stresine ilişkin sinyallerin entegrasyonunda rol oynadığını ortaya koymaktadır (Orlova ve ark., 2006) (Şekil 2.4).

Prolin, sadece protein sentezi için gerekli olmayıp aynı zamanda bir azot kaynağı olarak da görev yapabilen bir aminoasittir. Prolin, *S. cerevisiae* laboratuvar suşları için en az tercih edilen azot kaynağıdır. Optimal azot kaynağı var olmadığında *S. cerevisiae* hücreleri prolini, prolin kullanım iz yolu ile glutamata indirger (Brandriss ve Magasanik 1979a, 1979b). Mitokondride, prolin ilk önce *PUT1* gen ürünü olan prolin oksidaz tarafından delta-1-piyrolin-5-karboksilat (P5C) haline dönüştürülür. Daha sonra P5C, delta-1-piyrolin-5-karboksilat dehidrogenaz enzimi (Put2p) tarafından glutamata çevrilir (Brandriss ve Magasanik, 1979a). *PUT1* (Proline Utilization 1) ve *PUT2* genleri aynı zamanda NCR (Nitrogen Catabolite Repression) tarafından regüle edilir. Güçlü azot varlığında Prolin kullanım izyolu (Proline Utilization Pathway) baskılanır (Xu ve ark., 1995; Ter Schure ve ark., 2000). Prolin aynı zamanda TOR yolağı üzerinden hücrede düşük azot sinyali oluşturulmasına neden olur.



Şekil 2.4. Düşük azot ve rapamisin varlığında sinyal iletimi

2.3. Trehaloz Metabolizması

Mayalar yaşam ortamlarında üremelerini etkileyen çok fazla çevresel değişken bulunmaktadır. Bu çevresel değişkenlerin üremeyi kısıtladığı durumlarda ve ani çevresel değişikliklere karşı hayatta kalabilmek için metabolizmalarında hızlı değişiklikler yapmak zorundadırlar (Hohmann ve Magger, 2003). *S. cerevisiae* değişen olumsuz çevre koşullarına yanıt olarak stres metaboliti olan trehalozu biriktirmektedir. Trehalozun metabolizması bir dizi düzenleyici sistemlerle kontrol altında tutulmaktadır. İndirgenmemiş disakkarit olan trehalozun kimyasal yapısı glukoz- α 1-1-glukoz dimeri şeklindedir ve glukoz molekülleri glikozidik bağlarla bağlanmış durumdadır (François ve ark., 1997). Trehalozun üç farklı anomeri bulunmasına karşın sadece ' α , α -1,1 trehaloz' formu canlılarda bulunmaktadır. Trehaloz, düşük sıcaklıklarda bozulan sukrozun izomeri olmasına rağmen yüksek sıcaklıklarda stabilitesini korumaktadır (Web adresi-1: <http://www.yeastgenome>). Trehalozun kuvvetli biyokimyasal özelliklere (yüksek hidrofilite, kimyasal kararlılık, internal hidrojen bağlarının olmaması gibi) sahip olması onun bir stres metaboliti olarak görev yapmasını sağlamaktadır (Arguelles, 2000).

Trehaloz mikroorganizmalardan bitkilere, omurgasız hayvanlara kadar birçok canlı çeşitinde stres metaboliti olarak sentezlenerek depolanmaktadır (Singer ve Lindquist, 1998; François ve Parrou, 2001). Yüksek trehaloz içeriği maya hücrelerini otolizden koruyarak strese karşı koymasını sağlamaktadır (Quain, 1988). Hücre içi trehaloz içeriğinin, hücre biyomasının %2-3'ünden daha fazla olması durumunda, bağıl su miktarı büyük ölçüde azalır ve kurutulmuş hücrelerin yaşayabilme potansiyeli artar. Ayrıca trehaloz hidrate maya hücrelerinde su-yapıcı ajan (water-structuring agent) olarak rol oynar. Bu iki fonksiyonda, mayaların su stresine karşı yüksek direnç gösterebilmesi için gereklidir (Sano ve ark., 1999). Yapılan bir diğer çalışmada trehalozun biyolojik zar yapısının korunmasında görev aldığı gösterilmiştir. Maltoz permeaz endositozunun etil alkol ile inhibisyonu üzerine yapılan çalışmada, trehalozun muhtemelen maya membranında etil alkolün yerini alarak zar bütünlüğünü koruduğunu ortaya koymuşlardır (François ve Parrou, 2001).

Yüksek seviyedeki trehaloz, proteinleri denatürasyondan korur ve ayrıca denatüre olmuş proteinlerin agregasyonunu baskılamaktadır (Singer ve Lindquist, 1998). Aynı zamanda trehaloz maya hücrelerini termal, oksidatif stres, organik bileşik ve ağır metal streslerine karşı koruma sağlamaktadır (Attfield, 1987; Riberio ve ark., 1999; Elbein ve ark., 2003). *S. cerevisiae*'da stres metaboliti olarak görev almaları dışında metabolik yolda doğrudan veya dolaylı olarak, glikoliz yolağında regülatör olarak görev almaktadır (Attfield, 1987; Thevelein ve Hohmann, 1995). *S. cerevisiae*'da trehalozun sentezi, depolanması ve

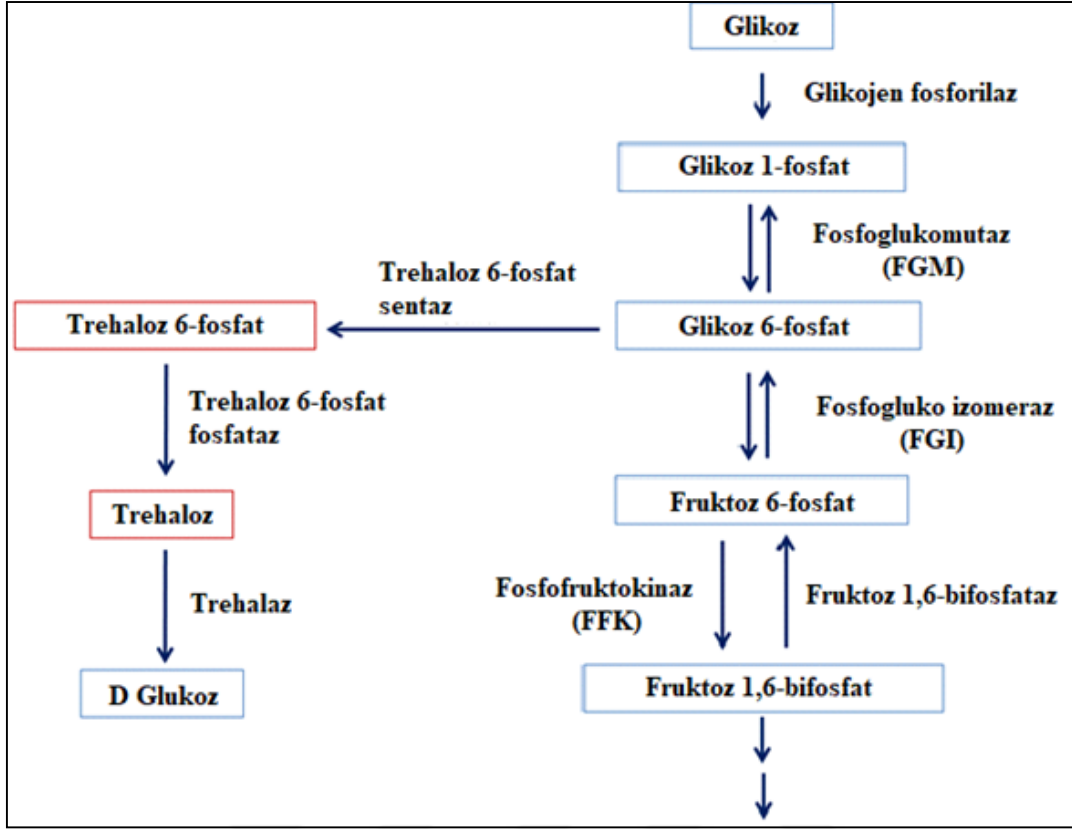
yıkımı üreme koşullarına bağlı olarak bir dizi enzimatik reaksiyon sonucu gerçekleşmektedir (Plourde-Owobi ve ark., 2000). Trehaloz metabolizmasında yer alan enzimler ve işlevleri özet olarak çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Trehaloz metabolizmasında görev alan genler ve kodladıkları enzimler

GEN	ÜRÜNÜ	FONKSİYONU
<i>TPS1</i>	Trehaloz-6-P sentaz	Trehaloz biyosentezi
<i>TPS2 (TPP)</i>	Trehaloz-6-P fosfotaz	Trehaloz-6-P defosforilasyonu
<i>TSL1 ve TPS3</i>	Düzenleyici subunitler	TPS kompleksinin stabilitesi
<i>NTH1</i>	Nötral, sitosolik trehalaz	Trehaloz yıkımı
<i>ATH1</i>	Asidik, vakuolar trehalaz	Trehaloz yıkımı

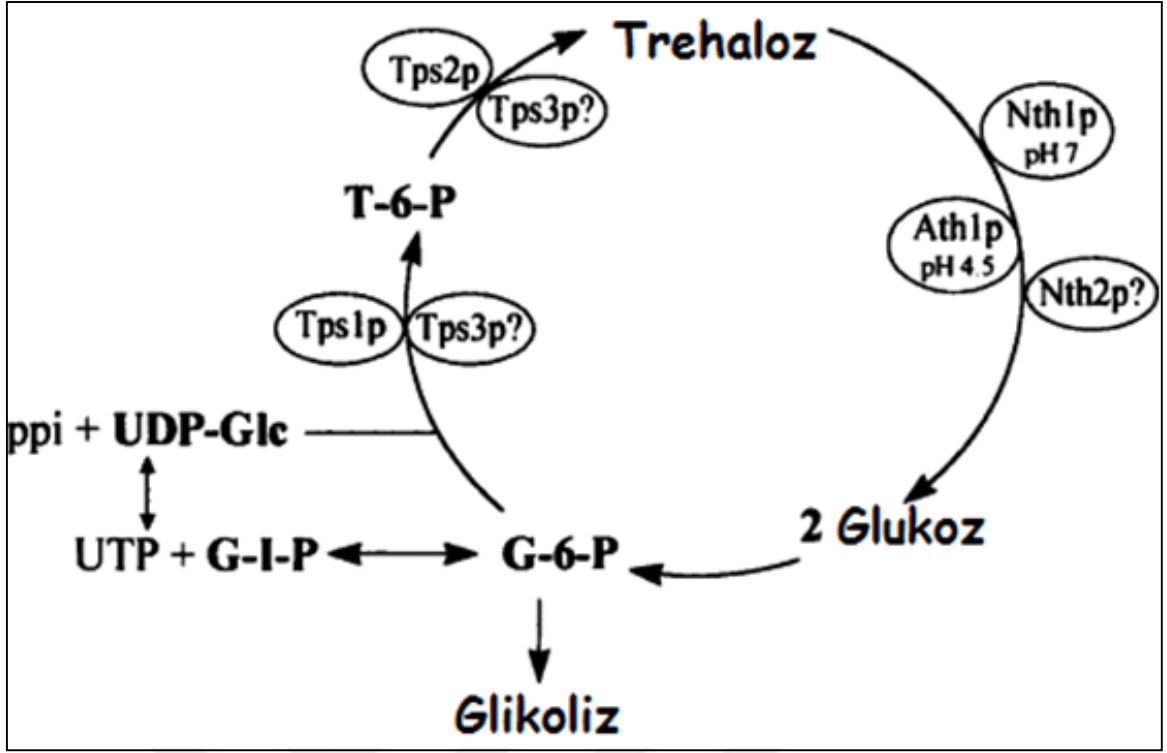
Trehaloz sentezi TPS (Trehaloz Fosfat Sentaz) enzimi ile gerçekleştirilmektedir. TPS bir enzim kompleksidir; Tps1p, Tps2p, Tps3p ve Tsl1p olarak adlandırılan 4 alt üiteden oluşmaktadır (Trevisol ve ark., 2014). Trehaloz biyosentezi iki basamakta gerçekleştirilmektedir. Sentezin başlaması substrat olarak kullanılan UDP-Glukoz ve Glukoz-6-fosfat'ın Tps1p alt birim tarafından trehaloz-6-fosfat'a dönüştürülmesi ile olur. Daha sonra Tps2p alt birimi tarafından Trehaloz-6-fosfat defosforile edilerek trehaloz oluşturulur (Cabib ve Leloir, 1958). TPS'in diğer altbirimleri olan Tps3p ve Tsl1p ise kompleksin kararlı halde kalmasından sorumludur (Thevelein ve Hohmann, 1995; Bell ve ark. 1998). Stres koşulları altında TPS kompleksinin altbirimi olan Tps1 proteininin transkripsiyonu aktive olur (Parrou ve ark., 1997; Parrou ve ark., 1999). Trehaloz sentezinden sonra ortam koşulları normale döndüğünde, yani ortada stres faktörü kalmadığında, trehalozun hızlı bir şekilde glukozu yıkımı gerçekleşir (Şekil 2.5), (Becker ve ark.,1996).

Trehalozun yıkımı için gerekli olan enzim trehalazdır. Trehalaz enzimi asidik trehalaz ve nötral trehalaz olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır (Londesborough ve Varimo, 1984). *S. cerevisiae* maya türünde asit trehalaz enzimi, *ATH1* (YPR026w) geni tarafından kodlanır (Nwaka ve ark. 1996; François ve Parrou, 2001). Asit trehalazlar (Ath1p) vakuol ve periplazmik alanda lokalize olurlar ve pH değeri 4.5 olduğunda optimum aktivite gösterirler. Periplazmik alanda bulunan asit trehalaz dışarıdan alınan trehalozun parçalanmasını sağlarken, vakuolde lokalize olan asit trehalazın fonksiyonu henüz aydınlatılamamıştır (Nwaka ve ark., 1996; Jules ve ark., 2004; Parrou ve ark., 2005; He ve ark., 2009).



Şekil 2.5. Trehaloz sentezi

Nötral trehalazlar (Nth1p, Nth2p) sitoplazmada konumlanırlar ve pH değeri 7.0 olduğunda optimum aktivite gösterirler (Londesborough ve Varimo, 1984; App ve Holzer, 1989). Nötral trehalazlar *NTH1* ve *NTH2* genleri tarafından kodlanır. Hücre içi trehaloz yıkımı Nth1p üzerinden gerçekleşir (Nwaka ve Holzer, 1997)(Şekil 2.6). Trehalozun sentezi ve hidrolizi, trehaloz metabolizması için ve glikolizin kontrollü bir şekilde gerçekleşmesi için önemlidir (Elbein ve ark., 2003). *TPS1* geni tarafından kodlanan trehaloz fosfat sentaz enzimi (Tps1p), heksokinaz (Hxk2p) aracılığıyla heksoz taşıyıcı proteinlerini (Hexose transportes, HXT) etkileyerek glikoliz yolağına giren glukoz miktarını ayarlamaktadır. (Thevelein 1992; Blazquez ve ark., 1993). Böylece glukozun farklı yollara girmesini sağlayarak glikolizin gereksiz aktivasyonunu engellemektedir (François ve Parrou, 2001; Elbein ve ark., 2003).



Şekil 2.6. Trehaloz yıkımı

2.4. *NTH1* Gen Yapısı ve İşlevi

S. cerevisiae maya türünde sistematik adı YDR001 olan *NTH1* (Nötral trehalaz 1) geni 4. kromozom üzerinde tek kopya olarak yer alan, 2256 bç uzunluğunda nükleotid dizisine sahip intron içermeyen bir gendir. *NTH1* gen ürünü olan Nth1 proteini, 751 aminoasitten oluşmaktadır (Web adresi-2, <https://www.yeastgenome.org/locus/S000002408#sequence>). Bu genin delesyonunu içeren *S. cerevisiae* maya suşunda trehalaz enzim aktivitesinin görülmediği belirlenmiştir (Kopp ve ark., 1993). *NTH1* geninin ürünü olan Nth1p, 693 aminoasitten oluşan 80 kilodalton ağırlığında bir proteindir (Kopp ve ark., 1993; Wolfe ve Lohan 1994). Nth1p enziminin uluslararası enzim sınıflandırma sistemine göre kod numarası E.C: 3.2.1.28 olarak belirlenmiştir. Nth1p fosfoprotein yapısında olup Protein Kinaz A (PKA) tarafından fosforile edilmektedir. Ayrıca Nth1 proteininin enzimatik aktivitesi fosforilasyon ve defosforilasyon mekanizmalarının sıkı bir şekilde kontrolüyle gerçekleşmektedir (App ve Holzer, 1989). *NTH1* transkripsiyonunun ve Nth1p enzimatik aktivitesinin farklı stres koşullarında yapılan çalışmalarda, *NTH1* transkripsiyonunun ve Nth1p enzimatik aktivitesinin ısı şoku, oksidatif stres ve metal stresi gibi koşullarda aktive edildiği gösterilmiştir (Zahringer ve ark., 1997). Bazı stres faktörlerinin varlığında, *NTH1* geninin promotor bölgesinde bulunan ve genel stres faktörlerinin (Msn2/4p) bağlandığı,

STRE (Stres Response Elements) 5'-CCCCT-3' nükleotid dizilerinin *NTH1* transkripsiyonu için gerekli olduğu bilinmektedir (Zahringer ve ark., 1997, 2000).

2.5. *NRG1* Gen Yapısı ve İşlevi

Transkripyonel represör aktivitesi olan Nrg1 (Negative Regulator of Glucose-repressed genes) proteini 4. kromozom üzerinde bulunan *NRG1* (YDR043C) geni tarafından kodlanır (Zhou ve Winston., 2001). Glukoz varlığında Nrg1p'nin nişasta parçalayıcı enzimlerin gen ifadelerine etki ettiğini ve *STAI* genini baskıladığı belirlenmiştir. Böylece Nrg1p ilk olarak *STAI* (Glikoamilaz) geninin glukoz baskılayıcı rolü ile tespit edilmiştir (Park ve ark., 1999). Nrg1 delesyonunun, ortamda glukoz olmasına rağmen, *STAI* geninin transkripsiyonunu 5 kat artmasına neden olduğunu gözlenmiştir. Aynı zamanda, *NRG1* transkripsiyonunun glukoz yokluğunda baskılandığını ifade etmişlerdir. Ayrıca çalışmanın devamında Nrg1p'nin Ssn6 ile etkileştiğini göstermişler ve *STAI* geninin baskılanmasını Ssn6-Tup1 korepresörü ile kompleks oluşturarak yaptığını öne sürmüşlerdir (Park ve ark., 1999).

