



T.C.

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***SACCHAROMYCES CEREVISIAE TOR1* MUTANTLARINDA
HÜCRE DÖNGÜSÜNÜN TRANSKRİPTOMİK ANALİZİ**

DOKTORA TEZİ

İLKNUR NEZAHAT ÇILDIR

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi TÜLAY TURGUT GENÇ

ÇANAKKALE – 2023



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***SACCHAROMYCES CEREVISIAE TOR1* MUTANTLARINDA HÜCRE
DÖNGÜSÜNÜN TRANSKRİPTOMİK ANALİZİ**

DOKTORA TEZİ

İLKNUR NEZAHAT ÇILDIR

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi TÜLAY TURGUT GENÇ

ÇANAKKALE – 2023

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

İlknur Nezahat ÇILDIR

31/01/2023

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleŐtirilmesinde, lisansüstü eğitim hayatı sũresince beni her daim destekleyen, yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen, çalışma sũresince tũm zorlukları benimle gũđũsleyen saygı değer danışman hocam Dr. Őđr. Őyesi Tũlay TURGUT GENÇ'e, laboratuvar çalışmalarında benden yardımlarını esirgemeyen benimle birlikte gece gũndũz çalışan değerli arkadaŐlarım Melik GũNAY ve M. Őerafeddin SOLAK'a, yaŐamım boyunca maddi ve manevi olarak bana destek olan değerli abim İlker ÇILDIR'a sonsuz teŐekkũrlerimi sunarım.

İlknur Nezahat ÇILDIR
anakkale, Ocak 2023

ÖZET

SACCHAROMYCES CEREVISIAE TOR1 MUTANTLARINDA HÜCRE DÖNGÜSÜNÜN TRANSKRİPTOMİK ANALİZİ

İlknur Nezahat ÇILDIR

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tülay TURGUT GENÇ

31/01/2023, 106

Saccharomyces cerevisiae maya hücrelerinde olumsuz çevre koşullarına karşı genetik ve metabolik cevap oluşturmada farklı algılama ve sinyal sistemleri görev almaktadır. Bu sinyal sistemlerinden birisi olan TOR (Rapamisin Hedefi) sinyal yolağı TORC1 ve TORC2 olmak üzere iki farklı TOR kompleksi içermektedir. Ser/Thr-protein kinaz olan Tor1 ve Tor2 proteini TORC1 kompleksinin yapısında bulunurken TORC2 kompleksinde yalnızca Tor2p bulunur. Rapamisin, besin açlığı ve farklı stres koşulları, TORC1 kompleksinin aktivitesini inhibe eder. TORC1 kompleksinin inhibisyonu hücre büyümesini durdurarak hücre döngüsünün erken G1 safhasında kalmasına ve hücrelerin G0 evresine geçmesine neden olur. Tor1 proteininin yokluğunda hücre döngüsünün ilerlemesinde ve regülasyonunda görev alan proteinleri kodlayan genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi TORC1 kompleksinin hücre döngüsü üzerindeki etkisini belirlemek için oldukça önemlidir. Bu nedenle *Δtor1* ve yaban tip maya hücreleri normal üreme koşullarında çoğaltıldı ve gen ekspresyon seviyeleri Yeni Nesil Dizileme Tekniği ile belirlendi. Hücre döngüsünün ilerlemesinde ve düzenlenmesinde yer alan ve diferansiyel gen ekspresyonu gösteren genler belirlenerek hücre döngüsünün evrelerine göre gruplandırıldı. Hücre döngüsünün ilerlemesinde ve düzenlenmesinde görevli 2133 genin anlamlı ekspresyon değişimi ($FD \geq 2$) gösterdiği belirlendi. TOR1 geninin yokluğunda, 887 genin ekspresyonunun baskılandığı 1246 genin ise aktive olduğu bulundu. G1 safhasında görevli 503 genin, S safhasında görevli 297 genin, G2 safhasında görevli 635 genin ve M safhasında görevli 700 genin ekspresyonunun değişim gösterdiği, bu genlerden bazılarının birden fazla

hücre döngüsü safhasında görev aldığı belirlendi. *HXT4*, *HXT6*, *HXT7*, *HXK1*, *RCK1*, *HSP26*, *DDR2*, *TMA10* ve *YNL194C* genlerinin ekspresyonunun 50 kat üzerinde arttığı gözlemlendi. İşlevi bilinmeyen *YMR206W*, *YIL136W*, *YDR070C* ve *YGR067C* genlerinin ekspresyonlarının TOR sinyal sistemi ile kontrol edildiği belirlendi. KEGG yolak analizi ve Gen Ontoloji analizi sonuçlarına göre *TOR1* geninin yokluğunda hücre döngüsünün ilerlemesinde ve düzenlenmesinde görevli ekspresyonu değişen genlerin ağırlıklı olarak metabolik yollarda ve ribozom biyogenezi ile ilgili yollarda görevli oldukları gözlemlendi. Genel olarak metabolik yollarda görevli genlerin ekspresyonunun arttığı ribozom biyogenezinde görevli genlerin ekspresyonunun ise baskılandığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Hücre döngüsü, *TOR1*, Transkriptom, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF THE CELL CYCLE IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE TOR1* MUTANTS

İlknur Nezahat ÇILDIR

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Doctoral Dissertation in Biology Science

Advisor: Assist. Prof. Dr. Tülay TURGUT GENÇ

31/01/2023, 106

In *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells, different sensing and signaling systems are involved in genetic and metabolic responses to adverse environmental conditions. One of these signaling systems, TOR (Target of Rapamycin), contains two TOR complexes, TORC1 and TORC2. Both Tor1 and Tor2 proteins, Ser/Thr-protein kinases, are found in the structure of the TORC1 complex, while the TORC2 complex contains only Tor2p. Rapamycin, nutrient starvation and different stress conditions inhibit the activity of the TORC1 complex. Inhibition of the TORC1 complex prevents cell growth, causing the cell cycle to arrest in the early G1 phase and transition to the G0 phase. Determining the expression levels of genes encoding proteins involved in cell cycle progression and regulation in the absence of the Tor1 protein is essential to determine the effect of the TORC1 complex on the cell cycle. For this reason, *Δtor1* and wild-type yeast cells were grown under normal growth conditions, and their gene expression levels were determined by Next Generation Sequencing Technique. The genes involved in the progression and regulation of the cell cycle and showing differential gene expressions were determined and grouped according to the cell cycle phases. It was determined that 2133 genes involved in the progression and regulation of the cell cycle showed a significant differential expression ($FD \geq 2$). In the absence of the *TOR1* gene, the expression of 887 genes was found to be down-regulated and 1246 genes were up-regulated. The expression of 503 genes involved in the G1 phase, 297 genes involved in the S phase, 635 genes involved in the G2 phase and 700 genes involved in the M phase were changed significantly, and some of these genes were involved in more than one cell cycle phase. It was observed that the expressions of *HXT4*, *HXT6*, *HXT7*, *HXK1*,

RCK1, *HSP26*, *DDR2*, *TMA10* and *YNL194C* genes were up-regulated more than 50-fold. It was determined that the expression of *YMR206W*, *YIL136W*, *YDR070C* and *YGR067C* genes of unknown function were controlled via the TOR signaling system. According to the KEGG pathway and Gene Ontology analysis, in the absence of the *TOR1* gene, most of the differentially expressed genes were predominantly involved in the metabolic pathways and ribosome biogenesis. In general, the expressions of genes involved in metabolic pathways were up-regulated, while the expressions of genes involved in ribosome biogenesis were down-regulated.

Keywords: Cell cycle, *TOR1*, Transcriptome, *Saccharomyces cerevisiae*



İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
JÜRİ ONAY SAYFASI.....	i
ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
BİRİNCİ BÖLÜM	
GİRİŞ	
İKİNCİ BÖLÜM	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
2.2. TOR Sinyal Sistemi.....	6
2.2.1. TORC1 ve TORC2 Protein Kompleksleri.....	6
2.2.2. Tor 1 ve Tor2 Proteinlerinin Yapısı ve Fonksiyonu.....	7
2.3. Hücre Döngüsü ve Regülasyonu	11
2.3.1. Hücre Döngüsü.....	11
2.3.2. Hücre döngüsünün regülasyonu.....	14
2.4. Tor Sinyal Sisteminin Hücre Döngüsüne Etkisi	18
2.4.1. Sic1p stabilizasyonu	20
2.4.2. Whi5p inaktivasyonu	21
2.5. Transkriptom Analizi.....	23