Nrg1p 231 aminoasitten oluşmakta olup moleküler ağırlığı 26750.3 Dalton'dur. Nrg1 proteini DNA'ya bağlanabilen bir proteindir ve iki adet çinko parmak motifi içermektedir. Yapılan Green Florence boyama çalışmalarında Nrg1p hücre içerisinde hem nükleusta hem nükleolusta hem de antinükleolar nükleusta lokalize olduğu gösterilmiştir (Web adresi-3 <http://yeastgfp.yeastgenome.org>, Şekil 2.7). Farklı streslere (alkalin pH, tuz, ozmotik ve oksidatif stres gibi) karşı oluşturulan cevaplarda Nrg1p görev alır. Yapılan bir çalışmada Nrg1 proteininin, *SUC2* ve *GAL* genlerinin baskılanmasında görev aldığı belirlenmişlerdir (Zhou ve Winston, 2001). *S. cerevisiae* maya suşunda %2 glukoz varlığında, *SUC2* mRNA seviyesinin *Anrg1* mutant suşunda yaban tip kontrole göre 2-4 kat arttığı gösterilmiştir. Ayrıca *Anrg1* mutasyonunun *GAL1* ve *GAL10* genlerinin baskılanmasını engellediği gözlenmiştir. Nrg1 proteininin *DOG2* geninin baskılanmasında rol oynadığını ve de Nrg1p'nin Snf1 protein kinaz ile fiziksel olarak etkileşim içinde olduğunu belirlenmiştir (Vyas ve ark., 2001). Ayrıca başka bir çalışmada Nrg1p'nin, Snf1p üzerinden gelen sinyale göre *FLO11* (hücre yüzeyi glikoproteini) geninin transkripsiyonunun baskılanmasında rol oynadığı gösterilmiştir (Kuchin ve ark., 2002). Glukoz varlığında Snf1 kinaz inaktif olurken Nrg1p aktiftir ve Nrg1p'nin aktif olması *FLO11*'in baskılanmasına neden olmaktadır. Snf1 ile Nrg1p'nin antagonistik çalışması *FLO11*'in pozitif olarak düzenlenmesini sağlamaktadır.

Nrg1p'nin *NTH1* geninin promotor bölgesinde 3 tane (CCCCT) olası bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Nrg1p bağlanma bölgeleri Msn2p/Msn4p bağlanma bölgeleri

(CCCCT- STRE/PDS) ile örtüşmektedir. Snf1p kinaz üzerinden gelen glukoz sinyaline göre Nrg1p haploid invazif üremede ve diploid pseudohifsel üremede görev alır (Kuchin ve ark., 2002).



Şekil 2.7. Nrg1 proteinin hücre içi lokalizasyonu

Daha önce yapılan çalışmalarda Mig1p'nin *NTH1* gen ekspresyonunda rol oynadığı gösterilmiştir. Nrg1p'nin de Mig1p gibi Tup1-Cyc8 represör kompleksi ile kompleks oluşturup transkripsiyonu baskıladığı bilinmektedir. Ayrıca Nrg1p, düşük glukoz ve azot varlığında TOR ve Snf1p üzerinden gelen sinyale göre invazif büyümeyi ve pseudohifsel büyümeyi kontrol etmektedir. *NTH1* gen ekspresyonunun düşük azot varlığında arttığı daha önceki yapılan çalışmalarda tanımlanmıştır. Bu nedenle bu çalışmada güçlü azot ve düşük azot kaynağında Nrg1 proteininin *NTH1* gen ekspresyonuna olan etkisi araştırılmıştır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Maya Suşları

Çalışmada kullanılan *S. cerevisiae* maya suşları BY4741 yaban tip (wt: *MATa*; *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *met15Δ0*, *ura3Δ0*) ve *NRG1* mutasyonu taşıyan (*Δnrg1*: *MATa*; *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *met15Δ0*, *ura3Δ0*, YDR043c:kanMX4) maya suşlarıdır. Bu suşlar EUROSCARF (European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis) maya koleksiyonundan temin edilmiştir. BY4741 maya suşu, çalışmalarda yaban tip olarak kullanılan standart tek kromozom kopyası taşıyan maya suşudur. Bu maya suşunun genom dizisi tamamıyla sekanslanmış olup metabolik yollarda görev alan genlerde mutasyon olmadığı bilinmektedir. *Δnrg1* mutant maya suşu ise BY4741 maya suşu ile izogenik olup *NRG1* gen mutasyonu içermektedir.

3.2. Maya Suşların Üreme Eğrilerinin Oluşturulması

BY4741 yaban tip ve *Δnrg1* mutant maya suşları 150 ml YNB (Yeast Nitrogen Base) (Ek-1) sıvı kültürde 2 gün (48 saat) boyunca üretildi ve her 2 saatte bir 1 ml hücre alınarak spektrofotometre (Shimadzu UV-1208) kullanılarak OD₆₀₀ absorbans değeri kaydedildi. YNB sıvı besi ortamında üretilen maya hücrelerinin ikilenme süreleri (doubling time, dt) ve spesifik üreme oranları (specific growth rate, μ) hesaplandı.

3.3. Plazmidlerin Yapıları ve Özellikleri

YE_p (Yeast Episomal Plasmids) plazmitleri standart *S. cerevisiae* suşlarında ve seçici üreme ortamında stabilitesini korumaktadır (Liao ve ark., 1993). Bu nedenle çalışmamızda Suc2-LacZ ve Nth1-LacZ gen füzyonunu içeren YE_p plazmitleri kullanılmıştır. Plazmitlerin yapısında *E. coli* hücrelerinde replikasyon için ColE replikasyon orijini, seleksiyon için *BLA* (Betalaktamaz) geni, *S. cerevisiae* hücrelerinde replikasyon için 2 μ m replikasyon orijini, seleksiyon için *URA3* geni bulunmaktadır (Rose ve ark., 1990). Nth1-LacZ gen füzyonunu içeren plazmitte *NTH1* promotorunun -770bp uzunluğundaki bölgesi bulunmaktadır. Bu bölgenin *NTH1* geninin ekspresyonu için gereken kontrol bölgelerini içerdiği bilinmektedir (Parrou ve ark., 1997). *SUC2* geninin ekspresyonunun kontrolü glukoz tarafından sağlanmaktadır. Dolayısıyla çalışmalarımızda kontrol gen füzyonu olarak, Suc2-LacZ gen füzyonu kullanıldı. Nth1-LacZ gen füzyonunu içeren plazmitin temini Prof. Dr. Sezai TÜRKEKEL'den (Uludağ Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bursa)

edilmiştir. Suc2-LacZ gen füzyonunu içeren plazmit ise Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ'in koleksiyonundan alınmıştır (Türkel ve ark., 2003).

3.4. Plazmidlerin Çoğaltılması ve Maya Suşlarına Transformasyonu

Nth1-LacZ ve Suc2-LacZ gen füzyonu içeren plazmitlerin çoğaltılması için, plazmitlerin *E. coli* MACH3 α bakteri hücrelerine CaCl₂-MgCl₂ yöntemi kullanılarak transformasyonu yapıldı (Ausubel ve ark., 1993). Daha sonra plazmitleri içeren *E. coli* hücrelerinin seleksiyonu için, transformantlar ampisilin içeren TYE^{amp} (Trypton Yeast Extract Agar, Ek1) petrilere ekildi. Petride üreme gösteren *E. coli* kolonilerinden alınarak ampisilin içeren NB (Nutrient Broth, Ek1) sıvı besiyerine ekimi yapıldı. Transformantların 17-18 saat 37°C'de inkübatörde (FINEPCR-BAEO7) üremesi sağlandı. Suc2-LacZ ve Nth1-LacZ plazmitleri plazmit saflaştırma kiti yardımıyla (Thermo, GeneJet Plasmid Kit #K0502), transformant bakteri suşlarından izole edilerek 0,1 ml 1xTE (Tris EDTA) içerisinde -20°C 'de saklandı.

Suc2-LacZ ve Nth1-LacZ gen füzyonunu içeren plazmitlerin yaban tip (BY4741) ve mutant (*Δnrg1*) maya suşlarına transformasyonu lityum asetat-polietilen glikol (LiOAc+PEG) yöntemi ile yapıldı (Rose ve ark., 1990). Transformant maya suşlarının seleksiyonu için urasil içermeyen YNBD-HLM katı besiyerine (Ek1) ekimleri yapılarak 30°C'deki inkübatörde (Memmert IN110) 4 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. Transformant maya kolonilerinden alınarak taze YNBD-HLM katı besi ortamına (Ek1) ekimi yapıldı ve 30°C'deki inkübatörde 3-4 gün inkübasyona bırakıldı. Transformant petrilere çalışmamız süresince (en fazla bir hafta) +4°C'de saklandı.

3.5. Maya Transformant Hücrelerinin Üreme Koşulları ve Örnekleme Yapımı

Nth1-LacZ ve Suc2-LacZ plazmitlerini taşıyan transformant maya hücrelerinin bir gecelik (O/N, overnight) kültürlerini oluşturmak için, transformantlar 5 ml YNBD-HLM sıvı besiyerinde 17-18 saat boyunca 125 rpm/dk'lık sabit çalkalama ile 30°C'de inkübasyona bırakıldı. Overnight kültürlerden taze YNBD-HLM sıvı besiyerine OD₆₀₀ değeri ~ 0,2-0,3 gelecek şekilde hücreler aktarıldı ve. OD₆₀₀ değeri ~ 0,8-1,0 oluncaya dek aynı şartlarda inkübe edildi. Sıvı hücre kültürleri logaritmik aşamaya ulaştığında β -galaktozidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi için ve hücre içi trehaloz miktarının belirlenmesi için, örnekler (stres öncesi) alındı. Kalan kültürler üç eşit gruba bölündü; birinci grup hücreler zayıf azot kaynağı varlığının *NTH1* gen ekspresyonuna etkisini belirlemek için; ikinci grup hücreler kuvvetli azot kaynağı varlığının *NTH1* gen ekspresyonuna etkisini belirlemek için; üçüncü

grup hücreler ise üreme ortamında ve şartlarında değişiklik yapılmadan kontrol amaçlı kullanıldı.

Her üç gruptaki hücreler 6000 rpm hızda 5 dk santrifüj (Hettich – Universal 320 R) edildi. Hücreler soğuk steril distile su ile yıkandı ve tekrar çöktürülerek toplandı. Daha sonra birinci gruptaki hücreler prolin içeren YN-Pro (Ek 1) minimal besiyerine ikinci gruptaki hücreler glutamin içeren YN-Glu (Ek 1) minimal besiyerine ve üçüncü gruptaki hücreler Amonyum sülfat içeren YN-AS (Ek 1) taze besi yerlerine aktarıldı ve 4 saat boyunca 30°C’de sabit çalkalamalı inkübatörde üremeye bırakıldı. Bu süre sonunda kültürlerden β -galaktozidaz enzim aktivitesinin ve hücre içi trehaloz miktarının belirlenmesi için stres sonrası örnekler alındı. Tüm deneyler en az üç kere tekrarlandı ve standart sapmanın %20’den az olduğu hesaplandı.

3.6. Beta-Galaktozidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Farklı üreme koşullarında üretilen transformant hücreler 6000 rpm’de 5 dk çöktürülerek toplandı. Toplanan hücreler 1 ml distile su ile yıkandı ve tekrar çöktürülerek toplandı. Çöktürülen transformantlara Breaking buffer (Ek 2) eklenerek β -galaktozidaz aktiviteleri ölçümü yapılana kadar derin dondurucuda (-80 °C) saklandı. -80 °C’den alınan hücreler oda sıcaklığında 5 dk bekletilerek çözümleri sağlandı.

Çözünmüş hücre solüsyonlarına hücre lizatlarını elde edebilmek için 20 μ l 1M kloroform ve 20 μ l % 0,1 SDS eklenerek hafifçe karıştırıldı. Bu lizatlardan 30 μ l Z buffer (Ek 2) içerisine eklenerek 1 dakika 30°C’ de ön inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 200 μ l ONPG eklendi ve reaksiyon başlangıç zamanı kaydedildi. Reaksiyon sarı renk verdiğinde reaksiyon bitiş zamanı olarak kaydedildi ve reaksiyon 500 μ l 1M Na₂CO₃ eklenerek durduruldu. Hücreler 12000 rpm’de 1 dk çöktürüldü ve süpernatantın spektrofotometrede OD₄₂₀ absorbans değeri kaydedildi.

Transformant maya hücrelerindeki toplam protein miktarı Lowry metodu kullanılarak belirlendi (Lowry ve ark., 1951). Lizatlardan 20 μ l örnek alınarak 180 μ l distile su içerisine resuspend edildi ve daha sonra üzerine 1 ml C buffer (Ek 2) ilave edildi. Reaksiyon oda sıcaklığında 10dk inkübe edildi ve bu süre sonunda. reaksiyon üzerine 100 μ l Folin çözeltisi (Folin Ciocalteu’s Phenol Reagent) eklendi. Reaksiyon tekrar oda sıcaklığında ara ara karıştırılarak 30dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücreler 12000 rpm’de 1dk santrifüjlendi ve süpernatant alınarak mavi rengin OD₇₅₀ absorbans değeri not edildi.

Suşların β -galaktozidaz enzim aktivitesi dakikada 1 miligram toplam protein içeriğinin yaktığı nanomol ONPG (nmol ONPG/dk/mg protein) olarak hesaplandı (Guarente ve Ptashe, 1981; Ausubel ve ark., 1993).

3.7. Hücre İçi Trehaloz Miktarının Belirlenmesi

Farklı reme koşullarında üretilen transformant maya hücrelerinden 10ml alındı ve 6000rpm'de 5dk santrifüj edilerek toplandı. Hücreler iki defa distile su ile yıkanıp çöktürüldükten sonra hücrelerin yaş ağırlıkları hassas terazi kullanılarak tartıldı ve kaydedildi. Hücre pelletinin üzerine 250 μ l 0,25M Na₂CO₃ eklenerek 2 saat kaynatıldı. Bu süre sonunda hücre lizatlarının üzerine 150 μ l 1M Asetik Asit ve 600 μ l 0,2M NaOAc eklenerek hafifçe karıştırıldı. Daha sonra hücre lizati üzerine 3mU Trehalaz enzimi (Sigma T-8778) eklenerek 37°C'de 18 saat süre ile inkübasyona bırakıldı (Parrou ve François, 1997). Bu süre sonunda hücreler 12000 rpm'de 1dk çöktürüldü. Trehalaz enziminin trehalozu parçalamasıyla ortaya çıkan glukoz miktarı GOD-POD (Glukoz Oksidaz-Peroksidaz) yöntemi kullanılarak belirlendi (Goldstein ve Lampen, 1975). GOD-POD rekasyonu sonucunda oluşan rengin OD₅₄₆ absorbans değeri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Lizatlarda bulunan glukoz miktarları glukoz standart çözeltisinin içerdiği glukoz miktarına göre hücre yaş ağırlığı üzerinden normalize edilerek miligram hücrede biriktirilen mikrogram glukoz olarak (μ g glukoz/mg hücre yaş ağırlığı) hesaplandı.

3.8 Biyoinformatik Araştırmalarda Faydalanılan Programlar ve Kaynaklar

Saccharomyces Genome Database (SGD); *S. cerevisiae* ile yapılan çalışmaların toplandığı büyük bir veri deposudur. SGD veritabanından *NTH1* geninin lokalize olduğu kromozom belirlendi. National Center for Biotechnology Information (NCBI) (BK006938.2) referans sayfasına gidilerek çalışmalarda kullanılmak üzere *NTH1*'in promotor bölgesi (~1000bp) bilgisayar ortamına aktarıldı.

JASPAR CORE veritabanı birçok organizmaya ait proteinlerin DNA bağlanma dizilerini ve bu bağlanma profillerini içeren bir veritabanıdır (jaspar.genereg.net). JASPAR CORE veritabanı kullanılarak *NTH1* promotor bölgesine Nrg1 proteininin bağlanma profili belirlendi (ID:MA0347.1).

SGD veritabanından Nrg1p amino asit dizisinin tamamı ve bu proteinin çinko-parmak DNA bağlanma bölgesine denk gelen amino asit dizileri ayrı ayrı alınarak bilgisayar ortamına aktarıldı.

Zhang Lab'ın geliştirmiş olduğu I-TASSER sunucusu (server) protein yapısı ve fonksiyon tahminleri için kullanılan bir çevrimiçi platformdur. Araştırmacıların proteinlerin amino asit sekanslarından 3 boyutlu yapısının ve biyolojik fonksiyonunun yüksek kaliteli tahminlerini otomatik olarak üretmesine izin verir. Bu program aracılığıyla Nrg1 transkripsiyon faktörünün 3 boyutlu yapısının tahmini modeli elde edildi.

Tom Bishop's Theoretical Molecular Biology Laboratuvarı tarafından geliştirilen 3D Dart-webserver programı kullanılarak *NTH1* promotorunun üzerinde Nrg1 proteininin bağlanma bölgelerini (CCCCT/GGGGA) içeren DNA parçaları kesilerek 3 boyutlu hale getirildi ve (gagcatcgtgtaggacgaagCCCCTtatCCCCTagttaccgaagaaggccaccaatctta/60bp) pdb. dosyası ('cccct.pdb') olarak kaydedildi.

NPDock–Gensilico.pl programı, International Institute of Molecular and Cell Biology tarafından geliştirilmiş olup bu program sayesinde olası nükleik asit-protein kenetlenmesi (bağlanması, yakınlaşması) tahmini yapılmaktadır. Araştırmada Nükleik asit-Protein Docking çalışması bu program kullanılarak yapıldı.

Theoretical and Computational Biophysics Group tarafından geliştirilen VMD (Visual Molecular Dynamics) programı ücretsiz kullanımı olan bir program olup 3D-protein ("*.pdb") dosyalarının görselleştirilmesinde kullanılmaktadır. Bu programın web adresi 'www.ks.uiuc.edu/Research/vmd' (Web adresi-4) şeklinindedir. VMD programı kullanılarak Nrg1 proteinin *NTH1* promotoruna olan uzaklığı hesaplandı ve '*NTH1*-Nrg1p' bağlanmasının gerçeğe en yakın 3 boyutlu modeli görsel hale getirildi.

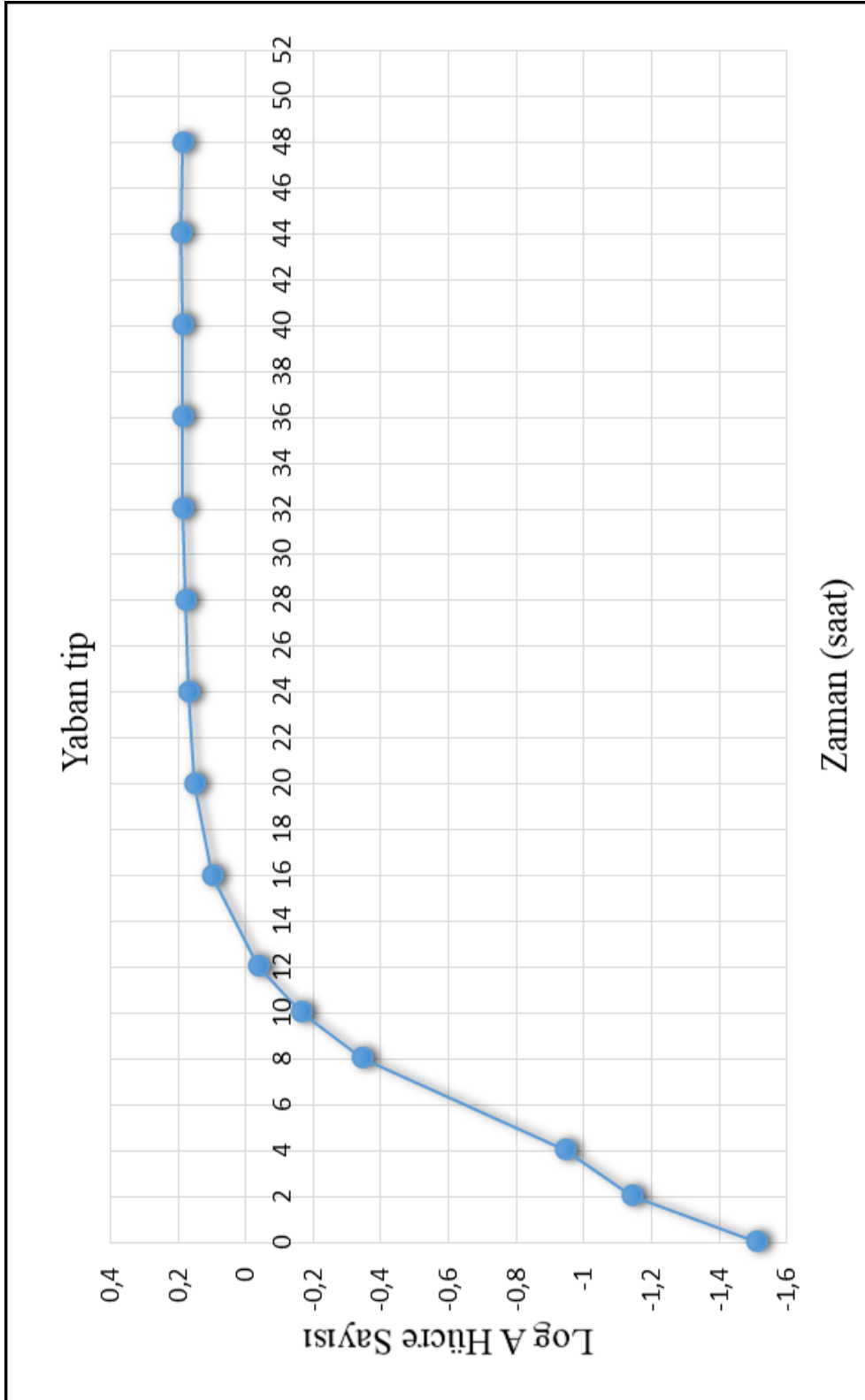
BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

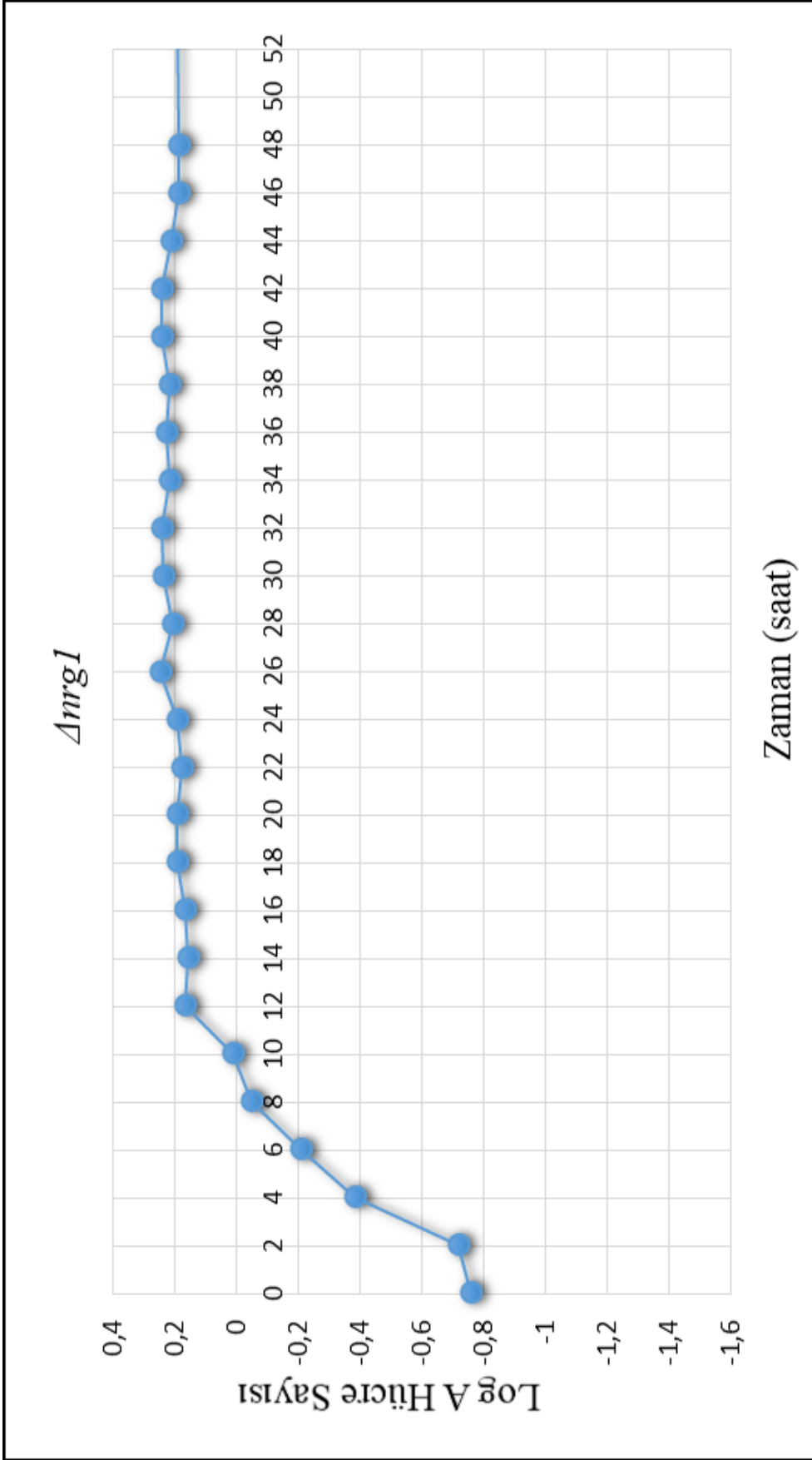
4.1. Maya Suşların İkilenme Süreleri

Çalışmada kullanılan yaban tip ve *Anrg1* mutant maya suşları YNBD-HLMU (Ek 1) sıvı besi ortamında 30 °C’de 120rpm çalkalama ile 48 saat üretildi. Bu üreme süresince her 2 saatte bir 1ml hücre alınarak spektrofotometrede OD₆₀₀ absorbans değeri ölçüldü ve kaydedildi. Elde edilen OD₆₀₀ değerlerinin ‘LogA’ hücre sayıları hesaplanarak zamana karşı grafiği çizildi. Bu grafik kullanılarak logaritmik olarak üreyen hücrelerin bulunduğu zaman aralığına (2-10 saat) karşı ln hücre sayılarının grafiği çizildi. Bu grafikten maya suşlarının ikilenme süreleri (doubling time; dt) ve spesifik büyüme oranları (specific growth rate; μ) hesaplandı. Yaban tip maya hücresi için oluşturulan LogA hücre sayılarını içeren üreme eğrisi Şekil 4.1’de, *Anrg1* mutant maya suşu için oluşturulan LogA hücre sayılarını içeren üreme eğrisi Şekil 4.2’de verildi. Bu grafikler kullanılarak oluşturulan ln hücre sayılarını içeren grafikler ise yaban tip maya suşu için Şekil 4.3’te, *Anrg1* mutant maya suşu için Şekil 4.4’te verildi. Yaban tip maya suşu için ikilenme süresi yaklaşık 2 saat 26 dakika, *Anrg1* mutant maya suşu için ikilenme süresi yaklaşık 3 saat 27 dakika olarak hesaplandı. Ayrıca yaban tip maya suşunun spesifik büyüme oranı 0,2848 ve *Anrg1* mutant maya suşunun spesifik büyüme oranı 0,2003 olarak belirlendi. *Anrg1* mutant maya suşunun spesifik büyüme oranının yaban tip maya suşundan daha yavaş olduğu tespit edildi.

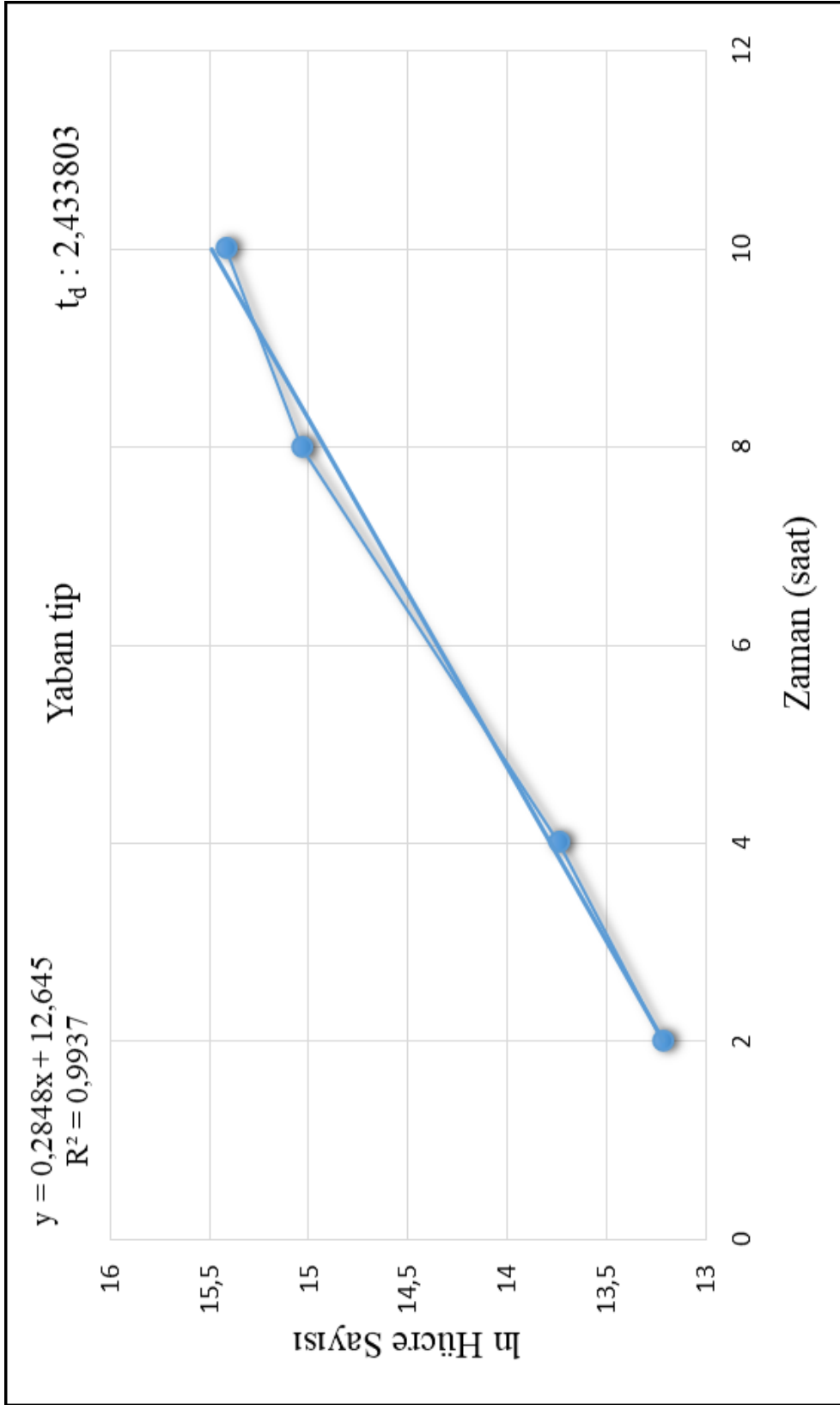
Yaban tip maya suşu hücre döngüsünü yaklaşık olarak 2,5 saatte tamamlarken *Anrg1* mutant maya suşunun hücre döngüsünü yaklaşık olarak 3,5 saatte tamamladığı görüldü. Üreme ortmamaında oluşturulacak olan stresin, maya hücrelerinin en az bir döngüyü tamamlayacak kadar verilmesi gerekmektedir. Bu nedenle farklı azot kaynakları kullanılarak yapılan çalışmalarda maya kültürlerinin inkübasyon süresi 4 saat olarak belirlendi.



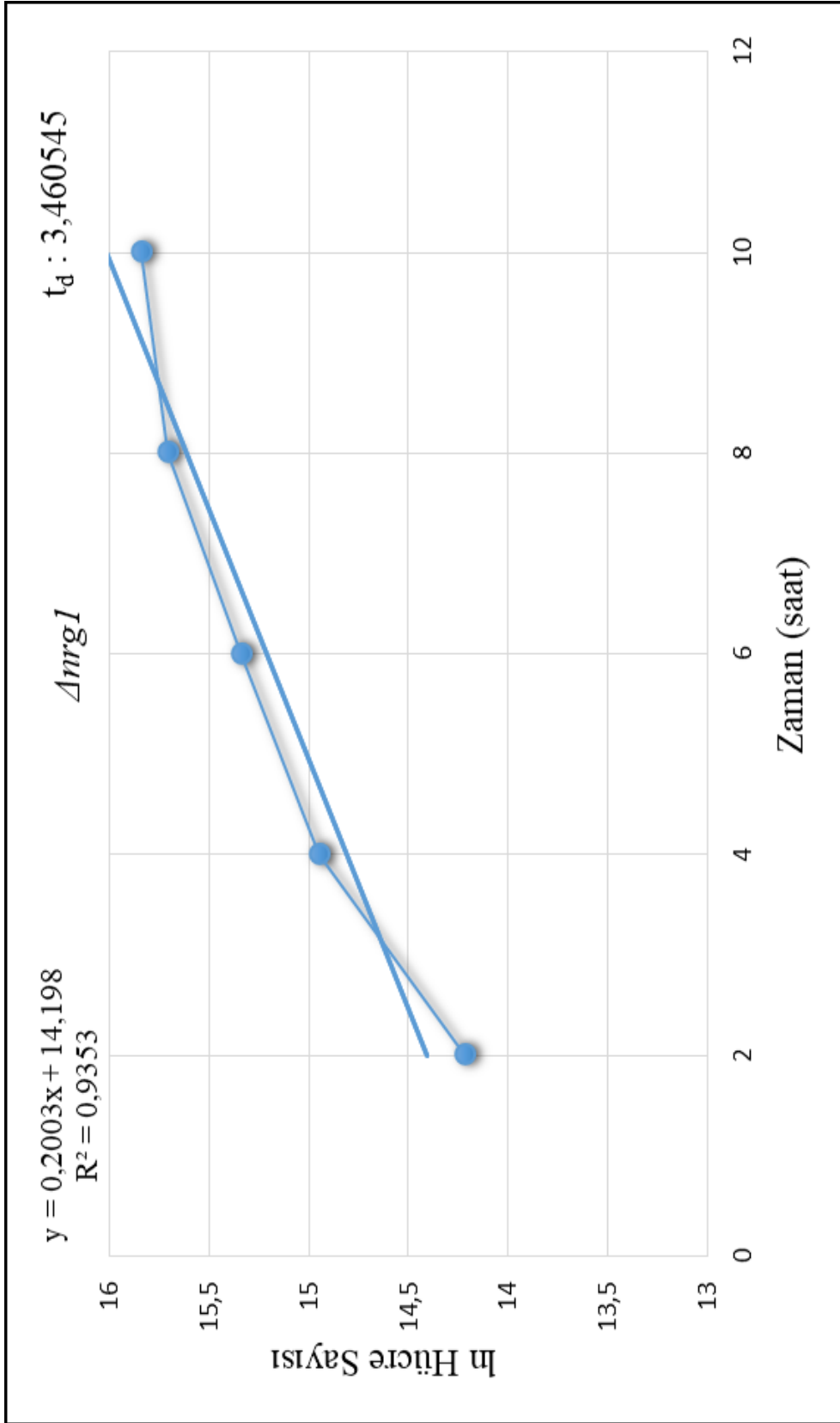
Şekil 4.1. Yaban tip maya suşunun üreme eğrisi



Şekil 4.2. $\Delta nrg1$ mutant maya suşunun üreme eğrisi



Şekil 4.3. Yaban tip maya suşunun ikilenme süresi (t_d) ve spesifik büyüme oranı (μ)



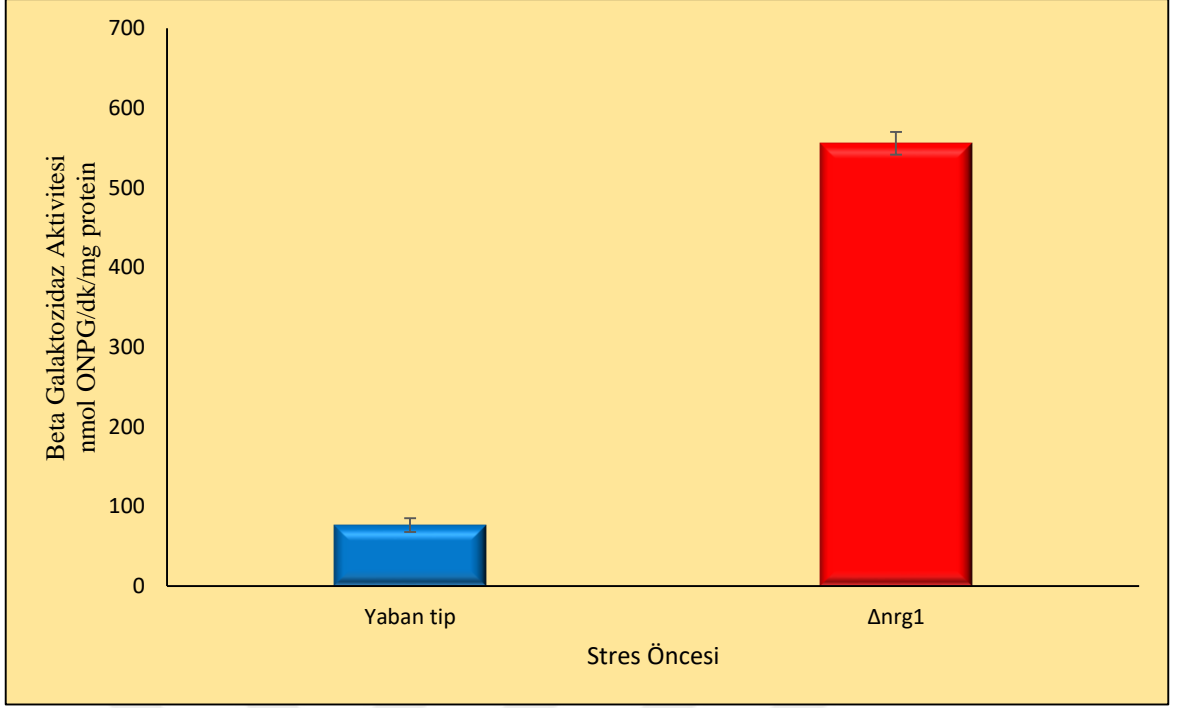
Şekil 4.4. $\Delta mrg1$ mutant maya suşunun ikilenme süresi (t_d) ve spesifik büyüme oranı (μ)

4.2. Nrg1 Proteininin *NTH1* Gen Ekspresyonuna Etkisi

Çalışmamızda Nrg1 proteininin *NTH1* transkripsiyonuna olan etkisi, *NTH1-LacZ* gen füzyonu içeren YE_p plazmiti kullanılarak belirlendi. *NTH1* geninin transkripsiyonel düzenlenmesinde gerekli olan promotor bölgesinin 770 bp içeren bölgesi çalışmada kullanıldı. Bu promotor bölgesi *NTH1* geninin ekspresyonunu kontrol eden *cis*-elementlerini ve Nrg1 proteininin bağlanması için gerekli STRE elementlerini içermektedir. *NTH1* geninin 770 bp promotor bölgesini içeren *NTH1-LacZ* gen füzyonu taşıyan plazmitlerin yaban tip (BY4741) ve *Δnrg1* mutant maya suşlarına transformasyonları yapıldı. Logaritmik faza kadar üretilen transformant maya hücre kültürlerinden örnekler alınarak stres öncesi beta galaktozidaz enzim aktivitesi belirlendi. Daha sonra hücre kültürleri 3 eşit hacime bölündü. Birinci gruptaki hücrelere zayıf azot kaynağı olarak prolin, ikinci gruptaki hücrelere kuvvetli azot kaynağı olarak glutamin ve üçüncü gruptaki hücrelere amonyum sülfat ilave edildi. Üçüncü gruptaki hücreler stres öncesi koşullarla aynı olmakla beraber, stres ortamı için hazırlanan üreme ortamlarında tek değişkenin azot olması için ve grupların üreme ortamındaki glukoz miktarının eşit olması için üçüncü kontrol grubu oluşturuldu. Her üç gruptaki hücreler 4 saat üremeye bırakıldı ve bu süre sonunda hücreler çöktürülerek toplandı. Bu hücrelerde gerçekleşen *NTH1* ekspresyon seviyeleri beta galaktozidaz enzim aktivitesi ölçülerek belirlendi. Bu değerler stres sonrası veriler olarak kaydedildi.