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM MATERYAL YÖNTEM

3.1. <i>S. cerevisiae</i> Maya Suşlarının Özellikleri.....	26
3.2. <i>S. cerevisiae</i> Maya Suşlarının Üreme Koşulları ve Örnekleme.....	26
3.3. Total RNA İzolasyonu.....	27
3.4. RNA Kalitesinin Kalitatif ve Kantitatif Kontrolü.....	28
3.5. poly(A)Yöntemi ile mRNA Eldesi.....	29
3.5.1. RNA'nın Fragmente Edilmesi ve Temizlenmesi.....	30
3.5.2. Kütüphane Oluşturulması.....	31
3.5.3. Emülsiyon PZR (emPZR) ile Klonal Çoğaltım ve ürünün zenginleştirilmesi.....	33
3.5.4. Dizileme.....	34
3.5.5. Yeni Nesil RNA Dizileme Verisi Üretimi ve İşlenmesi.....	37
3.5.6. Biyoinformatik Analizler ve Araçlar.....	38
Kalite Kontrol (Quality Control) ve Temizleme (Trimming)	38
Haritalama (Mapping)	39
Transkript Sayılarının Belirlenmesi.....	39
Filtreleme ve Normalizasyon.....	39
3.5.7. Analiz Yöntemleri.....	40
Kümeleme.....	40
Diferansiyel Ekspresyon Analizi.....	40
Gen Ontoloji Analizi.....	41
Yolak Analizi.....	41

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Total RNA ve mRNA Örneklerinin Konsantrasyonu ve Kalitesi.....	41
4.1.1. Total RNA Örneklerinin Konsantrasyonu ve Kalitesi	42
4.1.2. mRNA Konsantrasyonu ve Kalitesi	46
4.1.3. Dizileme Kalitesi Bulguları	49
4.2. Genel Transkriptom Analizi.....	50
4.3. Hücre Döngüsünün Transkriptomik Analizi.....	53
4.4. Hücre Döngüsünün Fonksiyonel Analizi.....	70

4.4.1. Hücre Döngüsünün GO Analizi.....	70	
4.4.2. Hücre Döngüsünün KEGG Analizi.....	77	
BEŞİNCİ BÖLÜM		
SONUÇ ve ÖNERİLER		84
KAYNAKÇA	90	
ÖZGEÇMİŞ	I	



SİMGELER VE KISALTMALAR

bç	Baz çifti
B	Beta
Dak	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
G	Gravity (santrifuj birimi)
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
M	Molar
Mb	Megabaz
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
OD	Optik Densite
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
TE	Tris EDTA
URA	Urasil
UV	Ultraviyole
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikron
α	Alfa
°C	Santigrat derece
Δ	Delta (delesyon)
%	Yüzde

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	<i>S. cerevisiae</i> genom bilgisi	5
Tablo 2	Cdc28 proteininin aktivitesini kontrol eden düzenleyici proteinler	17
Tablo 3	FastQC program algoritmalarında yer alan puan değerleri	38
Tablo 4	İzole edilen total RNA örneklerinin miktarı ve kalitesi	43
Tablo 5	Fragmente edilmiş poly(A) RNA örneklerinin konsantrasyon ve cDNA molarite değerleri	46
Tablo 6	Dizileme sonrası elde edilen kütüphanelere ait okuma değerleri	50
Tablo 7	Hücre döngüsünün safhalarında görevli olan ve 10-20 kat oranında değişim gösteren genler	62
Tablo 8	Hücre döngüsünün safhalarında görevli olan ve 20-50 kat oranında değişim gösteren genler	62
Tablo 9	Hücre döngüsü safhaları ile ilişkili bulunan ve 20 kat ve üzeri kat değişim gösteren genlerin fonksiyonları ve değişim miktarları	63
Tablo 10	Hücre döngüsü safhaları ile ilişkili 50 kat ve üzeri değişim gösteren genler	69
Tablo 11	Hücre döngüsü safhaları ile ilişkili 50 kat ve üzeri değişim gösteren genlerin fonksiyonları ve değişim miktarları	69
Tablo 12	Ribozom metabolik yolağında ekspresyon değişimi gösteren genler	79
Tablo 13	Ökaryotlarda ribozom biyogenezi metabolik yolağında ekspresyon değişimi gösteren genler	80
Tablo 14	Sekonder metabolitlerin biyosentezi metabolik yolağında ekspresyon değişimi gösteren genler	81
Tablo 15	Metabolik Yolaklarda ekspresyon değişimi gösteren genler	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	<i>S. cerevisiae</i> yaşam döngüsü	6
Şekil 2	TORC1 ve TORC2 kompleksi	7
Şekil 3	TOR komplekslerinin alt birimlerinin Tor1 ve Tor2 proteinlerine bağlanması	8
Şekil 4	Tor1 ve Tor2 protein yapısı	9
Şekil 5	Rapamisin (sirolimus) kimyasal yapısı	10
Şekil 6	<i>S. cerevisiae</i> hücre döngüsü	12
Şekil 7	Mitotik hücre döngüsü ve G0 çeşitleri	13
Şekil 8	Durağan ve proliferatif maya hücreleri	14
Şekil 9	Hücre döngüsünün kontrol noktaları	15
Şekil 10	TOR bağımlı Rim15 kinaz aktivasyonu	20
Şekil 11	Sic1 protein stabilizasyonu	21
Şekil 12	Whi5p inaktivasyonu	23
Şekil 13a	Agilent 2100 Bioanalyzer cihazı	29
Şekil 13b	RNA 6000 Nano Lab Chip	29
Şekil 14	Ion One Touch System; OT2 cihazı	33
Şekil 15a	Ion One Touch System - Enrichment System	34
Şekil 15b	8-well strip gerçek görünümü	34
Şekil 16a	Ion S5 XL dizileme cihazı	34
Şekil 16b	Ion S5 XL dizileme cihazı reaktiflerin yerleşimi	34
Şekil 17a	Ion 540 Chip şekilsel görünümü	36
Şekil 17b	Ion 540 Chip görüntüsü	36
Şekil 18	Çip yükleme aşamaları	39
Şekil 19	İzole edilen total RNA örneklerinin kalitatif kontrolü	43

Şekil 20	wt-1 RNA örneklerinin RIN değerini gösteren elektroferogram görüntüsü	44
Şekil 21	wt-2 RNA örneklerinin RIN değerini gösteren elektroferogram görüntüsü	44
Şekil 22	<i>Δtor1-1</i> RNA örneklerinin RIN değerini gösteren elektroferogram görüntüsü	45
Şekil 23	<i>Δtor1-2</i> RNA örneklerinin RIN değerini gösteren elektroferogram görüntüsü	45
Şekil 24	wt-1 cDNA molarite değerlerini gösteren elektroferogram görüntüsü (nmol/L)	47
Şekil 25	wt-2 cDNA molarite değerlerini gösteren elektroferogram görüntüsü (nmol/L)	47
Şekil 26	<i>Δtor1-1</i> cDNA molarite değerlerini gösteren elektroferogram görüntüsü (nmol/L)	48
Şekil 27	<i>Δtor1-2</i> cDNA molarite değerlerini gösteren elektroferogram görüntüsü (nmol/L)	48
Şekil 28	Dizileme işleminin kalite özeti	50
Şekil 29	Yaban tip ve mutant maya hücreleri arasında gen ekspresyonu en fazla farklılık gösteren 500 gen için oluşturulan ısı grafiği.	52
Şekil 30	Yaban tip ve mutant maya hücreleri arasında yapılan karşılaştırma sonrasında belirlenen gen ekspresyon seviyelerine göre oluşturulan volcano plot dağılım grafiği	53
Şekil 31	Hücre döngüsü safhaları ile ilişkili bulunan ancak okuma alınamayan genlerin grafiği	55
Şekil 32	1-2 kat değişim gösteren genlerin hücre döngüsü safhalarına göre dağılımı ($1 \leq FD < 2$)	57
Şekil 33	2-10 kat değişim gösteren genlerin hücre döngüsü safhalarına göre dağılımı ($2 \leq FD < 10$)	59
Şekil 34	10-50 kat değişim gösteren genlerin hücre döngüsü safhalarına göre dağılımı ($10 \leq FD < 50$)	61
Şekil 35	50 kat ve üzeri değişim gösteren genlerin hücre döngüsü safhalarına göre dağılımı	68
Şekil 36	Hücre döngüsünde görevli ($FD \geq 2$) genlerin GO analizi sonrası Biyolojik Süreçlere göre dağılımı	72
Şekil 37	Hücre döngüsünde görevli ($FD \geq 2$) genlerin GO analizi sonrası Moleküler Fonksiyonlarına göre dağılımı	74

Şekil 38	Hücre döngüsünde görevli ($FD \geq 2$) genlerin GO analizi sonrası Hücresel Bileşenlerine göre dağılımı	76
Şekil 39	Hücre döngüsünde görevli 2 kat ve üzeri değişim gösteren genlerin KEGG yolak analizi	78



BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Saccharomyces cerevisiae tek hücreli ökaryotik mikroorganizma olup tüm genom dizilemesi yapılan ilk ökaryotik mikroorganizmadır. *S. cerevisiae* genomu 16 kromozom içermekte olup ve yaklaşık 6016 potansiyel protein kodlayan gen içermektedir (Feldmann vd., 2012; Goffeau vd.,1996; Engel vd., 2014) *S. cerevisiae* maya hücrelerinin içerdiği genler, gen regülasyonu, metabolik ve sinyal yolları birçok canlı ile benzerlik gösterdiğinden ökaryotik canlılarda hücresel ve moleküler mekanizmaların anlaşılmasında model organizma olarak kullanılmaktadır.