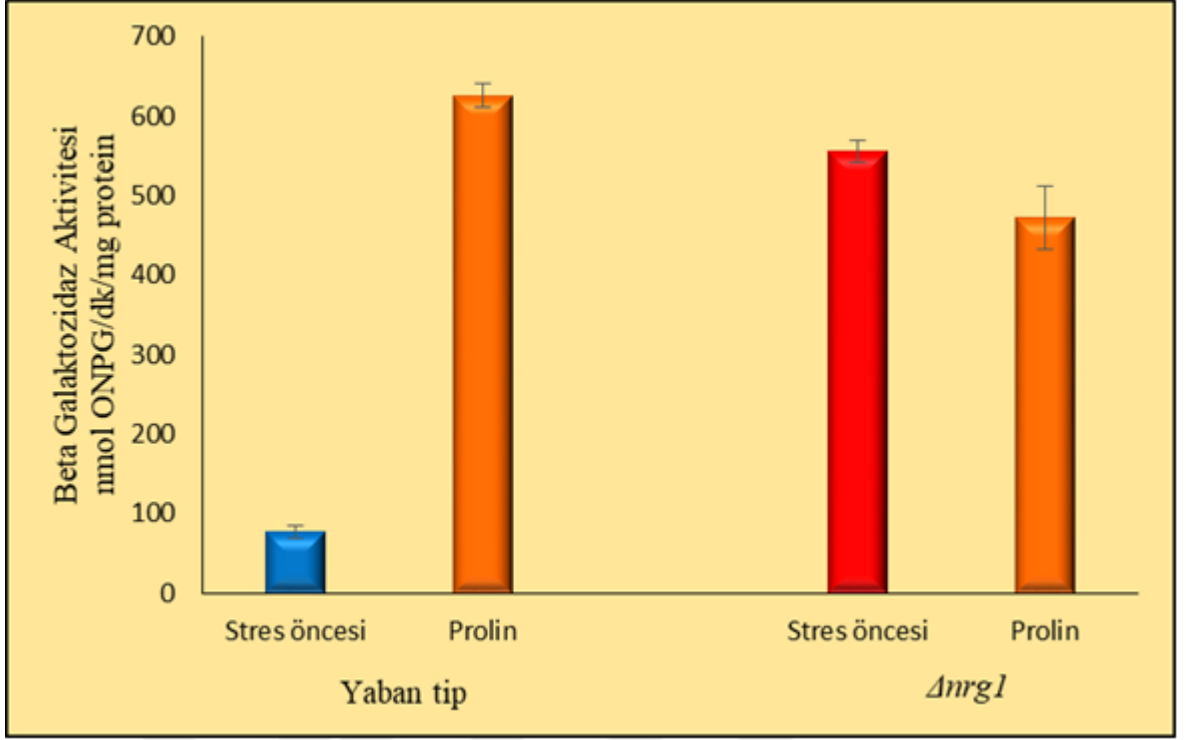
Yaban tip maya hücrelerinde stres öncesi β -galaktozidaz enzim aktivitesi $76,8 \pm 8,6$ ünite olarak, *Δnrg1* mutant maya hücrelerinde ise $555,7 \pm 14,2$ ünite olarak hesaplandı (Şekil 4.5). *Δnrg1* mutant maya hücrelerinde *NTH1* ekspresyonunun yaban tip maya suşundan yaklaşık 7 kat daha fazla olduğu gözlemlendi. Nrg1p yokluğunda *NTH1* transkripsiyonunun artması Nrg1 proteininin *NTH1* geninin baskılanmasında görev aldığını göstermektedir. Nrg1 proteini *S. cerevisiae* maya hücrelerinde karbon baskılı genlerin negatif regülatörü olarak görev yapmaktadır (Zhou ve Winston, 2001). Benzer şekilde çalışmamızda da Nrg1 proteininin *NTH1* geninin negatif regülatörü olduğu belirlenmiştir.

Amonyum içeren kuvvetli azot kaynağında üretilen yaban tip maya hücreleri prolin içeren zayıf azot kaynağına geçirildiklerinde β -galaktozidaz enzim aktivitesinin yaklaşık 8 kat arttığı belirlendi. Yaban tip maya hücrelerinin prolin içeren ortamda beta galaktozidaz enzim aktivitesi $626,0 \pm 14,6$ ünite olarak ölçüldü (Şekil 4.6). Benzer şekilde kuvvetli azot kaynağında üretilerek zayıf azot kaynağı (prolin) içeren ortama geçirilen *Δnrg1* mutant maya hücrelerinde beta galaktozidaz enzim aktivitesinin ($553,6 \pm 55,5$ ünite) fazla değişmediği belirlendi (Şekil 4.6). *Δnrg1* mutant maya hücrelerinde *NTH1* gen ekspresyonunun değişmediği azot açlığına karşı duyarsız olduğu gözlemlendi.



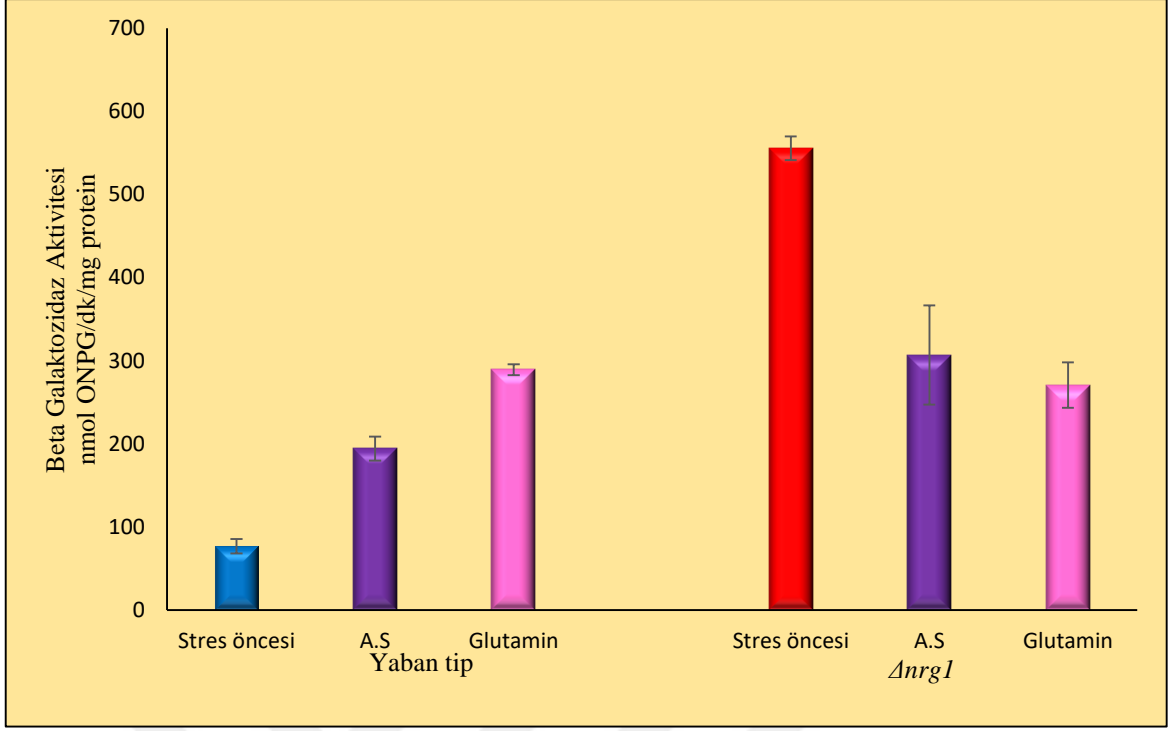
Şekil 4.5. Stres öncesi yaban tip ve $\Delta nrg1$ mutant maya hücrelerinde *NTH1* gen ifadesi

Prolinin varlığı maya hücrelerinde düşük azot sinyali oluşturarak TOR sinyal sisteminin Rapamisin benzeri baskılanmasına neden olmaktadır. TOR sinyal sisteminin baskılanması ile Msn2p/Msn4p transkripsiyon faktörlerinin nükleusa geçmesi ve *NTH1* promotoruna bağlanarak transkripsiyonun aktivasyonu gerçekleşmektedir. Bu koşullarda Nrg1 proteininin görevi olmadığı varsayılırsa yaban tip maya hücrelerinde ve $\Delta nrg1$ mutant maya hücrelerinde *NTH1* ekspresyon seviyesinin benzer çıkması beklenen bir sonuçtur. Ancak $\Delta nrg1$ mutant maya hücrelerinde azot açlığı stresi öncesinde ölçülen enzim aktivitesi ile azot açlığında ölçülen enzim aktivitesi miktarı hemen hemen aynı olup *NTH1* gen ekspresyonunun Nrg1 proteininin yokluğunda değişmediği çevresel strese duyarsız bir şekilde konstitütif olarak gerçekleştiği gözlenmiştir.



Şekil 4.6. Azot açlığında yaban tip ve $\Delta nrg1$ mutant maya hücrelerinde *NTH1* gen ifadesi

Yaban tip maya hücreleri amonyum içeren kuvvetli azot kaynağından yine glutamin içeren kuvvetli azot kaynağına aktarıldığında beta galaktozidaz enzim aktivitesinin (289,3±6,6 ünite) yaklaşık olarak 4 kat arttığı belirlendi. Ayrıca kontrol olarak amonyum içeren ortamdan yeni taze amonyum sülfat içeren ortama aktarılan yaban tip maya hücrelerinde betagalaktozidaz enzim aktivitesi 194,2±14,5 ünite olarak ölçüldü (Şekil 4.7). Kuvvetli azot kaynağı (amonyum) içeren üreme ortamından glutamin ve taze amonyum içeren kuvvetli azot kaynaklarına aktarılan $\Delta nrg1$ mutant maya hücrelerinde beta galaktozidaz enzim aktivitesi glutamin varlığında 270,7±27,5 ünite taze amonyum varlığında 306,7±59,7 ünite olarak ölçüldü. Glutamin ve amonyum gibi kuvvetli azot kaynaklarında, yaban tip ve $\Delta nrg1$ mutant maya hücrelerinde *NTH1* gen ekspresyonunun da farklılık gözlenmedi. Bu durum Nrg1 represör proteininin *NTH1* geninin negatif regülatörü olduğuna dair bulgulara destek vermektedir.



Şekil 4.7. Kuvvetli azot kaynağında yaban tip ve $\Delta nrg1$ mutant maya hücrelerinde *NTH1* gen ifadesi (A.S.: Amonyum sülfat)

S. cerevisiae maya hücrelerinde *SUC2* geni sukruzon metabolize edilmesinde sorumlu invertaz enzimini kodlamaktadır. *SUC2* genin transkripsiyonel regülasyonu glukoz baskılaması ile kontrol edilmekte olup stres ile aktive edilmeyen promotor içermektedir. Bu nedenle çalışmalarımızda *SUC2* promotorunu taşıyan *SUC2-LacZ* gen füzyonu kontrol olarak kullanıldı. Yaban tip maya ve $\Delta nrg1$ mutant maya suşlarına *SUC2-LacZ* gen füzyonu içeren plazmitler transform edildi ve *NTH1-LacZ* gen füzyonu ile yapılan tüm çalışmalar *SUC2-LacZ* gen füzyonu içeren transformant maya suşlarında tekrar edildi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1’de verildi. Stres öncesinde yaban tip maya suşunda beta galaktozidaz aktivitesi $0,4 \pm 0,0$ ünite, $\Delta nrg1$ mutant maya suşunda ise $0,58 \pm 0,4$ ünite olarak ölçüldü. Stres sonrası farklı azot kaynaklarında yaban tip maya hücrelerinde ölçülen β -galaktozidaz enzim aktivitesi sırasıyla: amonyum sülfat içeren ortamda $0,24 \pm 0,1$ ünite, glutamin içeren ortamda $0,16 \pm 0,2$ ünite ve prolin içeren ortamda $0,15 \pm 0,3$ ünite olarak belirlendi. $\Delta nrg1$ mutant maya suşunda ise amonyum sülfat içeren ortamda $2,38 \pm 0,9$ ünite glutamin içeren ortamda $1,28 \pm 0,7$ ünite ve prolin içeren ortamda $1,92 \pm 0,6$ ünite olarak tespit edildi. *SUC2* geninde stres öncesi ve sonrasında uygulanan farklı azot kaynaklarında ekspresyon gözlenmedi.

Çizelge 4.1. Farklı azot kaynaklarının *SUC2* gen ekspresyonuna etkisi

Üreme Ortamı	Azot Kaynağı	Ortalama β -galaktozidaz aktiviteleri* (\pm SD)	
		Yaban Tip	<i>Δnrg1</i>
Stres Öncesi	Amonyum Sülfat	0,4 \pm 0,0	0,58 \pm 0,4
Stres Sonrası	Amonyum Sülfat	0,24 \pm 0,1	2,38 \pm 0,9
	Glutamin	0,16 \pm 0,2	1,28 \pm 0,7
	Prolin	0,15 \pm 0,3	1,92 \pm 0,6

4.3. Nrg1 Proteinin Hücre İçi Trehaloz Birikimine Etkisi

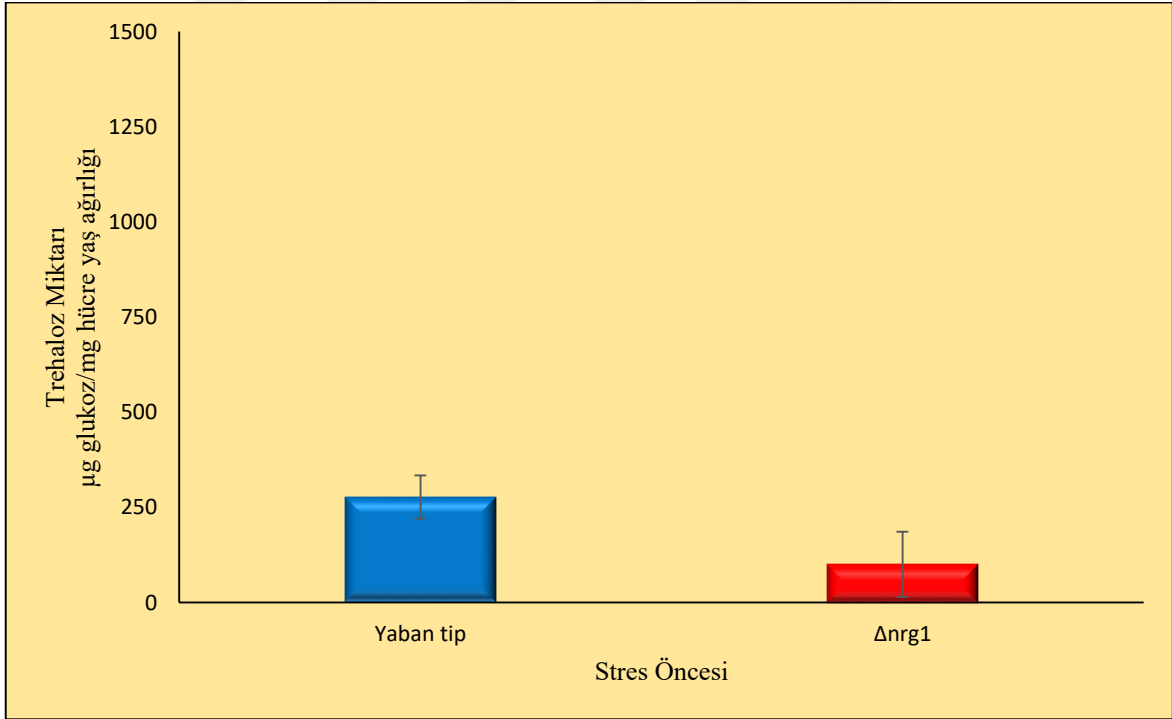
Trehaloz molekülü *S. cerevisiae* tarafından normal üreme koşullarda durağan aşamada biriktirilmesine rağmen stres koşullarında üreme fazından bağımsız olarak biriktirilen önemli bir depo karbonhidrattır. Stres koşulları sona erdiğinde ise hızlıca yıkılarak enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Çalışmanın bu bölümünde Nrg1 proteininin hücre içinde biriktirilen trehaloz miktarına olan etkisi araştırıldı. Normal üreme koşullarında ve farklı azot kaynağı içeren ortamlarda yaban tip ve *Δ nrg1* mutant maya suşlarının hücre içinde biriktirdikleri trehaloz miktarı enzimatik yöntem ile belirlendi. Trehaloz miktarı maya hücrelerinin yaş ağırlıklarına göre hesaplanarak, maya suşlarının biriktirdiği glukoz miktarı hücrelerin yaş ağırlıkları kullanılarak mg hücre yaş ağırlığında ölçülen mikrogram glukoz (μ g glukoz/mg hücre yaş ağırlığı) olarak verildi.

Çevresel stresin olmadığı, azot kaynağı olarak amonyumun kullanıldığı üreme koşullarında, trehaloz miktarı yaban tip maya hücrelerinde 277,4 \pm 57 μ g glukoz/mg hücre yaş ağırlığı ve *Δ nrg1* mutant maya hücrelerinde 100 \pm 86 μ g glukoz/mg hücre yaş ağırlığı olarak belirlendi (Şekil 4.8). *Δ nrg1* mutant maya hücrelerinde trehaloz miktarının yaban tip hücrelerde biriktirilen trehaloz miktarından iki kat düşük olduğu gözlemlendi. *NTH1* gen ekspresyonunun *Δ nrg1* mutant maya hücrelerinde yaban tip hücrelerden yüksek olmasından dolayı *Δ nrg1* mutant maya hücrelerinde trehaloz birikimi düşmüş olabilir. Ancak sentezlenen trehalaz enziminin aktif olmadığı ve stres koşullarında PKA tarafından fosforlanarak aktive edildiği bilinmektedir. Bu durumda normal koşullarda *NTH1* ekspresyonunda ki artış direk olarak trehaloz birikimi ile ilişkilendirilemez. Diğer bir olasılık ise TPS kompleksinin trehaloz sentezlememesi olabilir.

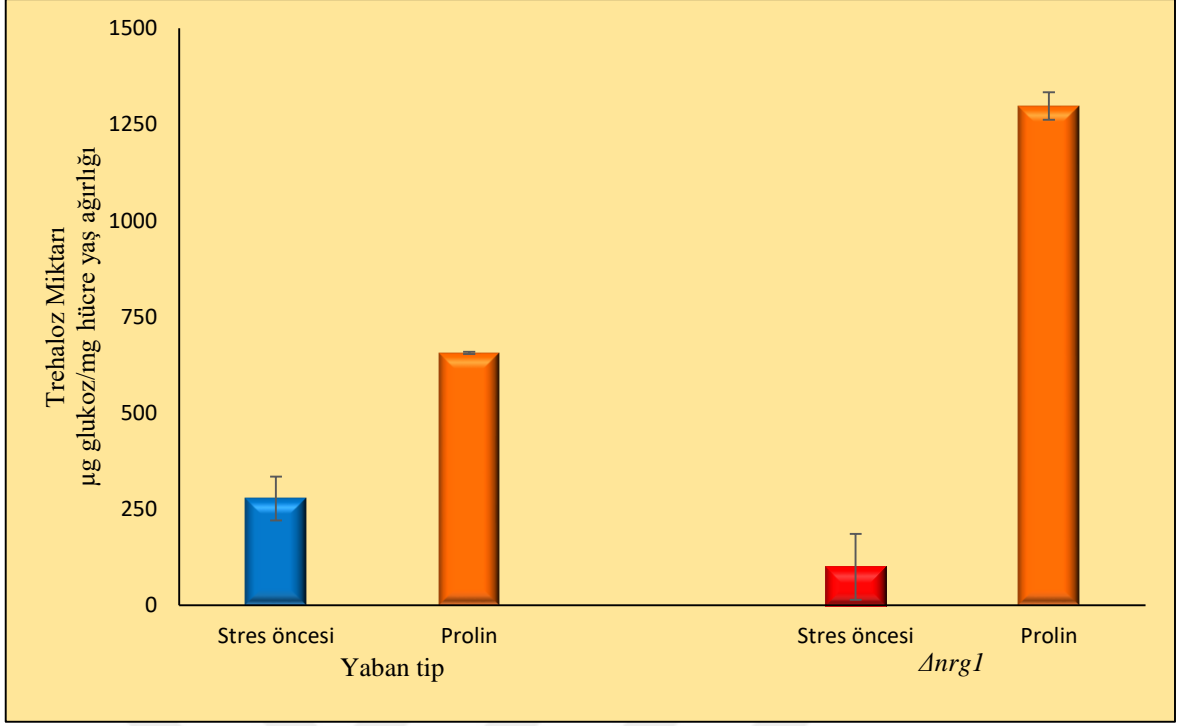
Amonyum içeren kuvvetli azot kaynağında üretilen maya hücreleri prolin içeren zayıf azot kaynağına geçirildiklerinde, trehaloz miktarı yaban tip maya hücrelerinde 656,1 \pm 2,6 μ g glukoz/mg hücre yaş ağırlığı ve *Δ nrg1* mutant maya hücrelerinde 1298 \pm 36 μ g glukoz/mg

hücre yaş ağırlığı olarak ölçüldü (Şekil 4.9). Trehaloz miktarının yaban tip maya hücrelerinde 2 kat arttığı, $\Delta nrg1$ mutant maya hücrelerinde ise yaklaşık 13 kat arttığı belirlendi.

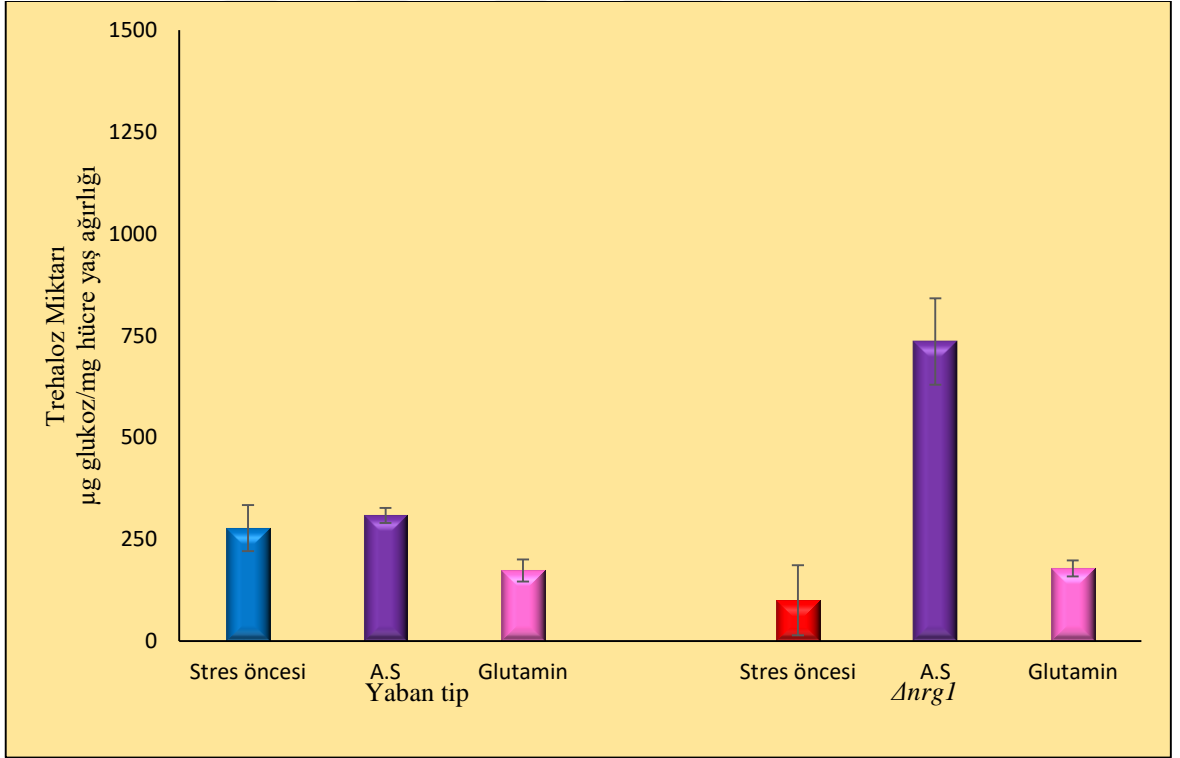
Yaban tip maya hücreleri amonyum içeren kuvvetli azot kaynağından farklı kuvvetli azot kaynağı (glutamin) içeren üreme ortamına aktarıldığında, hücre içinde biriktirilen trehaloz miktarında ($173,5 \pm 27,1$ μg glukoz/mg hücre yaş ağırlığı) çok az bir düşme gözlenirken; aynı azot kaynağına fakat taze olan üreme ortamına aktarılan yaban tip maya hücrelerinde biriktirilen trehaloz miktarında ($308,4 \pm 18,4$ μg glukoz/mg hücre yaş ağırlığı) çok az bir artış gözlemlendi (Şekil 4.10). Bu artış ve düşüş çok kayda değer olmadığından yaban tip hücrelerde kuvvetli azot kaynağının trehaloz birikimine çok fazla etkisi olmadığı söylenebilir. $\Delta nrg1$ mutant maya hücreleri amonyum sülfat içeren ortamdan glutamin içeren ortama aktarıldığında, hücre içinde biriktirilen trehaloz miktarının ($735,5 \pm 106,0$ μg glukoz/mg hücre yaş ağırlığı) 7 kat arttığı, amonyum sülfat içeren ortama aktarıldığında ise trehaloz miktarının ($178,3 \pm 19,7$ μg glukoz/mg hücre yaş ağırlığı) çok fazla artmadığı hemen hemen yaban tip ile aynı miktarda olduğu belirlendi.



Şekil 4.8. Stres öncesi yaban tip ve $\Delta nrg1$ mutant maya hücrelerinde trehaloz birikimi



Şekil 4.9. Azot açlığında yaban tip ve $\Delta nrg1$ mutant maya hücrelerinde trehaloz birikimi



Şekil 4.10. Kuvvetli azot kaynağında yaban tip ve $\Delta nrg1$ mutant maya hücrelerinde trehaloz birikimi (A.S.: Amonyum sulfat)

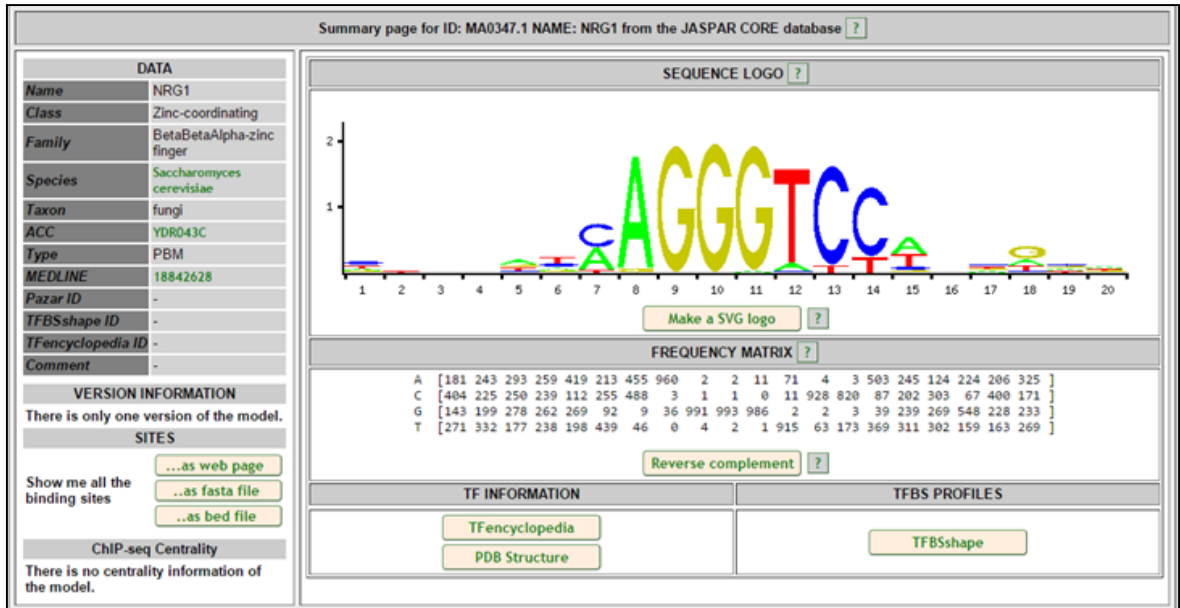
4.4. Biyoinformatik Çalışmalardan Alınan Sonuçlar

Nrg1 proteininin DNA bağlanma bölgesi C₂H₂ çinko-parmak motifi içermektedir. JASPARCORE transkripsiyon faktörleri bağlanma profiline (ID: MA0347.1) göre, Nrg1 proteininin DNA üzerindeki bağlanma dizileri ‘CCCT–AGGG’ olarak belirlendi ve Şekil 4.11’de verildi.

SGD veri tabanından *NTH1* geninin yaklaşık 1000 bç içeren promotor bölgesi kullanılarak yapılan çalışmada, promotor bölgesinde bulunan Stress Response Element (STRE) elemanlarının bağlanma bölgeleri (CCCCT/AGGGG) belirlendi ve Şekil 4.12’de verildi.

Yine SGD veritabanı kullanılarak Nrg1 proteininin amino asit dizisinin tamamı ve bu proteinin çinko parmak DNA bağlanma bölgesine denk gelen amino asit dizileri tespit edildi (Şekil 4.13). Bu diziler ayrı ayrı I-TASSER programına gönderilerek tahmini 3 boyutlu yapıları oluşturuldu.

3D Dart-webserver programı aracılığıyla *NTH1* promotorunun üzerinde ‘CCCCT/GGGGA’ elemanlarını içeren DNA parçacığı kesilerek 3 boyutlu hale getirildi. (gagcatcgtgttaggacgaagCCCCTtatCCCCTagttaccgaagaaggccaccaatctta /60bp) pdb. dosyası, (‘cccet.pdb’) olarak kaydedildi. NPdock–Gensilico.pl programı aracılığı ile Nükleik asit-Protein Docking çalışması yapıldı.



Şekil 4.11. Nrg1 proteininin JASPAR TF Bağlanma bölge profili (ID: MA0347.1)

```

1   TATTCTGGAGCAATGATGTGGTTAGCACAAATCTTTAAGGTCTTGTCTCTT
52  CTCATCAATATTCTAACCTTGTTAGTCTTTTTGTTCTTCAAGAACTTACAG
103 TCACCAGTACCTCTTTCTTTCCATTCCCTGGGCATCGGCATCGAATCTGAAA
154 AGCTTGGCTCTGACCTTGTAAGAACTTCTTCGTCTTCTTCCATTGTCTTA
205 ACATCTACCTTTTCCAGGTGAACCACTGGTTCAAAATGGATATCTGGTGAT
256 TCTGGAGCATCATCACCTTCTTCTGGTTTCCTCCTTGGTATCTTCTTCG
307 TCTTTCTTGGTTTCTGGCTTTTCGGCCTTCTTACCACCAAACATGGAGAAG
358 ACAGCAGAGGATGGTGGCTTTGGAGCAGCCTCTTCTTCTTGTGCGACGACA
409 GGTTTCTTATCTTCGCTAGACATTCTTTTTCTATAGTTGTGTTTATCTTCT
460 TGCTTTTATTTCAAATTAACAAGATCTTTCTTCTTCTCCAATTGAATAT
511 CAATTCATCATCAGATTTTAGTTTCTGTTTTATTTTTTATTTTTTATTT
562 TTTTTTTGTTTCTTGTTTTCCGCGTACTTCCCGCTGGGCGAAAAAAGAAAT
613 GAAAAAAGAAACGACAGGAGCATCGTGTAGGACGAAGCCCCTTATCCCCT
664 AGTTACCGAAGAAGGCCACCAATCTTAAGTTTGATAGAGCAGTACTTATAT
715 AAGGCTATATATAGACTGGTTCACAAGGTTATCAATATGAACTTGCGCGA
766 TCACCGATTTACGGGATTTTTTCAGGAGCGAGGTACAAGATTTGTTGGCCTG
817 AAAAGATCGCAAAACATTAGCTAGAAATTTTCCCCCTATCGTTTTCCGTAG
868 AGTAAATATAATATCAAGAAGATAGTTTTATATTGACTGATTTCACAACCA
919 ACTGCATAGATATAAGGAGATTACTAGATACAAGAACGCCTGATAAACAAA
970 AAAAGAAAAATTAACAAAAAATCAGTAGA

```

Şekil 4.12. *NTH1* promotoru ve üzerindeki olası Nrg1p bağlanma bölgeleri (5'-CCCCT-3')

```

1   MFYPYNYSNLNVSTMPALPGISAFDGMQDEENVEISPERKYQTLPLVLTN 50
51  SHVVENELKHKLNKTAADFQYQTKSENGSEKWEPKYLITPNLQTRSVSFD 100
101 NSSVQYNSDSSEKSSLSQLTCNSSIIQQPENGIVSNDAYNKMANSRYSK 150
151 TRKQRTDPRNTLSDEEDLEQRRKYICKICARGFTTSGHLARHNRIHTGEK 200
201 NHCCPYKGCTQRFSRHDNCLQHYRTHLLKKGQ 231

```

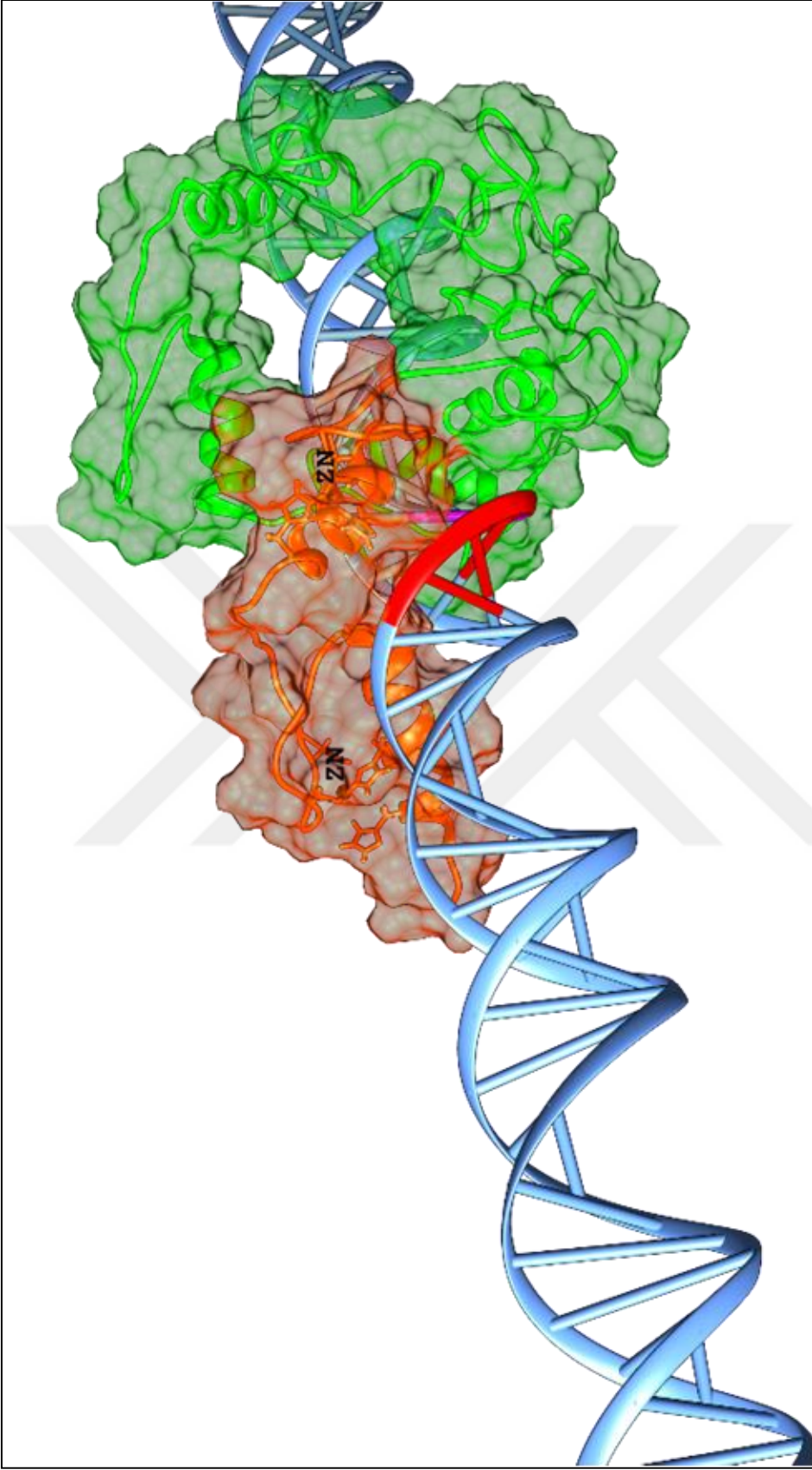
Şekil 4.13. Nrg1p amino asit dizisi ve çinko-parmak DNA bağlanma bölgesi

VMD programı kullanılarak Nrg1 proteininin *NTH1* promotoruna olan uzaklığı hesaplandı. Nrg1 proteininin *NTH1* promotoruna bağlanmasını gösteren gerçeğe en yakın 3 boyutlu modeli görselleştirildi. Nrg1p-*NTH1* promotor bağlanmasının oluşturulan görseli Şekil 4.14'te verildi.