S. cerevisiae maya hücrelerinin yaşlanma mekanizması ile ilişkili yollar ve ilgili genler yüksek ökaryotlar ile benzerlik gösterdiğinden *S. cerevisiae* maya hücreleri yaşlanma mekanizmalarının anlaşılmasında ve yaşlanmayı önleyen-geciktiren ilaçların geliştirilmesinde de kullanılmaktadır. TOR (Target of rapamisin) sinyal yolağının yaşlanma ile ilişkili olduğu bilinmektedir. *S. cerevisiae* maya hücrelerinde TORC1 ve TORC2 olmak üzere iki farklı TOR kompleksi bulunmaktadır. TORC1 kompleksi Tco89p, Kog1p ve Lst8p alt ünitelerine ilave olarak Tor1 veya Tor2 proteinlerini içerirken TORC2 kompleksi Bit61p, Lst8p, Avo1p, Avo2p ve Avo3p alt ünitelerine ilave olarak yalnızca Tor2 proteinini içerir (Wullschleger vd., 2006). TORC1 kompleksi rapamisin ile inhibe edilirken TORC2 kompleksi rapamisine duyarlıdır. Protein kinaz aktivitesine sahip Tor1 ve Tor2 proteinleri *TOR1* ve *TOR2* genleri tarafından kodlanır. Tor1 ve Tor2 proteinleri hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve devamlığında görevlidir (Helliwell vd., 1994; Inoki vd., 2005). *S. cerevisiae* maya hücrelerinde TOR yolağındaki genlerde oluşan mutasyonlar ve maya hücrelerinin rapamisine maruz bırakılması kronolojik hayat uzunluğunun (Chronological life-span, CLS) uzamasına neden olmaktadır (Kaeberlein vd., 2005; Powers vd., 2006; Medvedik vd., 2007). TOR sinyal sistemi kuvvetli azot kaynağında (glutamin ve amonyum gibi) aktif iken zayıf azot kaynağında (prolin veya üre gibi), rapamisin veya kafein varlığında baskılanır. Azot açlık stresine maruz kalan maya hücrelerinde ribozom biyogenezinin ve translasyon sürecinin yavaşlaması G1 evresinin uzamasına ve büyümenin yavaşlamasına neden olur (Brauer vd., 2008; Klosinska vd., 2011). TOR sinyal yolağının inhibisyonu *SIR2* (Silent Information Regulator 2) geni tarafından kodlanan Sir2 proteininin aktivitesinin

artmasına ve rDNA'nın stabil halde tutulmasına neden olur. Böylece Sir2p aktivasyonu ve rDNA stabilizasyonu kronolojik hayat uzunluğunun TOR bağımlı artmasını sağlar (Medvedik vd., 2007; Santos vd., 2016). Ayrıca TOR sinyal sistemi cAMP/PKA sinyal sistemi ile birlikte çalışır ve genel stres transkripsiyon faktörleri olan Msn2/4 proteinlerinin hücresel lokalizasyonunu kontrol ederek kronolojik hayat uzunluğunu etkiler (Fabrizio vd., 2004; Medvedik vd., 2007). Msn2/4 proteinleri farklı stres koşullarında nükleusa geçerek stres-cevap mekanizmasında görevli genlerin promotor bölgesinde bulunan özel STRE dizilerine bağlanarak ilgili genlerin transkripsiyonunu aktive eder

S. cerevisiae maya hücreleri eşeysiz olarak tomurcuklanarak çoğalabildiği gibi eşeyli olarak ta çoğalabilmektedir. Haploid formu mitoz bölünmeyle çoğalırken çevre koşulları uygun olmadığında diploid yaşam döngüsüne girerek mayoz bölünme geçirerek spor oluşturur. Bu nedenle *S. cerevisiae* maya türünde haploid ve diploid olmak üzere iki farklı yaşam döngüsü bulunmaktadır. Genel olarak hücre döngüsü, hücrenin büyümesi ve iki yeni yavru hücreye bölünmesi (her biri süreci tekrarlamak için gerekli bilgi ve mekanizmaya sahip) olaylarının birbirini izlemesi olarak tanımlanır. Diğer eukaryotik hücreler gibi *S. cerevisiae* hücresinde de hücre döngüsü dört safhadan (G1, S, G2 ve M) oluşmaktadır. Tomurcuklanan (mitoz geçiren) maya hücrelerinde hücre döngüsü normal üreme koşullarında yaklaşık 90 dakika sürer. Yeni oluşan tomurcuk ana hücre yüzeyinde herhangi bir noktada oluşabilir ancak aynı bölgeden bir daha tomurcuklanma gerçekleşmez. Hücreler, çevre koşulları uygun ise belirli bir büyüme aşamasına ulaştığında tekrar ölmeye giderken, çevre koşulları uygun olmadığında sessizlik evresine (G0) girerek hücre döngüsünde durabilir. Hücre döngüsünün ilerlemesi çok sayıda Cdk-siklin komplekslerinin düzenli bir şekilde ve kontrollü aktivitesi ile gerçekleştirilir. Bu komplekslerin katalitik birimi siklin-bağımlı kinaz (Cyclin-dependent kinase, Cdk) olup farklı siklin proteinlerinin bağlanması diğerlerinin inhibisyonu ile hücre döngüsünün ilerlemesini sağlar. *S. cerevisiae* maya hücrelerinde bir tane Cdc28 olarak adlandırılan siklin-bağımlı kinaz ve bu Cdc28 kinaza bağlanan dokuz farklı siklin proteini (Cln1-3, Clb1-6) bulunur. Cdc28 kendisine bağlanan siklin ortağına göre hücre döngüsünün ilerlemesini veya durmasını sağlar (Chen vd., 2000; Bloom ve Cross, 2007; Morgan, 2007)

Besin kıtlığı (karbona ilave olarak fosfat ve azotun azlığı) hücre döngüsünün ilerlemesini kontrol ederek, hücre döngüsünün G1 fazında durmasına ve G0 durgun evreye girmesine neden olur (Pedruzzi vd., 2003; Wanke vd., 2005). Benzer şekilde TORC1 kompleksinin inhibisyonu da hücre döngüsünün G1'de durmasına ve G0 evresine girmesine neden olmaktadır (Barbet vd., 1996). Bu nedenle TORC1 kompleksinin yapısında bulunan ve kinaz aktivitesine sahip Tor1p yokluğunda hücre döngüsünün ilerlemesinde ve regülasyonunda görev alan genlerin ekspresyon seviyeleri belirlenmesi önemlidir. Transkriptom, belirli bir gelişim evresinde, belirli bir fizyolojik koşul sırasında ve/veya sonrasında hücre tarafından verilen genetik cevap ile oluşturulan transkriptlerin toplamıdır. Hücre döngüsünün ilerlemesinde ve kontrolünde görev alan genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için *TORI* gen mutasyonu taşıyan ve gen mutasyonu taşımayan yaban tip maya hücrelerinin normal üreme koşullarında transkriptom analizi gerçekleştirildi.

İKİNCİ BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae tek hücreli ökaryotik canlı olup, laboratuvar koşullarında hızlı ve kolaylıkla gelişebilmesi nedeniyle ökaryotik hücre fonksiyonunu ve genetik düzenlenmesini anlamak için model organizma olarak kullanılmaktadır. *S. cerevisiae*'nin insanlar dâhil olmak üzere birçok canlıyla benzer sekans ve fonksiyona sahip protein içermesi kanser araştırmalarının çoğunda hücre döngüsünün kontrolünde, karmaşık organizmalarda önemli yolların genetik olarak araştırılmasına da olanak sağlamaktadır. Mayada homoloğu bulunan kolon kanserine neden olan insan genleri (mayadaki homoloğu *MSH2* ve *MLH1*), nörofibromatozis tip 1 (mayada *IRA2*), ataksi telenjektazi (mayada *TELI*) ve Werner sendromu (mayada *SGSI*) bunlardan sadece birkaçıdır (Botstein vd., 1997).

S. cerevisiae genomu 12 kbç büyüklüğünde olup, 16 kromozom içermektedir. *S. cerevisiae* hücrelerinde nükleer genomda 6418 gen ve mitokondriyel genomda 46 gen olmak üzere toplam 6464 gen bulunmaktadır. Bu genlerden 18 tanesi pseudogendir. Kalan genlerden 6016 tanesi fonksiyonel proteinleri ve 430 tanesi ise farklı RNA moleküllerini (14 rRNA, 299 tRNA ve 117 diğer RNA molekülleri) kodlamaktadır (Engel vd., 2014; Engel vd., 2022). (Tablo 1). Maya genlerinin büyük çoğunluğu açık kromatin durumundadır, yani ya aktif olarak kopyalanırlar ya da hızla indüklenebilirler (Grunstein ve Gasser, 2013).

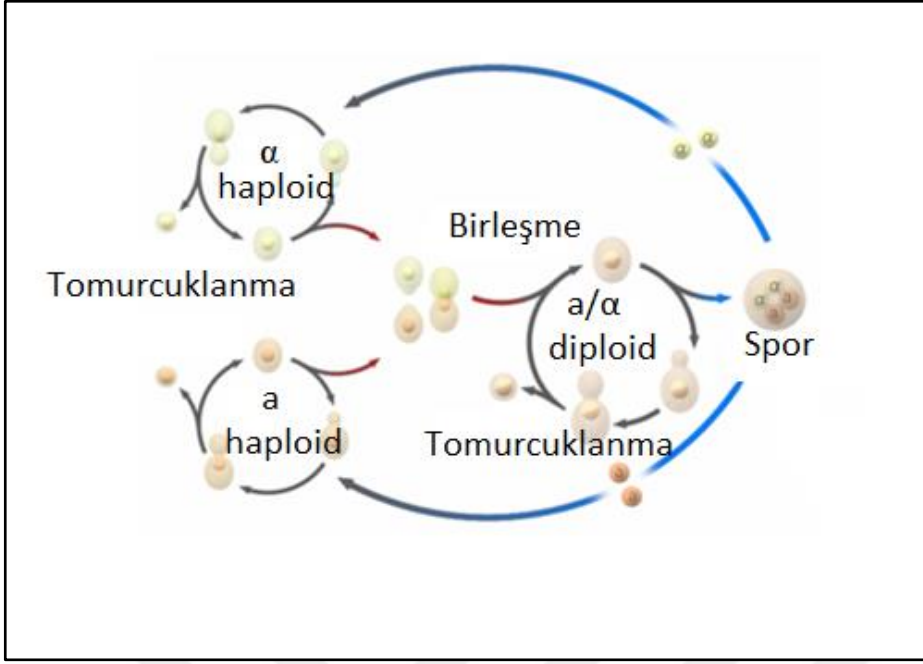
S. cerevisiae tek hücreli bir organizma olmasına rağmen, yaşam döngüsünde ayırt edici ve önemli rol oynayan 3 hücre tipinde (a, α ve a/ α) de bulunmaktadır. Yaşam döngüsü haploit ve diploit olmak üzere iki farklı evreden oluşur ve her evrede mitoz bölünme ile çoğalmaktadır. Ortam şartlarının verimsiz olduğu durumlarda diploit evreden mayoz bölünme ile spor oluşturmaktadırlar. Haploit kromozom içeren maya hücreleri a veya α formunda bulunmakta olup bunlardan 'a' ve ' α ' feromonları feromonları salgılanmaktadır. Feromon salgılayan haploit hücreler birleşerek diploit hücreyi oluşturken, besin açlığı gibi stres oluşturan durumlarda mayoz bölünme ile spor oluşturmaktadırlar (Şekil 1) (Grunstein ve Gasser, 2013).

Tablo 1

S. cerevisiae genom bilgisi

Kromozom Numarası	Uzunluk (Mb)	Protein	rRNA	tRNA	Diğer RNA	Gen	Pseudogen
I	0,23	94		4	2	101	1
II	0,81	416		13	6	435	-
III	0,32	168		10	4	184	2
IV	1,53	766		28	4	799	1
V	0,58	288		20	9	318	1
VI	0,27	128		10	4	143	1
VII	1,09	540		36	10	586	-
VIII	0,56	292		11	5	308	-
IX	0,44	213		10	3	232	6
X	0,75	365		24	6	395	-
XI	0,67	318	-	16	5	339	-
XII	1,08	520	12	21	18	573	2
XIII	0,92	471	-	21	16	508	-
XIV	0,78	398	-	14	6	418	-
XV	1,09	546	-	20	11	579	2
XVI	0,95	474	-	17	7	500	2
Mitokondri	0,09	19	2	24	1	46	-
Toplam	12,16	6016	14	299	117	6464	18

NCBI Genome Database, 2022.



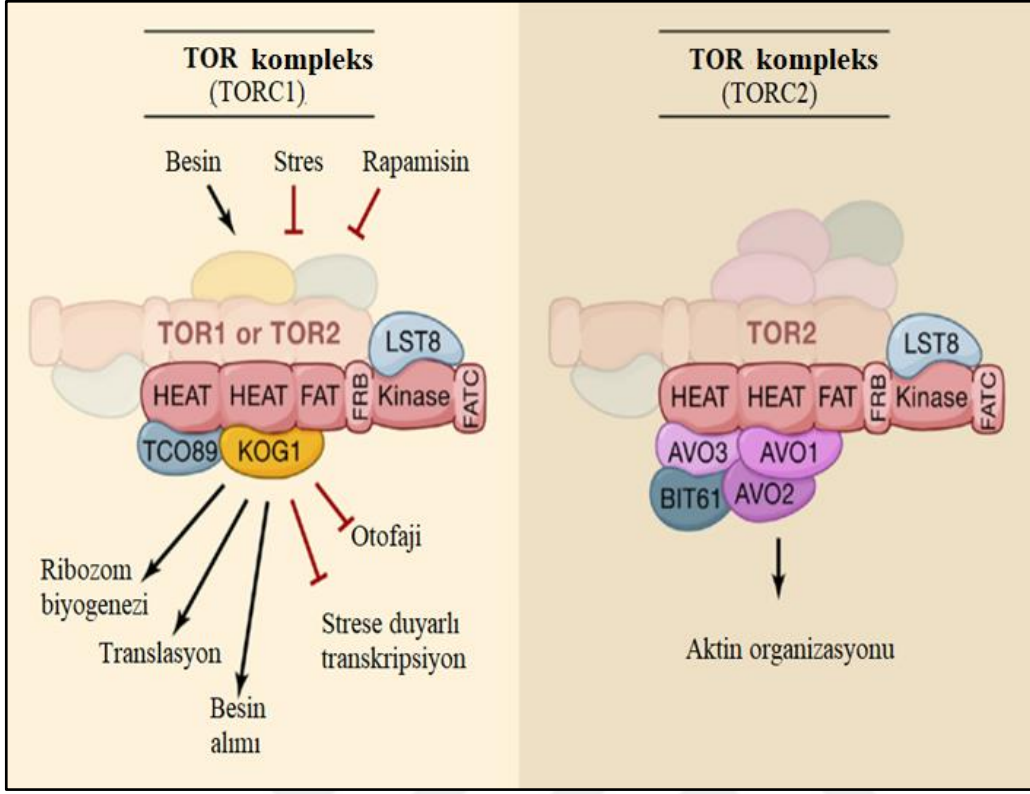
Şekil 1. *S. cerevisiae* yaşam döngüsü

Cherry vd., 2012'den modifiye edilmiştir.

2.2. TOR Sinyal Sistemi

2.2.1. TORC1 ve TORC2 Protein Kompleksleri

S. cerevisiae maya hücrelerinde yüksek oranda yapısal ve işlevsel olarak ilişkili iki TOR protein kompleksi bulunur (De Virgilio ve Loewith, 2006a,2006b). TORC1 kompleksi Lst8, Kog1, Tco89 ve Tor1 veya Tor2 proteinlerinden oluşurken TORC2 kompleksi, Lst8, Avo1, Avo2, Avo3, Bit2, Bit61 ve Tor2 proteinlerinden oluşur (Loewith vd., 2002; Chen ve Kaiser, 2003; Wedaman vd., 2003; Reinke vd., 2004). TORC2 kompleksinde Tor1 proteini bulunmazken Lst8 proteini her iki komplekste de bulunan bir alt ünedir (Şekil 2).



Şekil 2. TORC1 ve TORC2 kompleksi

Wullschleger vd., 2006

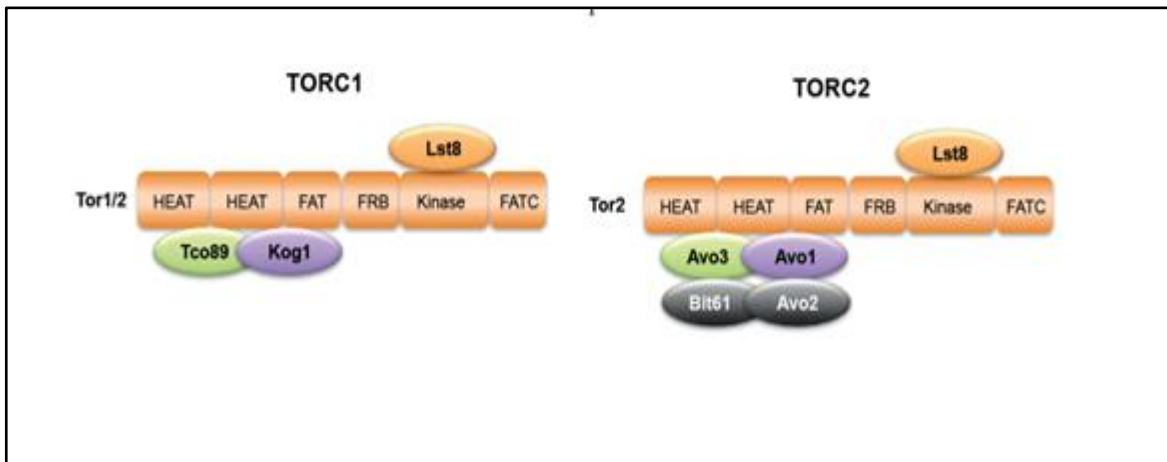
TORC1 kompleksi TOR-TOR dimerinden TORC2 kompleksi ise TOR2-TOR2 dimerinden oluşan multimerik protein kompleksleridir (Wullschleger vd., 2005). TORC1 kompleksi transkripsiyon, translasyon, ribozom sentezi, besin taşınması ve otofaji gibi hücre proseslerinde görev alırken TORC2 kompleksi, aktin organizasyonu, endositoz ve lipid biyosentezi gibi proseslerde görev almaktadır. (Aronova vd., 2008; De Virgilio ve Loewith, 2006a). TOR komplekslerinin bileşenleri ve hücre büyümesindeki anahtar rolleri, mayadan insana kadar korunmuştur. Özellikle TORC1 kompleksinin hücre büyümesini ve yaşlanmayı kontrol eden görevi tüm ökaryotik canlılarda benzerdir. (Loewith ve Hall, 2011).