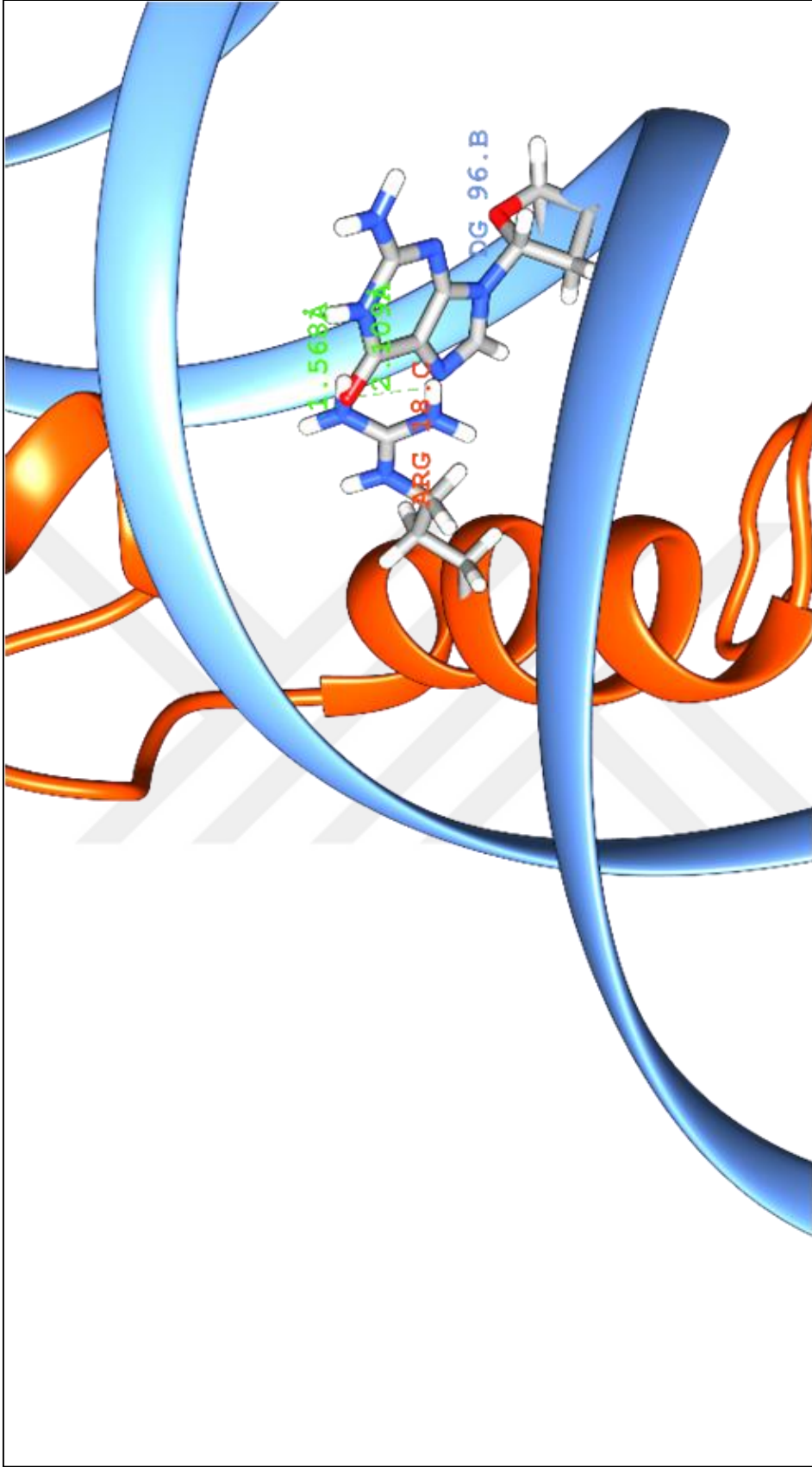
Nrg1p DNA bağlanma bölgesi ile *NTH1* promotorunda ki Nrg1p bağlanma bölgesindeki bazlar arasındaki mesafeler ölçülerek Angström birimi olarak verildi. Nrg1 proteininin 18. amino asiti olan arjinin (Arg¹⁸) ile *NTH1* promotorundaki 96. Guaninin atomları arasındaki olası mesafe 1.568 – 2.109 Å olarak hesaplandı ve Şekil 4.15'te verildi. Nrg1 proteininin 8. amino asiti olan arjinin (Arg⁸) ile *NTH1* promotorundaki 96. Guaninin atomları arasındaki olası mesafe 5.008 – 3.709 Å olarak hesaplandı ve Şekil 4.16'da verildi.

Nrg1 proteininin 15. amino asiti olan histidin (His¹⁵) ile *NTH1* promotorundaki 97. Guanininin atomları arasındaki olası mesafe $2.777 - 0.969 \text{ \AA}$ olarak hesaplandı ve Şekil 4.17'de verildi. Nrg1 proteininin 15. amino asiti olan histidin (His¹⁵) ile *NTH1* promotorundaki 98. Guanininin atomları arasındaki olası mesafe $3.606 - 2.838 \text{ \AA}$ olarak hesaplandı ve Şekil 4.18'de verildi. Nrg1 proteininin 12. amino asiti olan threonin (Thr¹²) ile *NTH1* promotorundaki 99. Adenin atomları arasındaki olası mesafe $4.030 - 4.415 \text{ \AA}$ olarak hesaplandı ve Şekil 4.19'da verildi.

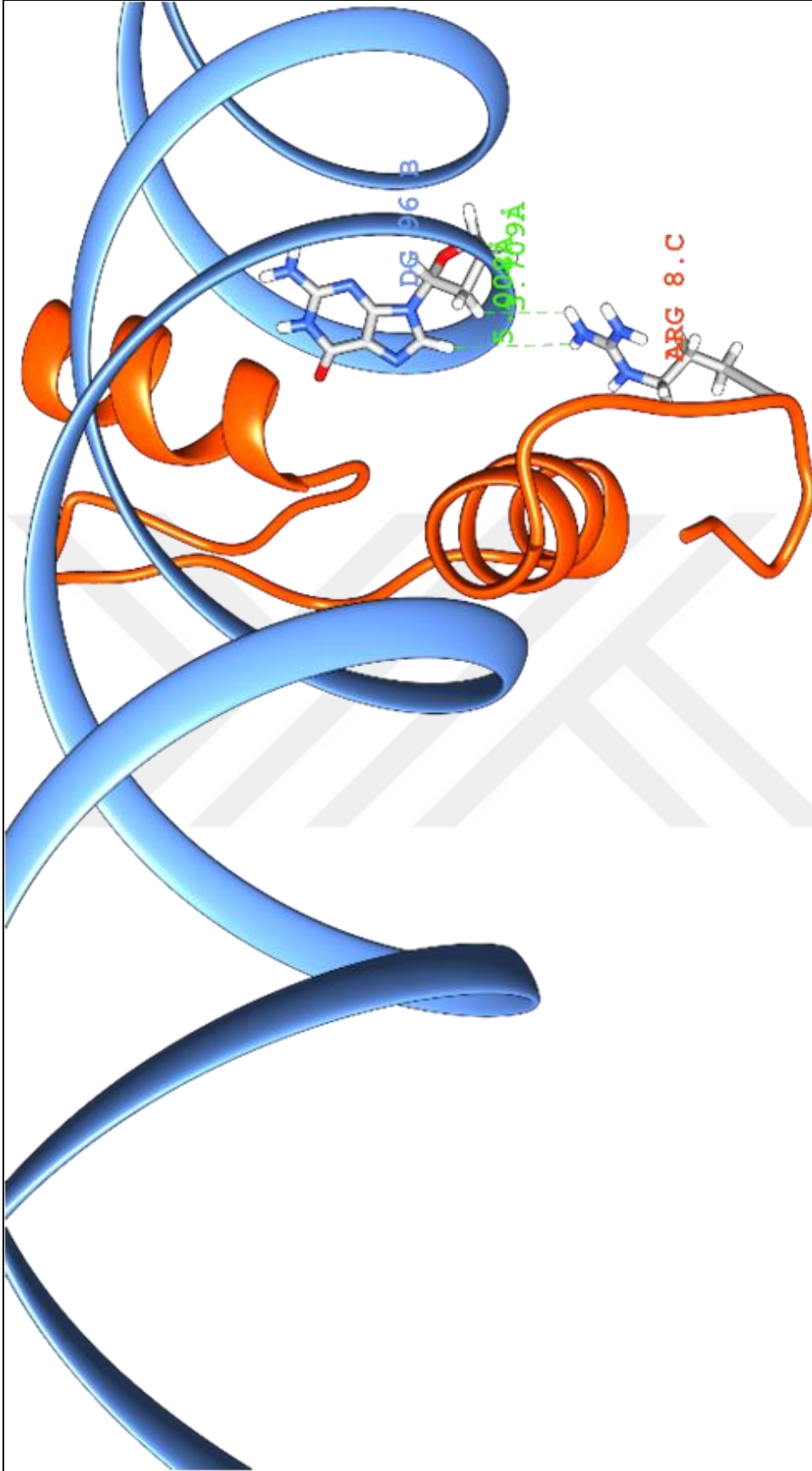




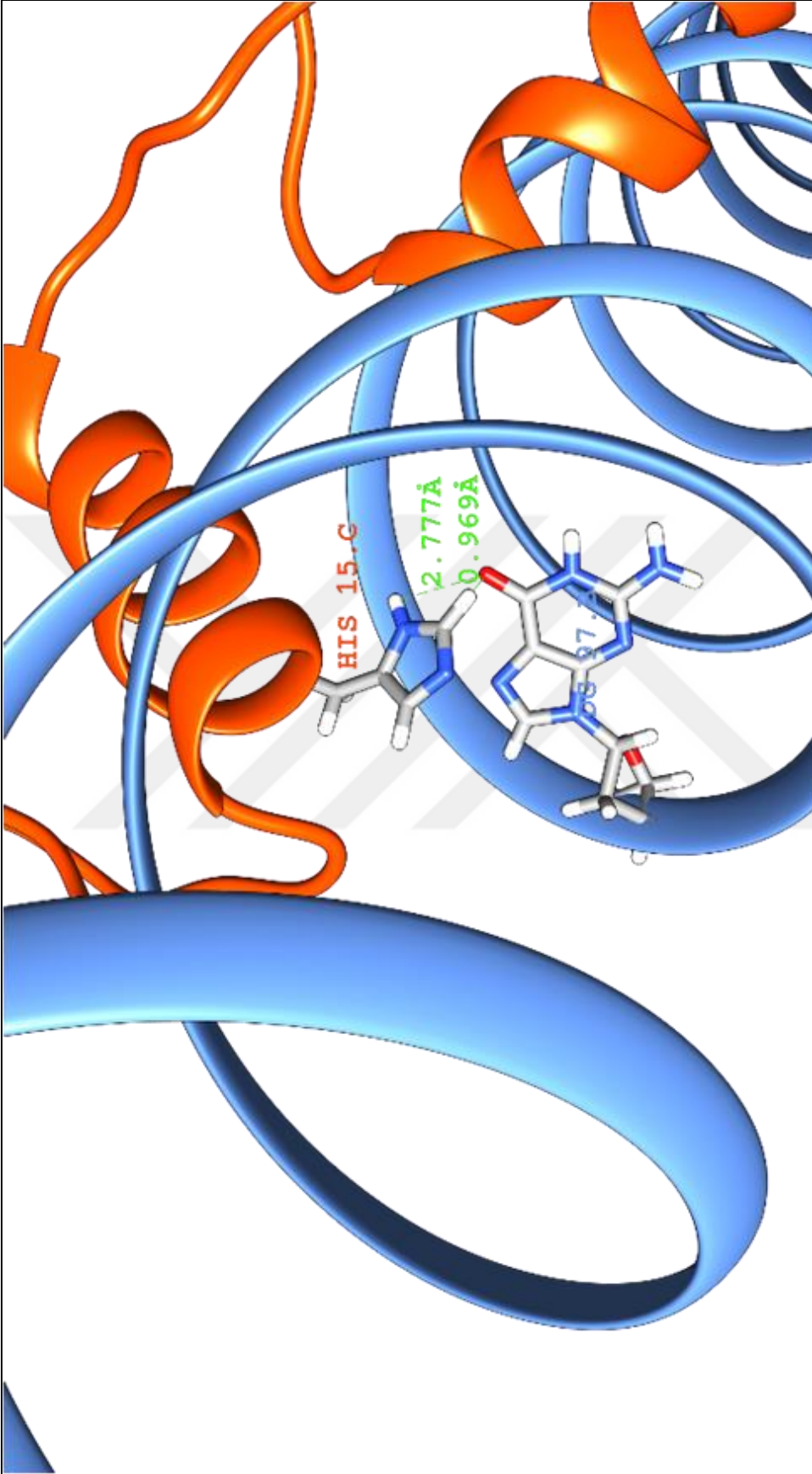
Şekil 4.14. *NTH1* promotörü ve Nrg1p bağlanma modeli



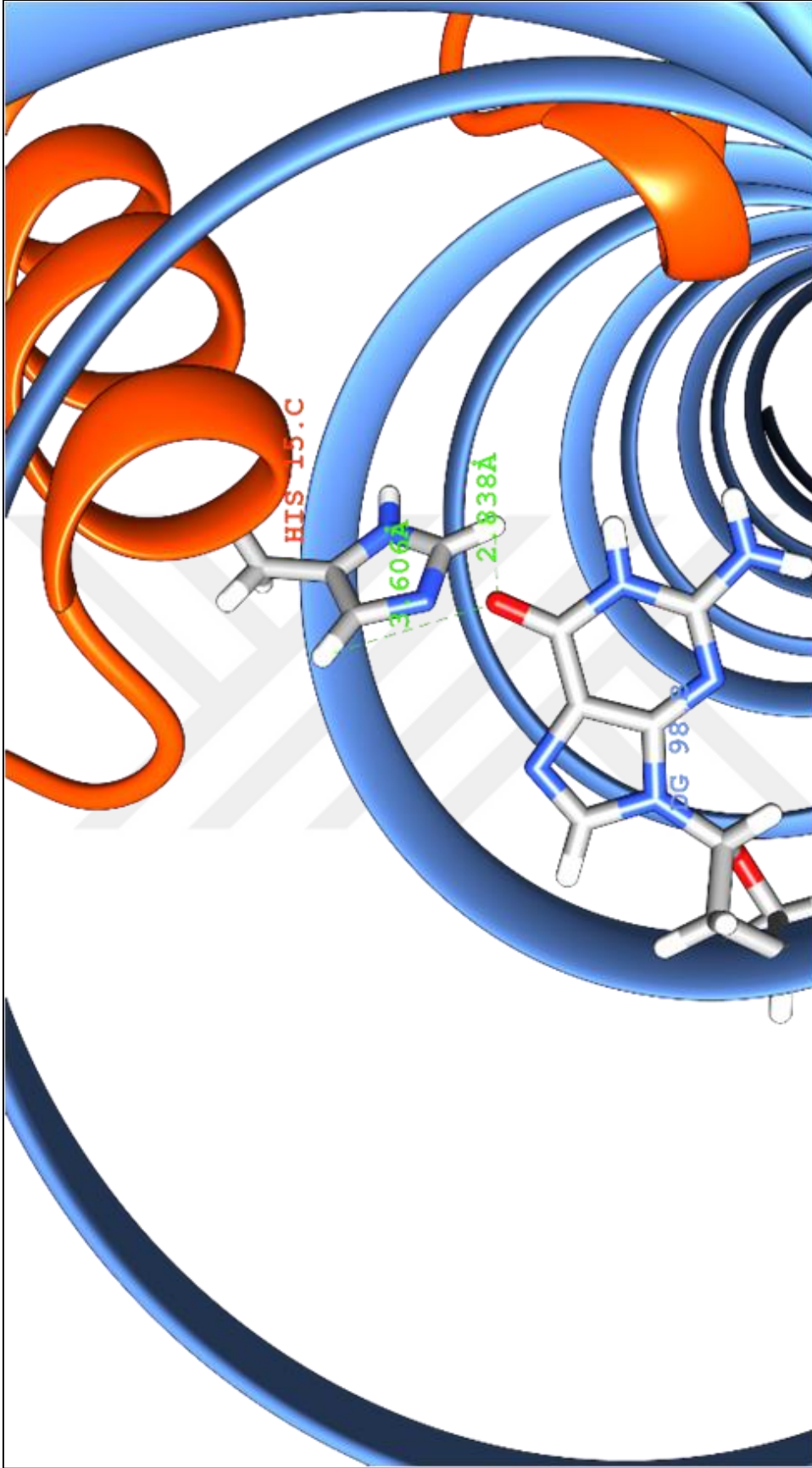
Şekil 4.15. Arg¹⁸ – G₉₆ atomları arasındaki uzaklık