2.2.2. Tor 1 ve Tor2 Proteinlerinin Yapısı ve Fonksiyonu

S. cerevisiae maya hücrelerinde Tor1 proteini TORC1 kompleksinin temel kinaz alt birimi iken Tor2 proteini küçük bir oranda bulunur. TORC2 kompleksi ise sadece Tor2

proteinini içermektedir (Loewith vd., 2002). TOR proteinleri 2500 aminoasit içeren 289 kDa büyüklüğünde korunmuş bir Ser/Thr kinaz olup fosfoinositid kinaz bağımlı kinaz (Phosphoinositid kinase related kinase, PIKK) ailesinin üyesidir (Tibbetts ve Abraham, 2000; De Virgilio ve Loewith, 2006a). *S. cerevisiae*, bir yerine iki TOR genine (*TOR1* ve *TOR2*) sahip olmasıyla diğer ökaryotlardan farklıdır (Helliwell vd., 1994). Farklı memeli türlerinde tanımlanan TOR proteini FRAP (FKBP12 and rapamycin associated protein), RAFT (Rapamycin and FKBP12 Target), RAPT (Rapamycin Target) veya SEP (Sirolimus Effector Protein) olarak adlandırılmakla beraber genel olarak mTOR (mammalianTOR), olarak bilinir (Brown vd., 1994; Chen vd., 1994; Chiu vd., 1994; Sabatini vd., 1995; Sabers vd., 1995). Tüm Tor proteinleri aynı temel özelliklere sahiptir. Maya hücrelerinde *TOR1* ve *TOR2* genlerinin klonlanması sonrasında bu genler tarafından kodlanan proteinlerinin %67 oranında homolog olduğu belirlenmiştir (Cafferkey vd., 1993; Kunz vd., 1993; Helliwell vd., 1994).

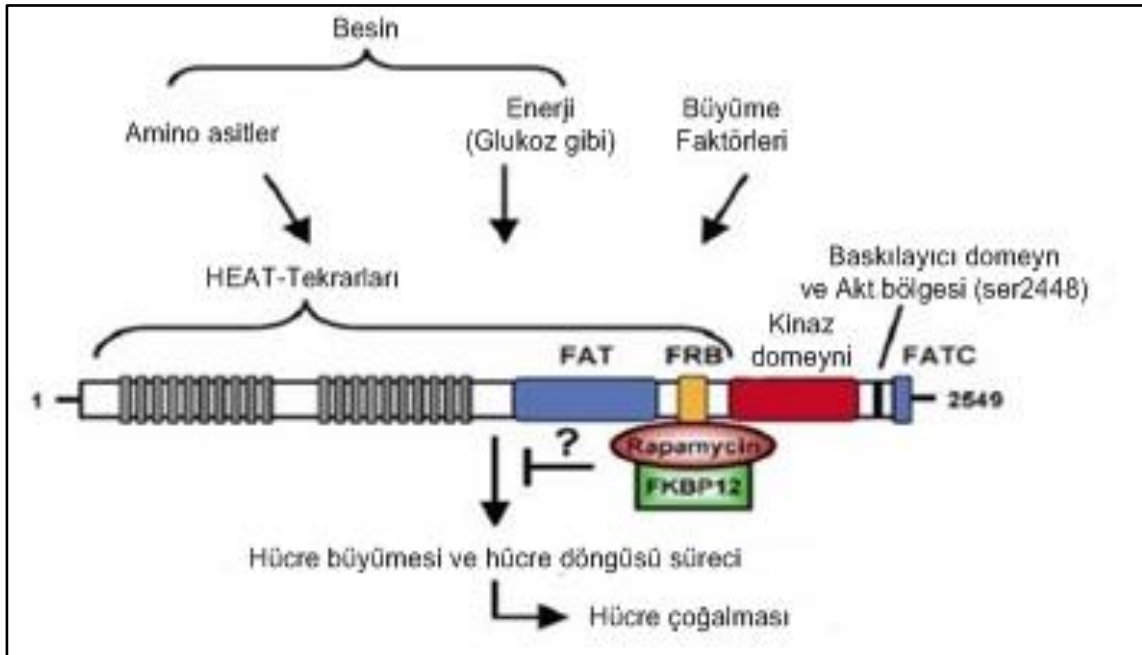
Tor proteininin amino ucu (N-terminal) ardarda sıralı 20'den fazla HEAT bağlanma bölgesinden oluşur. HEAT bölgesine bağlanan proteinler Huntington uzama faktörü 3 (Huntington Elongation factor3), Protein fosfataz 2A (Protein phosphatase 2A, PP2A) proteini ve Tor proteini (Tor1 veya Tor2) olduğu için bu bölgeler HEAT bölgeleri olarak bilinir. HEAT tekrarları 40-50 aminoasitten oluşur ve TOR komplekslerinin diğer alt birimleri için bağlanma bölgesidir (Wullschleger vd., 2005) (Şekil 3).



Şekil 3. TOR komplekslerinin alt birimlerinin Tor1 ve Tor2 proteinlerine bağlanması

Inoue ve Nomura, 2018.

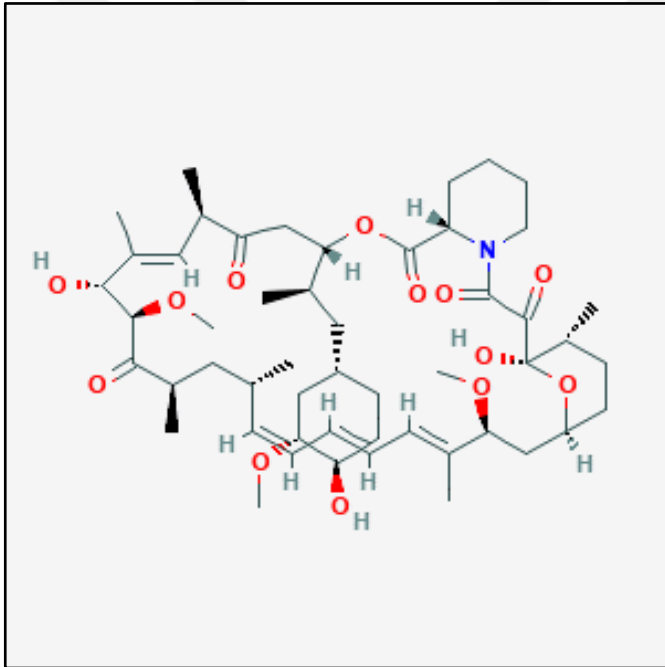
Standart HEAT tekrarları bloğunu farklı bir HEAT yapısı içeren FAT bölgesi (FRAP, ATM, TTRAP) takip eder. FAT bölgesine FRAP, ATM ve TTRAP proteinleri bağlanır (Şekil 4) (Schmelzle ve Hall, 2000). FAT proteinlerinin aşırı ekspresyonu maya için toksiktir. Tor proteininin karboksil ucunda FATC (FAT C-terminal) bölgesi bulunur. FAT ve FATC bölgeleri arasında FRB (FKBP-12 Rapamycin Binding) bölgesi ve devamında kinaz bölgesi bulunur. Bu iskelet yapısı tüm PIKK proteinlerinde bulunur. FAT bölgesi protein bağlanma bölgesi olarak önemlidir (Bosotti vd., 2000). FATC bölgesi, TOR'un işlevi için gereklidir. TOR'un üç boyutlu yapısının modellenmesinde proteinin çoğunun (kinaz bölgesi hariç) sarmal tekrarlardan oluştuğu gösterilmiştir. (Perry ve Kleckner, 2003). FKBP12 proteini rapamisin ile kompleks oluşturarak (FKBP12-Rap) Tor proteininde yer alan FRB bölgesine bağlanır ve kompleksin inhibisyonunu gerçekleştirir (Şekil 4). Ancak Tor2 proteinindeki FRB bölgesi TORCII kompleksinin farklı bir alt ünitesi tarafından kapatılmasından dolayı FKBP12-R kompleksi bu bölgeye bağlanamaz. Bu nedenle TORC1 kompleksi rapamisin tarafından inhibe edilirken TORCII kompleksi rapamisine duyarlıdır. FKBP12 ile kompleks halindeki rapamisin, mTOR'u engellemek için doğrudan FRB bölgesine bağlanır (Şekil 4) (Fingar ve Blenis, 2004).



Şekil 4. Tor1 ve Tor2 protein yapısı

Fingar ve Blenis, 2004.