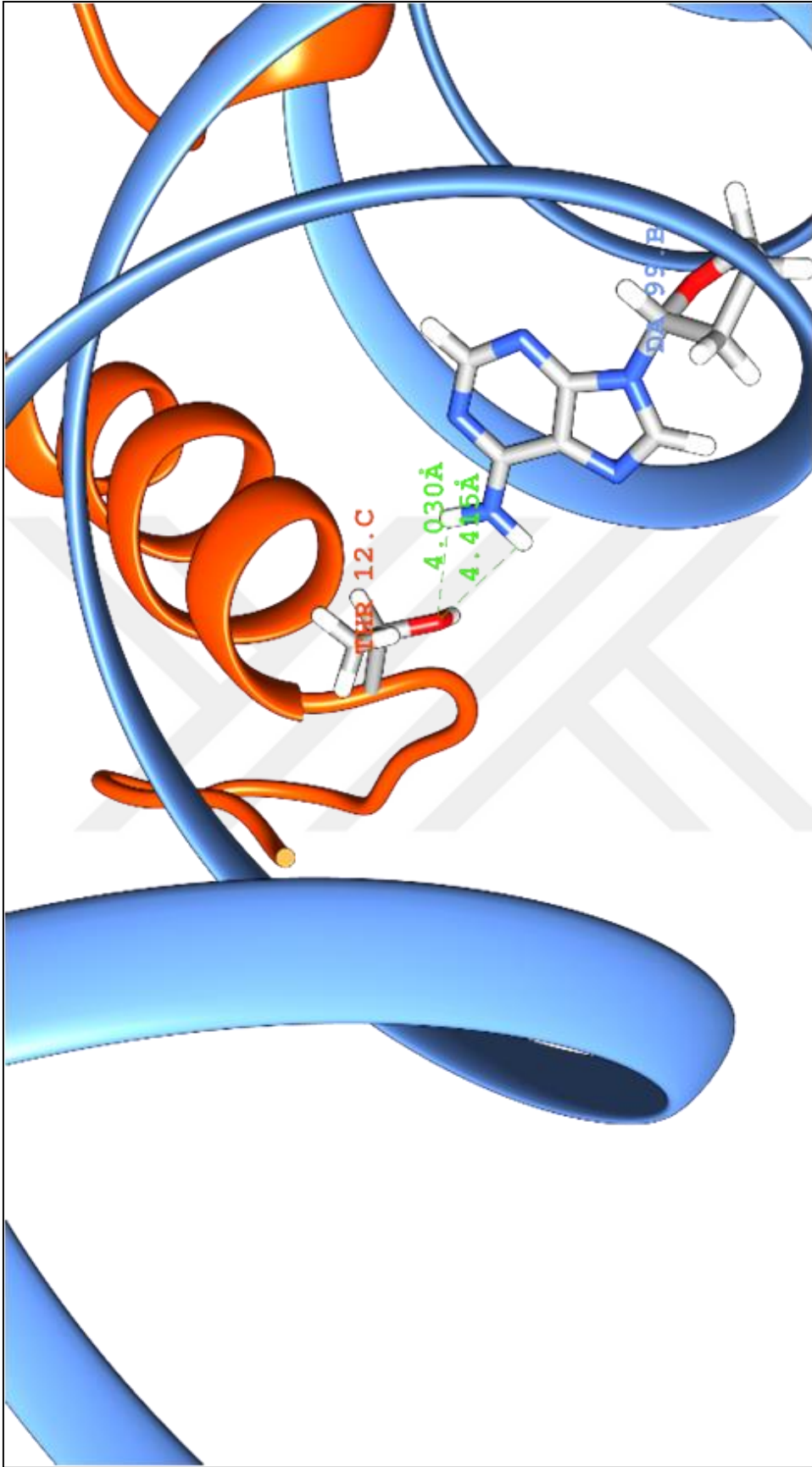
Şekil 4.16. Arg⁸ – G₉₆ atomları arasındaki uzaklık



Şekil 4.17. His¹⁵ – G₉₇ atomları arasındaki uzaklık



Şekil 4.18. His¹⁵ – G₉₈ atomları arasındaki uzaklık



Şekil 4.19. Thr¹² – A₉₉ atomları arasındaki uzaklık

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

S. cerevisiae maya hücrelerinde TOR sinyal yolağı besin miktarına göre kontrol edilen genlerin ekspresyonlarını kontrol etmektedir. Bu kontrolü ise ilgili genlerin regülasyonunda görev alan transkripsiyon faktörlerinin nükleer lokalizasyonlarını kontrol ederek yapmaktadır. Besin açlığında özellikle Gln3p, Gat1p, Rtg1p, Rtg3p ve Msn2p-Msn4p gibi transkripsiyon faktörlerinin sitoplazmik lokasyonunu değiştirmektedir. Bu transkripsiyon faktörlerinden özellikle Msn2p-Msn4p transkripsiyon faktörleri *NTH1* geninin promotorunda bulunan STRE dizilerine bağlanarak *NTH1* gen ekspresyonunun aktivasyonunda görev almaktadır. Msn2p-Msn4p transkripsiyon faktörleri gibi Nrg1 proteini de çinko parmak motifi içermekte ve DNA'ya bağlanabilmektedir. Nrg1 proteininin *NTH1* promotoru üzerinde bağlanma bölgesi Msn2p-Msn4p bağlanma bölgesi ile aynıdır. Msn2p-Msn4p *NTH1* geninin aktivasyonunda görev aldığı bilinmektedir. Yaptığımız çalışmada Nrg1p yokluğunda *NTH1* gen ekspresyonunda yaklaşık olarak 7 kat artma olduğu belirlendi. Bu nedenle Nrg1 proteininin *NTH1* geninin transkripsiyonel represörü olduğu tespit edildi.

CYC8 geni tarafından kodlanan Cyc8p (Ssn6p) ko-represör olup *TUP1* geni tarafından kodlanan Tup1p ile kompleks oluşturmaktadır. Cyc8p/Tup1p represör kompleksi olup ilgili genlerin transkripsiyonunu diğer transkripsiyon faktörleri ve/veya proteinlerle etkileşerek baskılamaktadır. Cyc8p/Tup1p kompleksi aynı zamanda SWI/SNF ve SAGA ko-aktivatör kompleksleri ile etkileşime geçerek bu komplekslerin promotora taşınmasında ve genlerin aktivasyonunda da görev almaktadır. SWI/SNF ve SAGA kompleksleri, promotorlarında transkripsiyon faktörlerinin veya aktivatör proteinlerin bağlanması için gerekli olan fakat histonlar tarafından kapatılan bölgelere, histon modifikasyonları yaparak açılmasını ve bu proteinlerin erişimini sağlamaktadır. SWI/SNF ve SAGA komplekslerinin Cyc8p/Tup1p aracılığıyla promotora taşınması ve promotorda gerekli bölgenin histonlardan açılması genlerin aktivasyonu veya represyonu için oldukça önemlidir. Cyc8p/Tup1p kompleksi DNA'ya bağlanamadığı için DNA'ya bağlanabilecek proteinlerle etkileşime geçmektedir. Örneğin Mig1p, Cyc8p/Tup1p kompleksinin baskılanacak olan genin promotoruna getirilmesinde görevli olup, Msn2p-Msn4p ve Nrg1p gibi çinko parmak DNA bağlanma motifine sahip bir transkripsiyon faktörüdür. Nrg1 represör proteininin de Cyc8p/Tup1p kompleksi ile etkileşerek *SUC2*, *STAI* ve *GAL* genlerinin transkripsiyonunun baskılanmasında görev aldığı belirlenmiştir (Zhou ve Winston, 2001; Park ve ark., 1999).

Nrg1p, Mig1p gibi glukoz baskılamasında negatif regülatör olarak görev yapmaktadır. Nrg1 proteininin DNA üzerindeki bağlanma dizisi CCCCT ve/veya CCCTC olmakla birlikte Mig1 proteininin DNA üzerindeki bağlanma dizisinden ((G/C)(C/T)GG(G/A)G) tamamen farklıdır. Ayrıca Mig1 proteininin represyon mekanizması Snf1 kinaz bağımlı fosforilasyon ve buna bağlı nükleer lokalizasyonu ile gerçekleşirken, Nrg1 proteinin baskılama mekanizması ile ilgili henüz yeterli bilgi bulunmamaktadır. Nrg1p ve paraloğu olan Nrg2 proteininin doğrudan veya dolaylı olarak Snf1 kinazın hedef proteinlerinden olabileceği ve Snf1-bağımlı düzenlenen genlerin regülasyonunda görev alabileceği öne sürülmüştür (Vyas ve ark., 2001). Ancak henüz Nrg1 proteininde Snf1 kinaz için uygun fosforilasyon bölgeleri belirlenmemiştir. Bu nedenle Nrg1 proteininin Mig1 proteininden farklı bir şekilde baskılama mekanizmasına sahip olduğu düşünülmektedir (DeVit ve ark., 1997). Mig1p glukoz baskılaması için gerekli olan bir transkripsiyon faktörü olmakla beraber bazı genlerin baskılanmasında tek başına yeterli olmamaktadır. Örneğin glukoz baskılamasına uğrayan bazı genlerin promotorlarında Mig1p bağlanma bölgesi bulunmasına rağmen Mig1p yokluğunda da baskılandıkları belirlenmiştir (Ronne, 1995). Ayrıca bazı genlerin transkripsiyonlarının tamamen baskılanabilmesi için promotorlarına birden fazla represör proteininin bağlanması gerekmektedir (Lutfiyya ve Johnston, 1996). Bu nedenle glukoz varlığında *STA2* geninin Mig1p ve Nrg1p tarafından baskılanmasında olduğu gibi, bazı genlerin promotorlarında ilave represör protein bağlanma bölgelerinin bulunması, genin sıkı bir şekilde ve tamamen baskılanmasını sağlamak ve gereksiz gen ekspresyonunu önlemektedir. Ayrıca aynı genin farklı iç ve dış sinyallere göre farklı represörler aracılığıyla baskılanabileceğini düşündürmektedir.

NTH1 geninin promotor bölgesinde, *STA2* geninde olduğu gibi, Mig1p ve Nrg1p bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. Daha önce yapılan bir çalışmada $\Delta mig1$ mutant maya suşlarında *NTH1* gen ekspresyon seviyesinin arttığı belirlenmiştir (Solak, 2014). Mig1 transkripsiyon faktörünün *NTH1* transkripsiyonunu indirek olarak aktive ettiği, bu aktivasyonda Mig1p-Ssn6p/Tup1p kompleksinin SWI/SNF ve/veya SAGA aktivatör komplekslerini *NTH1* promotoruna getirerek transkripsiyonu aktive ettiği öne sürülmüştür. Benzer şekilde çalışmamızda da $\Delta nrg1$ mutant maya suşlarında *NTH1* gen ekspresyon seviyesinin arttığı belirlenmiştir. Mig1p için oluşturulan regülasyon modeli Nrg1p içinde geçerli olabilir. *STA2* geninde olduğu gibi, *NTH1* geninde de Mig1p ve Nrg1p proteini *NTH1* gen ekspresyonunun tamamen baskılanması için gerekli olabilir. Nitekim yapılan bir çalışmada $\Delta mig1$ mutant maya suşunda, $\Delta nrg1$ mutant maya suşunda, $\Delta mig2$ mutant maya suşunda ve $\Delta nrg1\Delta mig1\Delta mig2$ triple mutant maya suşunda *SUC2*, *GAL1* ve *GAL10*

genlerinin ekspresyonu incelendiğinde, *Δnrg1Δmig1Δmig2* triple mutant maya suşunda diğertek mutasyon içeren maya suşlarına göre daha fazla ekspres oldukları belirlenmiştir (Zhao ve Winston, 2001). Bu nedenle yapılan bu tez çalışmasının *Δmig1Δnrg1* double mutant maya suşunda tekrar edilmesi uygun olacaktır.

Cyc8p/Tup1p kompleksi ozmotik şok ve karbon kaynağına bağımlı streste hedef genin promotorundan ayrılmayarak SWI/SNF ve SAGA aktivatör komplekslerinin promotora getirilmesinde görev aldığı rapor edilmiştir (Papamichos-Chronakis ve ark., 2002; Proft ve Struhl, 2002; Mennella ve ark., 2003). Cyc8p/Tup1p kompleksinin ‘represör’ görevi, stres koşullarında bağlandığı regülatör proteine göre ‘aktivatör’ görevine dönüşmektedir. Özellikle Cyc8 proteininin bu fonksiyon değişiminde önemli role sahip olduğu belirlenmiştir (Hickman ve Winston, 2007). Bu nedenle yürütülen çalışmanın *Δmig1Δnrg1* double mutant maya suşlarına ilave olarak *Δcyc8Δmig1* ve *Δcyc8Δnrg1* double mutant maya suşlarında da tekrar edilmesi çalışmada elde edilen sonuçların desteklenmesi açısından uygun olacaktır.

Nrg1 proteininin paralogu olan Nrg2p, *Δnrg1* mutant maya suşlarında Nrg1 proteininin görevlerini yapmış olabilir. Bu nedenle önerilen tez kapsamında *Δnrg2* mutant maya suşları ile ilgili çalışma sunulmamasına rağmen tez çalışmasının yayına dönüştürülmesi sırasında mutlaka *Δnrg1Δnrg2* double mutant maya suşunda çalışmaların tekrar edilmesi gerekmektedir.

Trehaloz sentezi TPS (Trehaloz Fosfat Sentaz) kompleks enzimi ile gerçekleştirilmektedir. TPS kompleksi Tps1p, Tps2p, Tps3p ve Tsl1p olmak üzere 4 alt üniteden oluşmaktadır (Elbein ve ark., 2003). Stres bağımlı trehalozun yıkımı ise Nth1p ile yapılmaktadır. Ancak bu yıkım bir takım transkripsiyonel ve posttranslasyonel mekanizmalarla kontrol edilmektedir. Çalışmamızda trehaloz miktarının logaritmik aşamada yaban tip maya hücrelerinde 2 kat arttığı, *Δnrg1* mutant maya hücrelerinde ise yaklaşık 13 kat arttığı belirlendi. Bu durum Nrg1 proteininin TPS kompleksinin de represörü olabileceğini düşündürmektedir.

Nrg1 proteini *ENAI* geninin ekspresyonunu STRE dizilerine bağlanarak baskılamaktadır (Lamb ve Mithcell, 2003). Yaptığımız biyoinformatik çalışmalarda Nrg1 proteininin *NTH1* promotorunda üç STRE bağlanma bölgesi içerdiği belirlendi. Daha sonra modelleme işlemi yaptığımızda Nrg1p’nin DNA bağlanma bölgesinde yer alan aminoasit dizisi ile *NTH1* promotorunda bulunan STRE elementleri arasındaki uzaklıklar hesaplandı. Hesaplanan ölçümlerde Nrg1 proteininin STRE elementindeki bazlara oldukça yakınlaştığı belirlendi. Bu nedenle Nrg1p’nin *NTH1* promotoruna bağlanma olasılığının yüksek olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak Nrg1 proteini *NTH1* geninin ekspresyonunda negatif regülatör olarak görev aldığı belirlendi. Ayrıca Nrg1 proteininin TPS kompleksinde baskılanmasında görevi olabilir. Bu konuyla ilgili çalışmaların daha sonra planlanarak yapılması uygun olacaktır



KAYNAKLAR

- App H., Holzer H., 1989. Purification and Characterization of Neutral Trehalase From The Yeast Abys1 Mutant. *Journal of Biological Chemistry*. 264: 17583-17588.
- Arguelles J. C., 2000. Physiological Roles of Trehalose in Bacteria and Yeasts: A Comparative Analysis. *Archives of Microbiology*. 174: 217-224.
- Attfield P. V., 1987. Trehalose Accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* During Exposure to Agents That Induce Heat Shock Response. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 225 (1, 2): 259-263.
- Ausubel S. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K., 1993. *Current Protocols In Molecular Biology*. New York: Grene Publishing Associates and Willey-Interscience.
- Becker A., Schlöder P., Steele J. E., Wegener G., 1996. The Regulation of Trehalose Metabolism in Insects. *Cellular and Molecular Science*. 52 (5): 433-439.
- Belinchon M. M., Gancedo J. M., 2007. Glucose Controls Multiple Processes in *Saccharomyces cerevisiae* Through Diverse Combinations of Signalling Pathways. *FEMS Yeast Research*. 7: 808-818.
- Bell W., Sun W., Hohmann S., Wera S., Reinders A., De Virgilio C., Wiemken A., Thevelein J. M., 1998. Composition and Functional Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* Trehalose Synthase Complex. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 33311-33319.
- Blazquez M. A., Lagunas R., Gancedo C., Gancedo J. M., 1993. Trehalose-6-Phosphate, A New Regulator of Yeast Glycolysis That Inhibits Hexokinases. *Federation Of European Biochemical Societies Letters*. 329 (1-2): 51-54.
- Brandriss M. C., Magasanik B., 1979a. Genetics and Physiology of Proline Utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: Enzyme Induction by Proline. *Journal of Bacteriology*. 140: 498-503.
- Brandriss M. C., Magasanik B., 1979b. Genetics and Physiology of Proline Utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: Mutation Causing Constitutive Enzyme Expression. *Journal of Bacteriology*. 140: 504-507.

- Brauer M J., Huttenhower C., Airoidi E. M., Rosenstein R., Matese J. C., Gresham D., Boer V. M., Troyanskaya O. G., Botstein D., 2008. Coordination of Growth Rate, Cell Cycle, Stress Response, and Metabolic Activity in Yeast. *Molecular Biology Of The Cell*. 19: 352–367.
- Cabib E., Leloir L. F., 1958. The Biosynthesis of Trehalose Phosphate, *Journal of Biological Chemistry*. 231: 259-275.
- Cardenas M. E., Cutler N. S., Lorenz M. C., Di Como C. J., Heitman J., 1999. The TOR Signaling Cascade Regulates Gene Expression in Response to Nutrients. *Genes Development*. 13: 3271-3279.
- Courchesne W. E., Magasanik B., 1988. Regulation of Nitrogen Assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: Roles of the Ure2 and Gln3 Genes. *Journal of Bacteriology*. 170: 708-713.
- De Wever V., Reiter W., Ballarini A., Ammerer G., Brocard C., 2005. A Dual Role for PP1 in Shaping the Msn2-Dependent Transcriptional Response to Glucose Starvation. *EMBOJ*. 24 (23): 4115-4123.
- Derisi J. L., Lyer V. R., Brown P. O., 1997. Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale. *Science*. 278: 680-686.
- Devit M. J., Waddle J. A., Johnston M., 1997. Regulated Nuclear Translocation of Mig1 Glucose Repressor. *Mol. Biol. Cell*. 8 (8): 1603-1618.
- Dujon B., 1996. The Yeast Genome Project: What Did We Learn? *Trends in Genetics*. 12: 263-270.
- Elbein A. D., Pan Y. T., Pastuszak I., Carol D., 2003. New Insights on Trehalose: A Multifunctional Molecule. *Glycobiology*. 13 (4): 17-27.
- Flick K. M., Spielowoy N., Kalashnikova T. I., Guaderrama M., Zhu Q., Chang H. C., Wittenberg C., 2003. Grr1-dependent inactivation of Mth1 Mediates Glucose-Induced Dissociation of Rgt1 from *HXT* Gene Promoters. *Molecular Biology Cell*. 14 (8): 3230-3241.
- François J., Blazquez M. A., Arino J., Gancedo C., 1997. Storage Carbohydrates in The Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Sugar Metabolism, Biochemistry, Genetics,*

- Biotechnology and Applications. Technomic Publishing Company. 16: 285-303.
- François J., Neves M. J., Hers H. G., 1991. The Control of Trehalose Biosynthesis *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for a Catabolite Inactivation and Repression of Trehalose-6-Phosphate Synthase and Trehalose-6-Phosphate Phosphatase. *Yeast*. 7 (6): 575-587.
- François J., Parrou J. L., 2001. Reserve Carbohydrates Metabolism In The Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*. 25: 125-145.
- Gancedo J. M., 1998. Yeast Carbon Catabolite Repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 334-361
- Garreau H., Hasan R. N., Renault G., Estruch F., Boy-Marcotte E., Jacquet M., 2000. Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 146(9): 2113-2120.
- Gasch A. P., Spellman P. T., Kao C. M., Carmel-Harel O., Eisen M. B., Storz G., Botstein D., Brown P. O., 2000. Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes. *Mol. Biol. Cell*. 11: 4241-4257.
- Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J. D., Jacq C., Johnston M., Louis E. J., Mewes H. W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S. G., 1996. Life with 6000 genes. *Science*. 274 (5287): 546-567.
- Goldstein A., Lampen J. O., 1975. Beta-D-fructofuranoside Fructohydrolase from Yeast. *Methods in Enzymology*. 42: 504-511.
- Gorner W., Durchschlag E., Martinez-Pastor M. T., Estruch F., Ammerer G., Hamilton B., Ruis H., Schüller C., 1998. Nuclear Localization of the C₂H₂ Zinc Finger Protein Msn2p is Regulated by Stress and Protein Kinase Activity. *Genes Development*. 12 (4): 586-597.
- Gorner 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. *EMBOJ*. 21 (1-2): 135-144.

- Guarente L., Ptashne M., 1981. Fusion of *Escherichia coli* LacZ to The Cytochrom C Gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America, 78: 2199-2203.
- He S., Bystricky K., Leon S., François J. M., Parrou J. L., 2009. The *Saccharomyces cerevisiae* Vacuolar Acid Trehalase is Targeted at the Cell Surface for Its Physiological Function. FEBS Journals. 276: 5432-5446.
- Hickman M. J., Winston F., 2007. Heme levels switch the function of Hap1 of *Saccharomyces cerevisiae* between transcriptional activator and transcriptional repressor. Mol Cell Biol. 27 (21):7414-7424.
- Hirata Y., Andoh T., Asahara T., Kikuchi A., 2003. Yeast Glycogen Synthase Kinase-3 Activates Msn2p-dependent Transcription of Stress Responsive Genes. Mol Biol Cell. 14 (1): 302-312.
- Hohmann S., Magger W. H., 2003. Yeast Stress Responses. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. ISSN: 1610-2096; 14-15.
- Jacquet M., Renault G., Lallet S., De Mey J., Goldbeter A., 2003. Oscillatory Nucleocytoplasmic Shuttling of the General Stress Response Transcriptional Activators Msn2 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal Cell Biology. 161 (3): 497-505.
- Jules M., Guillou V., Francois J., Parrou J. L., 2004. Two Distinct Pathways for Trehalose Assimilation in The Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology. 70: 2771-2778.
- Klosinska M. M., Crutchfield C. A., Bradley P. H., Rabinowitz J. D., Broach J. R., 2011. Yeast Cells can Access Distinct Quiescent States. Genes Development. 25: 336-349.
- Kopp M., Müller H., Holzer H., 1993. Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 268 (7): 4766-4774.
- Kuchin S., Vyas V. K., Carlson M., 2002. Snf1 Protein Kinase and the Repressors Nrg1 and Nrg2 Regulate *FLO11*, Haploid Invasive Growth, and Diploid Pseudohyphal Differentiation. Molecular Cell Biology. 22: 3994-4000.
- Lamb T. M., Mitchell A. P., 2003. The Transcription Factor Rim101p Governs Ion

- Tolerance and Cell Differentiation by Direct Repression of the Regulatory Genes *NRG1* and *SMP1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. 677-686.
- Liao X. B., Clare J. J., Farabaugh P. J., 1987. The Upstream Activation Site of a Ty2 Element of Yeast is Necessary but not Sufficient to Promote Maximal Transcription of the Element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 8520-8524.
- Londesborough J., Varimo K., 1984. Characterization of Two Trehalases In Baker's Yeast. *Biochemical Journal*. 219: 511-518.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
- Lutfiyya L. L., Johnston M., 1996. Two Zinc-Finger-Containing Repressors Are Responsible For Glucose Repression of *Suc2* Expression. *Molecular and Cellular Biology*, 16: 4790-4797.
- Madigan M. T. ve Martinko J. M., 2010. BROCK Mikroorganizmaların Biyolojisi. 5 (11): 121.
- Magasanik, B., Kaiser, C. A. 2002. Nitrogen Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 290: 1-18.
- 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.
- Mennella T. A., Klinkenberg L. G., Zitomer R. S, 2003. Recruitment of Tup1-Ssn6 by yeast hypoxic genes and chromatin-independent exclusion of TATA binding protein. *Eukaryot Cell*. 2 (6):1288-1303
- Nwaka S, Mechler B, Holzer H., 1996. Deletion of The *Ath1* Gene in *Saccharomyces cerevisiae* Prevents Growth on Trehalose. *Febs Letters*. 386: 235-238.
- Nwaka S., Holzer H., 1997. Molecular Biology of Trehalose and the Trehalases in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Sciencedirect*. 58: 197-237.
- Orlova M., Kanter E., Krakovich D., Kuchin S., 2006. Nitrogen Availability and Tor

- Regulate The Snf1 Protein Kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*. 11: 1831-1837.
- Panek A. D., 1991. Storage Carbohydrates in the Yeasts in: Rose H.A. and Harrison J.S. Eds. New York, Academic Pres. 655-677.
- Papamichos-Chronakis M., Petrakis T., Ktistaki E., Topalidou I., Tzamarias D, 2002. Cti6, a PHD domain protein, bridges the Cyc8-Tup1 corepressor and the SAGA coactivator to overcome repression at GAL1. *Mol Cell*. 9 (6):1297-305.
- Park S. H., Koh S. S., Chun J. H., Hwang H. J., Kang H. S., 1999. Nrg1 Is a Transcriptional Repressor for Glucose Repression of *STAI* Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. 19 (3): 2044-2050.
- Parrou J. L., Enjalbert B., Plourde L., Bauche A., Gonzales B., François J., 1999. Dynamic Responses of Reserve Carbohydrate Metabolism Under Carbon and Nitrogen Limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 15: 191-203.
- Parrou J. L., François J., 1997. A Simplified Procedure for an Rapid and Reliable Assay of Both Glycogen and Trehalose in Whole Yeast Cells. *Analytical Biochemistry*. 248: 186-188.
- Parrou J. L., Jules M., Beltran G., François J. M., 2005. Acid Trehalase in Yeast and Filamentous Fungi: Localization, Regulation and Physiological Function. *FEMS Yeast Research*. 5: 503-511.
- Parrou J. L., Teste M. A., François J., 1997. Effects of Various Types of Stress on the Metabolism of Reserve Carbonhydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: Genetic Evidence for a Stress-Induced Recycling of Glycogen and Trehalose. *Microbiology*. 143: 1891-1900.
- Plourde-Owobi L., Durder S., Goma G., François J., 2000. Trehalose Reserve in *Saccharomyces cerevisiae*: Phenomenon of Transport, Accumulation and Role in Cell Viability. *International Journal of Food Microbiology*. 55: 33-40.
- Proft M., Struhl K., 2002. Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol Cell*. 9 (6): 1307-17.

- Quain D. E., 1988. Studies on Yeast Physiology Impact on Fermentation Performance and Product Quality. *Journal of the Institute of Brewing*. 95: 315-323.
- Riberio M. J. S., Leao L. S. C., Morais P. B., Rosa C. A., Panek A. D., 1999. Trehalose Accumulation by Tropical Yeast Strains Submitted to Stress Conditions. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 75: 245-251.
- Rohde J. R., Cardenas M. E., 2003. The Tor Pathway Regulates Gene Expression by Linking Nutrient Sensing to Histone Acetylation. *Molecular and Cellular Biology*. 23: 629-635.
- Ronne H., 1995. Glucose repression in fungi. *Trends Genet*. 11: 12-17.
- Rose M. D., Winston F., Heiter P., 1990. *Methods in Yeast Genetics. A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press Books.
- Saccharomyces* Genome Database (n.d.). Retrieved August 7, 2017, from <http://www.yeastgenome.org/go/GO:0015771/overview>. (web adresi-1).
- Saccharomyces* Genome Database (n.d.). Retrieved August 7, 2017, from <https://www.yeastgenome.org/locus/S000002408#sequence>. (web adresi-2).
- Saccharomyces* Genome Database (n.d.). Retrieved August 7, 2017, from <http://yeastgfp.yeastgenome.org/>. (web adresi-3).
- Sano F., Asakawa N., Inoue Y., Sakurai M., 1999. A Dual Role for Intracellular Trehalose in the Resistance of Yeast Cells to Water Stress. *Cryobiology*. 39: 80-87.
- Santangelo G. M., 2006. Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Research*.70: 253-282.
- Schmitt A. P., McEntee K., 1996. Msn2p, a Zinc Finger DNA-Binding Protein, is the Transcriptional Activator of the Multistress Response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy Of Science, USA*. 93 (12): 5777-5782.
- Shashkova S., Welkenhuysen N., Hohmann S., 2015. Molecular Communication: Crosstalk Between the Snf1 and Other Signaling Pathways. *FEMS Yeast Research*. 15 (4): fov026.
- Singer M. A., Lindquist S., 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: The Yin

- and Yang of Trehalose. *Trends in Biotechnology*. 16: 460-468.
- Solak M.Ş, 2014. *Saccharomyces cerevisiae* Maya Türünde *NTH1* Geninin Genetik Düzenlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Türkiye.
- Stanbrough M., Rowen D. D. W., Magasanik B., 1995. Role of The Gata Factors Gln3p and Nil1p of *Saccharomyces cerevisiae* in the Expression of Nitrogen-Regulated Genes, *Proceedings of The National Academy Of Science, USA*. 92: 9450-9454.
- Ter Schure E. G., Van Riel N. A., Verrips C. T., 2000. The Role of Ammonia Metabolism in Nitrogen Catabolite Repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 67-83.
- Thevelein J. M., Hohmann S., 1995. Trehalose Synthase: Guard to The Gate of Glycolysis in Yeast. *Trends in Biochemical Sciences*. 20: 3-10.
- Thevelein, J. M., 1992. The Ras-Adenylate Cyclase Pathway and Cell Cycle Control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 62: 109-130.
- Türkel S., Turgut T., López M. C., Uemura H., Baker H. V., 2003. Mutations in *Gcr1* Affect *Suc2* Gene Expression in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics*, 268 (6):825-831.
- 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.
- Usaite R., Patil K. R., Grotkjaer T., Nielsen J., Regenbreg B., 2006. Global Transcriptional and Physiological Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to Ammonium, L-Alanin, or L-Glutamine limitation. *Applied Environmental Microbiology*. 72: 6194-6203.
- Vyas V. K., Berkey C. D., Miyao T., and Carlson M., 2005. Repressors Nrg1 and Nrg2 Regulate a Set of Stress-Responsive Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *American Society for Microbiology*. 4 (11): 1882-1891.
- Vyas V. K., Kuchin S., Carlson M., 2001. Interaction of the Repressors Nrg1 and Nrg2 with the Snf1 Protein Kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 158: 563-572.
- Wang Y., Pierce M., Schneper L., Güldal C. G., Zhang X., Tavazoie S., Broach J. R., 2004. Ras and Gpa2 Mediate One Branch of a Redundant Glucose Signaling Pathway in

- Yeast. Plos Biology. 2 (5): E128.
- Wolfe K. H., Lohan A. J., 1994. Sequence Around The Centromere of *Saccharomyces cerevisiae* Chromosome Ii: Similarity of Cen2 to Cen4. Yeast. 10: 41-46.
- www.ks.uiuc.edu/Research/vmd. (web adresi-4).
- Xu S., Falvey D. A., Brandriss M. C., 1995. Roles of *URE2* and *GLN3* in the Proline Utilization Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biology. 15 (4): 2321-2330.
- Zahringer H., Burgert B. M., Holzer H., Nwaka S., 1997. Neutral Trehalase Nth1p of *Saccharomyces cerevisiae* Encoded by the *NTH1* Gene Is a Multiple Stress Responsive Protein. FEBS Letters. 412: 615-620.
- Zahringer H., Thevelein J. M., Nwaka S., 2000. Induction of Neutral Trehalase Nth1 by Heat and Osmotic Stress Is Controlled by Stre Elements and Msn2/Msn4 Transcription Factors: Variations of PKA Effect During Stress and Growth. Molecular Microbiology. 35: 397-340.
- Zhou H., Winston F., 2001. *NRG1* is required for glucose repression of the *SUC2* and *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. BMC Genetics. 2: 5.



EK 1. Araştırmada Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması

1. YPD (Yeast Ekstrakt, Pepton, Dekstroz)

Bu besiyeri araştırmalarımızda kullanılan *S. cerevisiae* suşlarını üretmek için zengin besiyeri olarak kullanıldı. Bu üreme ortamını hazırlamak için 1 gram yeast ekstrakt, 2 gram pepton toplam 100 mililitre olacak şekilde distile suda çözdürüldü ve karışım 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Katı, zengin besiyeri olarak kullanılan YPD petrilerini hazırlamak için yukarıda belirtilen şekilde hazırlanan YPD sıvı besiyerine 2 mg/ml agar eklenerek 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilizasyonu yapıldı. Bu üreme ortamına karbonhidrat kaynağı olarak glukoz ilave edildi. Daha önceden hazırlanmış ve otoklavda sterilizasyonu yapılmış olan %50'lik stok Dekstroz çözeltisinden son konsantrasyon %2 olacak şekilde besiyerine eklendi.

2. TYE^{amp} (Trypton Yeast Extract)

E. coli transformantlarının seleksiyonu için bu besi ortamı hazırlandı. TYE^{amp} besiyeri için 2,4 gram Trypton Yeast Extract Agar ,100 ml saf su içerisinde çözdürüldü ve otoklavda sterilizasyonu yapıldı. Otoklavdan sonra içerisine filtre ile strelize edilmiş 33 mg/ml Ampisilin eklendi.

3. NB Besiyeri (Nutrient Broth)

Bu üreme ortamı *E. coli* transformantlarını üretmek için zengin besiyeri olarak kullanıldı. NB besiyerini hazırlamak için 2,5 gram Nutrient Broth 100 ml distile su içerisinde çözdürüldü ve 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Daha sonra filtreden geçilerek steril edilen Ampisilin (33 mg/ml) eklendi.

4. YNBD-HLM Besiyeri (Yeast Nitrogen Base)

Bu üreme ortamı *S. cerevisiae* transformantlarının üretilmesinde seçici besiyeri olarak kullanıldı. Bu besiyerinin hazırlanması için 0,16 gram Yeast Nitrogen Base, 0,5 gram Amonium Sulfate, 100 ml saf su içerisinde çözdürüldü ve otoklavda sterilizasyonu yapıldı. Otoklavdan sonra %1 stok olarak hazırlanan ve filtreden geçirilerek steril edilen aminoasitler (0,2 ml Histidine, 0,2 ml Methionine, 0,3 ml Leucin) eklendi. Karbonhidrat kaynağı olarak %50 stok Dekstroz'dan son konsantrasyon %2 olacak şekilde ilave edildi. YNBD-HLM katı besiyerini hazırlamak için yukardaki karışımın içine 2 gram agar eklendi.

5. YN Minimal Üreme Ortamı

Bu üreme ortamı *S. cerevisiae*'de azot stresini incelemek için kullanıldı. Besiyerini hazırlamak için 0,16 gram Yeast Nitrogen Base (Amonyum sülfatsız ve aminoasitsiz) 100 ml distile su içerisinde çözdürüldü ve 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Otoklavdan sonra %1 stok olarak hazırlanan ve filtreden geçirilerek steril edilen aminoasitler

(0,2 ml Histidine, 0,2 ml Methionine, 0,3 ml Leucin) eklendi. Azot kaynağı olarak son konsantrasyon %0,1 olacak şekilde filtre ile steril edilmiş glutamin ya da prolin eklendi. Karbonhidrat kaynağı olarak %50 stok Dekstroz'dan son konsantrasyon %2 olacak şekilde ilave edildi. YN minimal katı besiyeri hazırlamak için yukardaki karışımın içine 2 gram agar eklendi.



EK 2. Araştırmada Kullanılan özeltilerin Hazırlanması.

1. Lityum Asetat-TE

Bu kimyasal maya hücrelerinin transformasyonunda kullanmak için hazırlandı. 3.5 ml 250 mM Lityum asetat; 10 mM Tris pH:8.0, 1 mM EDTA pH:8.0 ile çözülerek hazırlandı.

2. Breaking Buffer

Bu özelti üreme aşamalarından sonra toplanan *S. cerevisiae* transformantlarını süspanse etmek için kullanıldı.

100 mM tris HCl pH:8.0

1 mM DL-Dithiothreitol

%20 (V/V) Gliserol

4mM Fenil Metil Sülfonil Fulorid

3. Z-Buffer

Bu tampon özelti *S. cerevisiae* transformantlarında beta-galaktozidaz aktivitesini belirlemek için kullanıldı.

60mM Na₂HPO₄.7H₂O

40 ml NaH₂PO₄.H₂O

10mM KCl

1mM MgSO₄.7H₂O

50mM 2-Merkapto Etanol

a) Lowry A özeltisi

% 2' lik Na₂CO₃ (0.1N NaOH' da çözünmüş)

b) Lowry B1 özeltisi

% 0.5' lik CuSO₄ (%1'lik NaK-tartarat'ta çözünmüş)

c) Lowry B2 özeltisi

% 1,56 CuSO₄.5H₂O

d) C Buffer

9,8ml A-Buffer (2% Na₂CO₃; 0,4% NaOH) + 100µl B1-Buffer (1,56% CuSO₄.5H₂O)

+ 100 µl B2-Buffer (2% KNaC₄H₄O₆)

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Gamze DOĞAN

Doğum Yeri : İstanbul

Doğum Tarihi : 23/04/1993

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi / Fen Edebiyat Bölümü / 2015.

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi / Fen Bilimleri Bilimleri Enstitüsü / 2017

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

- a) Yayınlar -SCI -Diğer
- b) Bildiriler -Uluslararası -Ulusal

Doğan, G., Genç, T., 2017. *Saccharomyces cerevisiae* Maya Türünde *Nrg1* Transkripsiyon Faktörünün *NTH1* Promotoruna *In Silico* Bağlanma Modeli. İVEK Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi 26-29 Nisan, İstanbul, Türkiye.

- c) Katıldığı Projeler

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı, *Saccharomyces cerevisiae* Maya Türünde *Nrg1* proteininin *NTH1* Gen Ekspresyonuna Etkisinin Belirlenmesi, Proje Numarası: FYL-2016-829, 2016-2017 (Araştırmacı).

TUBİTAK 2209/A Üniversite Öğrencileri Yurt İçi/Yurt Dışı Araştırma Projeleri Destekleme Programı, Kırmızı Pancar Kök Suyunun Hela Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi (Yürütücü)

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl :

İLETİŞİM

E-posta Adresi : gamzee_dogaan@hotmail.com