Rapamisin 1970'lerin başında Paskalya adasında (Rapa Nui olarak bilinen) toplanan toprak örneğinden izole edilen *Streptomyces hygroscopicus* bakteri türünün misellerinden saflaştırılan bir antibiyotiktir. Rapamisin, Sirolimus olarakta bilinmekte olup (etimoloji: RAPA [Rapa Nui] -misin) erime aralığı 183 °C ile 185 °C arasında olup beyaz kristalli katı bir maddedir (Şekil 5). Antifungal ajan olarak kullanılan rapamisin belirli hücre tiplerinin hücresel büyümesini ve çoğalmasını engellediğinden dolayı güçlü bir bağışıklık bastırıcı antifungal ve antitümör/antiproliferatif ilaç olarak kabul edilmektedir (Sehgal vd., 1975; Sehgal, 2003). Ayrıca rapamisin birçok kanser hücre hattının çoğalmasını yavaşlattığı için anti-kanser ilacı olarakta kullanılmaktadır (Jacinto ve Hall, 2003).



Şekil 5. Rapamisinin (sirolimus) kimyasal yapısı

“Rapamisin (Sirolimus) Kimyasal Yapısı”, 2022

TOR1 geninin yokluğu maya hücreleri tarafından tolere edilebilir seviyede olmasına rağmen mutant hücrelerin büyümesi yavaşlar ve çevresel streslere (sıcaklık ve ozmotik stres gibi) karşı aşırı duyarlı olurlar (Cafferkey vd., 1993; Crespo vd., 2001). *TOR2* geninin yokluğu ise hücre döngüsünün durmasına neden olmaktadır (Kunz vd., 1993). *TOR1* ve *TOR2* genlerinin aynı anda yokluğu hücre döngüsünün G1 fazında kalmasına neden olduğundan ölümcüldür (Helliwell vd., 1998; Kunz vd., 1993).

TOR proteinleri büyüme faktörlerine ve beslenme durumuna cevap oluşturulmasında görev alan çok sayıda sinyal yolunu entegre eden önemli bir kontrol birimidir. TOR proteinleri özellikle transfer RNA'ların, ribozomal RNA'ların ve ribozomal proteinlerin ekspresyonunu kontrol eder (Li vd., 2006). Besin açlığına yanıt olarak rRNA'ları ve ribozomal proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunu hızla bastırılmaktadır (Kos-Braun vd.,2017). Rapamisin ile TOR kompleksinin baskılanması halinde rRNA sentezinde görev alan RNA polimeraz I (RNAP I) ve tRNA sentezinde görev alan RNA polimeraz III (RNAP III) genlerinin transkripsiyonunu baskılanır ve ribozom biyogenezi inhibe olur (Powers ve Walter 1999). Rapamisin ile muamele edilen hücrelerde G1 safhasında durma, protein sentezinin inhibisyonu, otofaji ve glikojen birikiminde artış gibi önemli fizyolojik değişikliklerin olduğu belirlenmiştir (Rohde vd., 2008).

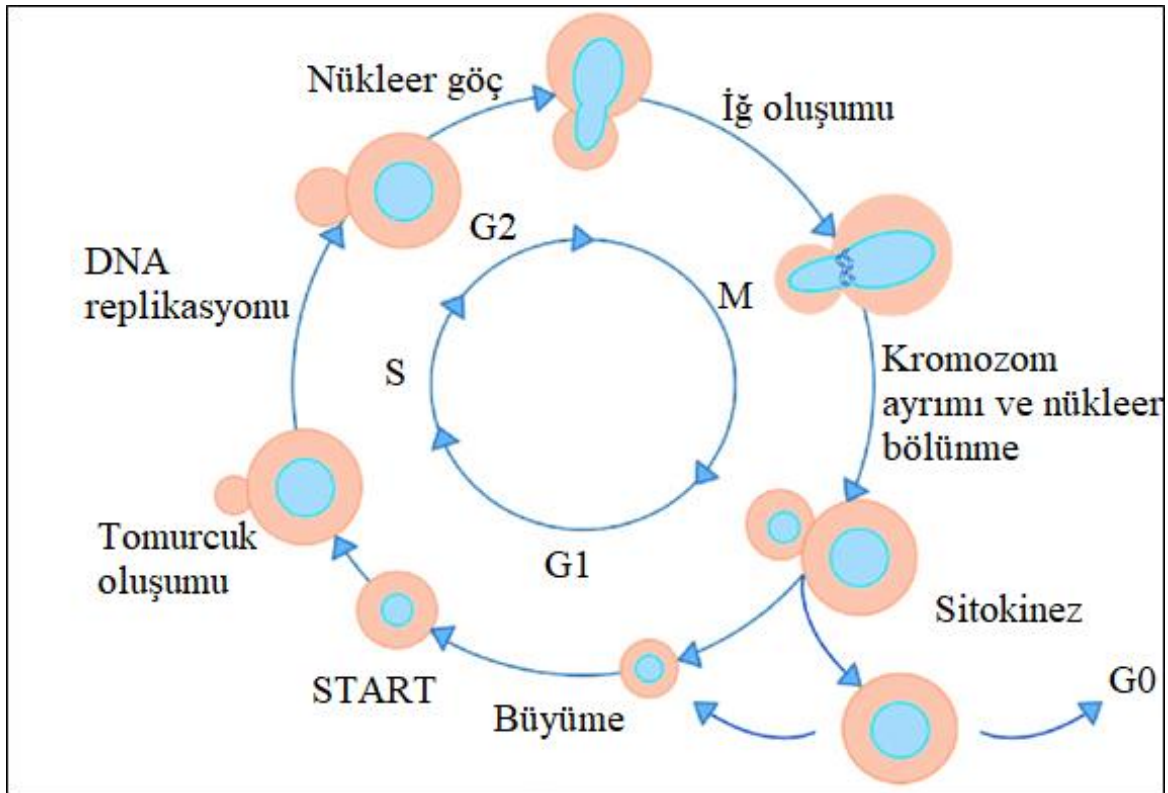
2.3. Hücre Döngüsü ve Regülasyonu

2.3.1. Hücre Döngüsü

Hücre içi dinamiklerinin korunması ve büyümenin hayatta kalma ile dengelenmesi için tüm hücreler sürekli değişen ortamlara uyum sağlamak zorundadır. Farklı sinyal yolları, mevcut besinlerin miktarlarını veya zararlı koşulların varlığını izleyerek kaynakların en iyi şekilde kullanılmasını sağlamak için belirli transkripsiyon programlarını açar veya kapatır. Temel besinler kullanılamaz hale geldiğinde ise hücre döngüsü belirli bir aşamada durdurulur, metabolizma değiştirilir ve aylarca hatta yıllarca hayatta kalabilecekleri durgun yaşam evresine girmeye hazırlanılır (De Virgilio, 2012).

Hücre döngüsü veya hücre bölünme döngüsü, bir hücrede meydana gelen ve iki yeni yavru hücreye bölünmesine neden olan olaylar dizisidir. Ökaryotlarda mitotik hücre bölünmesi, neredeyse tüm yüksek organizmalar için ortak olan, tekrarlanabilir bir zamansal olaylar dizisi aracılığıyla gerçekleştirilir. Bir hücre bölünmesi ile sonraki hücre bölünmesi arasında geçen süreçte hücrenin tüm temel bileşenlerinin ve özellikle genetik materyalinin doğru bir şekilde kopyalanması ve iki yavru hücreye aktarılması gerekmektedir. DNA replikasyonu ve kardeş kromatit ayırım süreci ökaryotik hücre döngüsünün zamansal olarak farklı fazlarında meydana gelir. Bunlar S fazı (DNA synthesis phase) ve M fazı (mitosis phase) olarak bilinir. S fazı ve M fazı birbirlerinden G1 (Gap 1) ve G2 (Gap 2) olarak bilinen

ara fazlar ile ayrılır (Şekil 6). G1 fazı önceki hücre bölünmesini DNA sentezinin başlangıcından ayırır. DNA replikasyonu, tipik olarak hücre döngüsünün yaklaşık üçte birini kaplayan DNA sentez periyodunda (S fazı) gerçekleştirilir. G2 fazı ise DNA sentezinin tamamlanmasını mitozun başlangıcı olan M fazından ayırır. Kısa mitotik fazda ise kardeş kromatitler yeni hücrelerin çekirdeklerine ayrılmasıyla sonuçlanır. Sitoplazmanın ayrılması ise ayrı hücre zarı içeren yavru hücrelere sitokinez mekanizması ile gerçekleşir. *S. cerevisiae* hücrelerinde olduğu gibi bazı organizmalarda döngü, hücre duvarının ayrılmasıyla tamamlanır. (Delobel ve Tesnière, 2014).

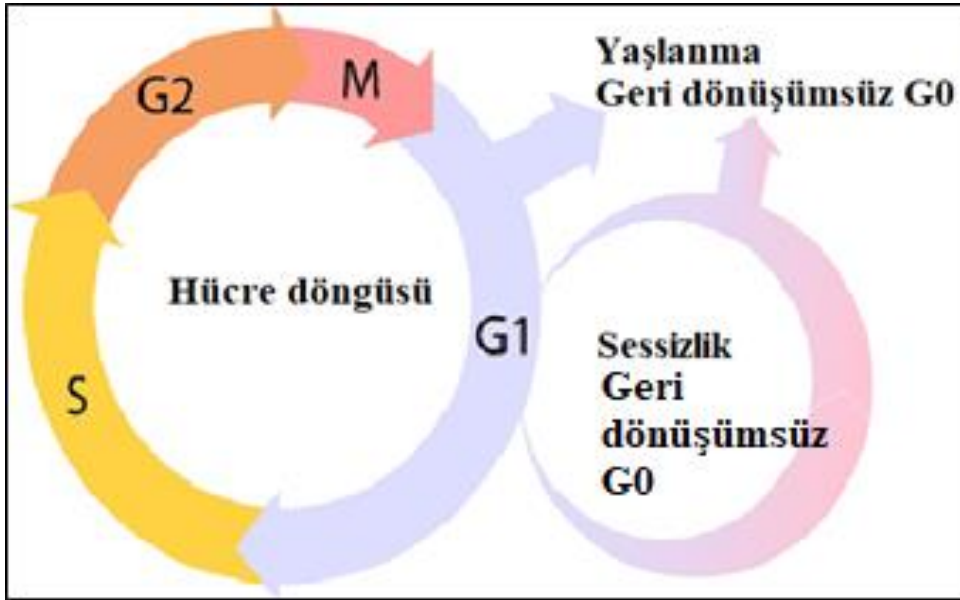


Şekil 6. *S. cerevisiae* hücre döngüsü

Palomba vd., 2021'den modifiye edilmiştir.

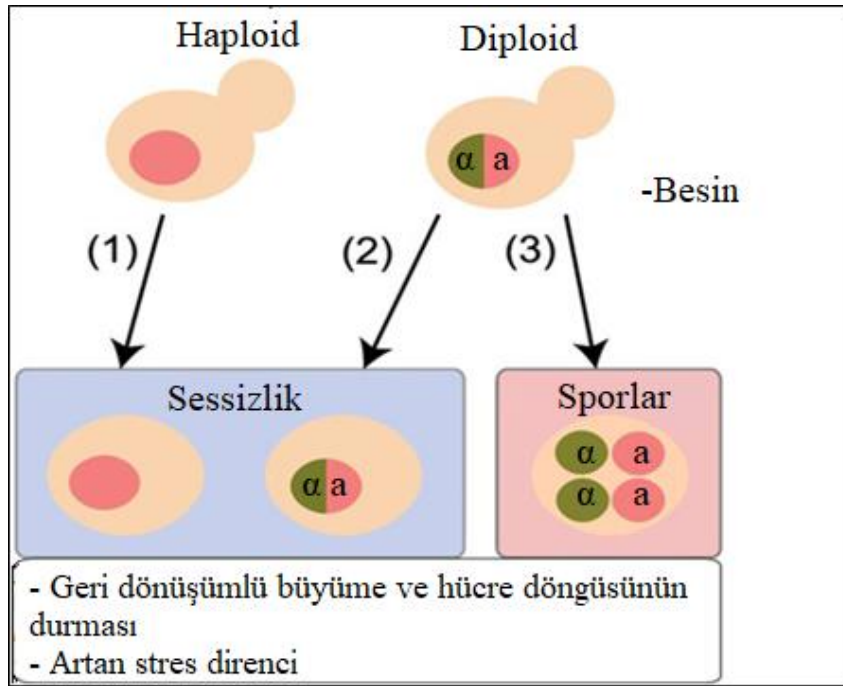
Tüm canlı hücreler yaşam döngüleri boyunca iki farklı durumdan birinde bulunur. Bu durumlarda birincisi hücrelerin büyüme ve mitotik hücre bölünme döngüsü yoluyla hücre boyutunu ve sayısını arttırdığı proliferatif durum (G1-S-G2-M fazlarını içeren), diğeri ise hücrelerin büyümesinin ve bölünmesinin durduğu nonproliferatif (G0) durumudur. Non proliferatif durumdaki hücreler ya geri dönüşümlü (reversible) ya da geri dönüşümsüz

(irreversible) olmak üzere iki durumda bulunabilirler (Şekil 7) (Valcourt vd., 2012). Geri dönüşümlü durumda bulunan nonproliferatif hücreler ortam koşulları uygun olduğunda tekrar G1 fazına dönerek hücre döngüsünü tamamlar (Cheung ve Rando, 2013; Laporte vd., 2018). Bu nedenle bu hücrelerin bulunduğu G0 durumu ‘Durağan Evre’ (quiescent stage) olarak adlandırılır. *S. cerevisiae* maya hücrelerinde G0 evresi durağan evre olup bu evrede uzun süre kalan maya hücreleri ortam koşulları düzelmediğinde diploid (a/α) forma geçerek mayoz bölünme sonrası spor oluşturur (Şekil 8). Geri dönüşümsüz bulunan nonproliferatif hücreler ise yaşlanmış (Senescent) ve farklılaşmış (Differentiated) olmak üzere iki farklı G0 evresinde bulunabilirler. Yaşlanmış ve farklılaşmış G0 evresinde bulunan hücreler durağan G0 evresinden farklı olup bu evrelerde bulunan hücreler tekrar mitotik hücre döngüsüne geri dönüş yapamazlar. Yaşlanmış evrede bulunan hücreler hücrenin soyunu devam ettiremeyecek boyutta DNA hasarına veya bozulmasına uğradığından geri dönüşüm yapamazlar. Farklılaşmış G0 evresinde bulunan hücreler ise kök hücreler (Stem cells) olup farklılaşma programından geçerek son olgunlaşmış evreye ulaşmış hücrelerdir (örneğin sinir hücreleri). Yaşlanmış ve farklılaşmış G0 evresinde bulunan hücreler artık çoğalamazken, birçok normal hücresel işlevi yerine getirebilirler (Sun ve Gresham, 2021).



Şekil 7. Mitotik hücre döngüsü ve G0 çeşitleri

Sun ve Gresham, 2021'den modifiye edilmiştir.

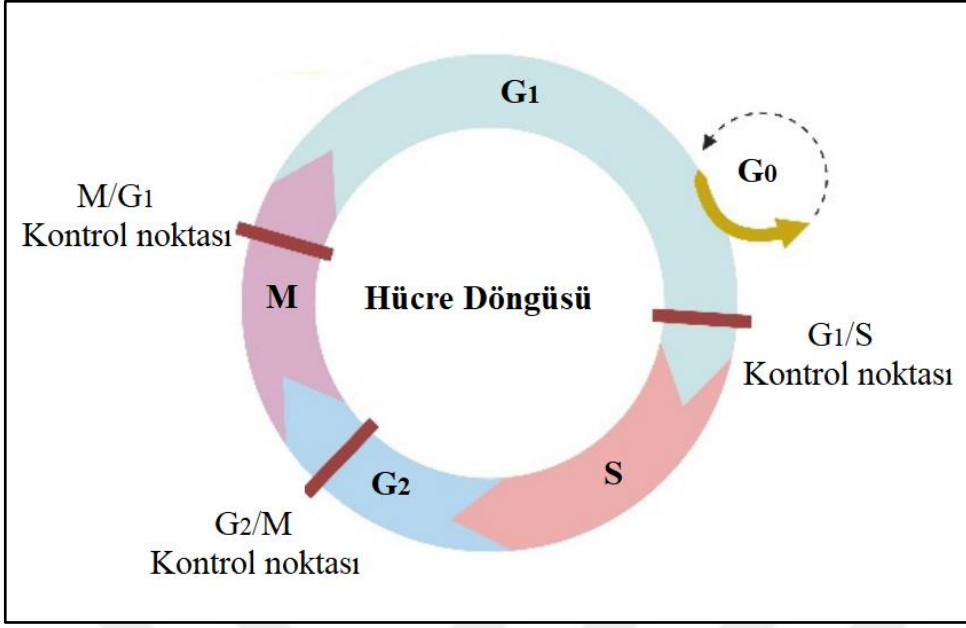


Şekil 8. Durağan ve proliferatif maya hücreleri.

Sun ve Gresham, 2021 'den modifiye edilmiştir.

2.3.2. Hücre Döngüsünün Regülasyonu

S. cerevisiae maya hücrelerinde hücre döngüsü içerisinde üç ana kontrol noktası bulunmaktadır (Şekil 9). İlk kontrol noktası G1 fazının sonuna doğru olan başlama kontrol noktası (Start checkpoint) veya kısıtlama kontrol noktası (Restriction checkpoint) olarak adlandırılan G1/S kontrol noktasıdır (G1/S checkpoint). Bu kontrol noktasında DNA'da hasar olup olmadığı ve yeni oluşacak hücrelerin kullanabileceği besinin yeterli olup olmadığı kontrol edilir. İkinci kontrol noktası G2 fazının sonunda yer alan G2/M kontrol noktası (G2/M checkpoint) olup DNA molekülünün doğru kopyalanıp kopyalanmadığı kontrol edilir. Üçüncü kontrol noktası ise M fazının sonunda yer alan iğ iplikçığı birleşimi kontrol noktası (Spindle assembly checkpoint) olup iğ iplikçiklerinin doğru bir şekilde birleşmesi ve kardeş kromatidlere doğru şekilde bağlanıp bağlanmadığı kontrol edilir (Smirnikhina, vd. 2022). Bu kontrol noktalarının oluşumu protein kinaz ailesine ait olan Cdk/siklin (Cyclin dependent kinase/Cyclin) kompleksleri tarafından gerçekleştirilir.



Şekil 9. Hücre döngüsünün kontrol noktaları

Smirnikhina, vd. 2022'den modifiye edilmiştir.

Cdk/siklin kompleksinin katalitik alt birimini siklin-bağımlı kinaz (Cdk) ve düzenleyici alt birimini farklı siklinler oluşturmaktadır. Siklin-bağımlı kinaz kendisine bağlanan siklinler ile aktive edilir. *S. cerevisiae* maya hücrelerinde Cdc28 (Cell Division Cycle 28) olarak adlandırılan tek bir siklin-bağımlı kinaz bulunurken yüksek ökaryotlarda *S. cerevisiae* maya hücrelerinde Cdc28 ile kompleks oluşturan üç tane G1 siklin (Cln1p, Cln2p ve Cln3p) ve altı tane B-tipi siklin (Clb1p, Clb2p, Clb3p, Clb4p, Clb5p ve Clb6p) olmak üzere dokuz siklin proteini bulunmaktadır (Tyers vd., 1993; Wittenberg.vd., 1990; Mendenhall ve Hodge 1998). Siklinler, hücre döngüsü sırasında periyodik olarak sentezlenir ve parçalanır (King.vd., 1996). Cdc28 katalitik alt üniteye bağlanan sikline bağlı olarak, Cdc28/siklin dimerleri belirli ve farklı görevleri yerine getirir. Hücre döngüsü boyunca uygun ilerleme, bu Cdc28/siklin dimerlerinin art arda aktivasyonunu ve inaktivasyonu ile gerçekleşir. Cdc28 proteininin aktivitesini kontrol eden ve hücre döngüsünde gerçekleşmesi gereken olayların uygun şekilde ilerlemesinde görev alan düzenleyici proteinlerin listesi Tablo 2’de verildi (“Modeling the Budding Yeast Cell Cycle,” 2022).

Siklinlere ilave olarak hücre döngüsünün regülasyonunda siklin-bağımlı kinazın aktivitesini kontrol eden inhibitör proteinler ve birleştirici faktörlerde (assembly factors)

bulunmaktadır. *S. cerevisiae* maya hücrelerinde *FAR1* (Factor Arrest 1) ve *SIC1* (Subunit Inhibitor of Cyclin-dependent protein kinase 1) genleri tarafından kodlanan Cdc28 inhibitörü olan iki tane siklin-bağımlı kinaz inhibitörü (CKI; Cyclin-dependent Kinase Inhibitor) bulunur. Feromon kaynaklı hücre döngüsünün durdurulması için gerekli olan Far1p, Cln1p-Cdc28p, Cln2p-Cdc28p ve Cln3p-Cdc28p komplekslerinin kinaz aktivitelerini inhibe etmesine rağmen, Clb5p- Cdc28p veya Clb2p- Cdc28p komplekslerinin aktivitelerini inhibe etmemektedir (Chang ve Herskowitz 1990; Peter ve Herskowitz 1994). Far1p inhibitörünün aksine, Sic1p inhibitörü B tipi siklin-Cdc28p kompleksleri için spesifik inhibitördür (Schwob vd., 1994). Sic1 proteini G1/S fazı geçişini kontrol ettiği gibi S fazının eken sonlanmasını engellemektedir. Clb5/6-Cdk1 ve Cln1/2-Cdk1 kinazlar Sic1 proteini fosforile ederek Sic1 proteininin ubiquitin aracılı protein parçalanması yoluyla (ubiquitin-mediated proteolysis pathway) üzerinden degradasyonunu kontrol etmektedir (Sheaff ve Roberts,1996). Siklin-bağımlı kinazlar aktivatör proteinlerin (siklinler) ve inhibitör proteinlerin (Far1p ve Sic1p) bağlanması ile kontrol edildiği gibi fosforilasyon mekanizmasıyla da aktivitesi kontrol edilmektedir. Cdc28 kinazın üzerinde inhibisyon ve aktivasyon için gerekli fosforilasyon bölgeleri bulunmaktadır. Cdc28 proteininin inhibisyonu 19. Tirozin amino asitinin *SWE1* (*Saccharomyces Wee1*) geni tarafından kodlanan protein kinaz tarafından fosforilasyonu ile gerçekleşirken defosforilasyonu *MIH1* (Mitotic Inducer Homolog) geni tarafından kodlanan tirozin fosfataz tarafından gerçekleştirilir (Solomon ve Kaldis, 1998). Cdc28 proteininin aktivasyonu ise 169. Threonin amino asitinin Cdk-aktive eden kinaz 1 (CDK-activating kinase 1, Cak1p) tarafından fosforilasyonu ile gerçekleşir (Kaldis 1999).

Tablo 2.

Cdc28 proteininin aktivitesini kontrol eden düzenleyici proteinler

Protein Adı	Görevi
Cdc28	Siklin bağımlı kinazdır
Cln3	Başlangıç olaylarını başlatan G1-siklidir
Bck2	Başlangıç olaylarını başlatan proteindir
Cln1, Cln2	Tomurcuklanmada görev alan siklinlerdir
Clb5, Clb6	Geç G1'de bulunan B tipi siklinler, DNA sentezinde yer alırlar
Clb1, Clb2	Mitoz için gerekli olan B tipi siklin, S/G2/M fazında bulunurlar
Sic1	Cdc28/Clb2 ve Cdc28/Clb5 dimerlerinin inhibitörüdür.
Cdc6	Cdc28/Clb2 dimerinin inhibitörüdür
APC	Anafaz Teşvik Kompleksi, Clb2, Clb5 ve Pds1 proteolizinde sorumludur
IE	APC çekirdeğinin fosforile edilmiş formu olarak tanımlanmıştır
Cdc20	APC aktivatörü; Clb2, Clb5 ve Pds1 proteolizinde yer alan ve mitozdan çıkış için gerekli olan proteindir
Cdh1	APC aktivatörü; Clb2 ve Pds1 proteolizinde yer alan proteindir
Pds1	Kardeş kromatid ayrılmasını önleyen Esp1 inhibitörüdür
Esp1	Kardeş kromatid ayrımı için gerekli olan separin proteindir
Mad2	Kromozomlar düzgün bir şekilde hizalanana kadar Cdc20'yi hareketsiz tutan kontrol noktası proteindir
Bub2	İğ ipliği oryantasyonu tarafından yönetilen kontrol noktası proteindir
Lte1	Tomurcukta bulunan GTP değişim faktörü ve Tem1 aktivatörüdür
Tem1	GTP bağlayıcı protein ve MEN yolunun bileşenidir
Cdc15	Geç nükleer bölünme için gerekli olan kinazdır ve MEN yolunun bileşenidir

Tablo 2.

Cdc28 proteininin aktivitesini kontrol eden düzenleyici proteinler (devamı)

Protein Adı	Görevi
Net1	Nükleolar protein ve Cdc14 inhibitörüdür
Cdc14	Mitozdan çıkmak için gerekli olan fosfatazdır
Swi5	Sic1 ve Cdc6 için transkripsiyon faktörüdür
SBF	Cln2 için transkripsiyon faktörüdür
Mcm1	Clb2, Cdc20 ve Swi5 için transkripsiyon faktörüdür
MBF	Clb5 için transkripsiyon faktörüdür

“Modeling the Budding Yeast Cell Cycle”, 2022

2.4. Tor Sinyal Sisteminin Hücre Döngüsüne Etkisi

S. cerevisiae maya hücreleri besin stresine (karbon, azot ve fosfor gibi) ve çevresel streslere (ısı stresi, ozmotik stres ve oksidatif stres gibi) karşı farklı sinyal yolları aracılığıyla hücrel cevap oluşturmaktadır. TOR sinyal yolağı ve cAMP-bağımlı Protein Kinaz A sinyal yolağı özellikle besin kısıtlamasına karşı oluşturulan cevapta kullanılan ve birbirleri ile uyumlu çalışan en önemli iki sinyal yolağıdır. *S. cerevisiae* maya hücreleri azot kaynağının miktarına ve kalitesine bağlı olarak TOR sinyal yolağını ve cAMP-bağımlı Protein Kinaz A sinyal yolağı aracılığıyla sorumlu genleri aktif veya inaktif hale getirmektedir. Bu nedenle kuvvetli azot kaynağında (glutamin ve amonyum gibi) ve zayıf azot kaynağında (prolin ve üre gibi) üretilen maya hücrelerinin gen ekspresyon seviyelerinde farklılıklar oluşmaktadır (Scherens vd., 2006). Rapamisin gibi, zayıf azot kaynağında besin açlık sinyali oluşturarak TOR sinyal yolağını baskımlarken kuvvetli azot kaynağında TOR sinyal yolağı aktive olur.

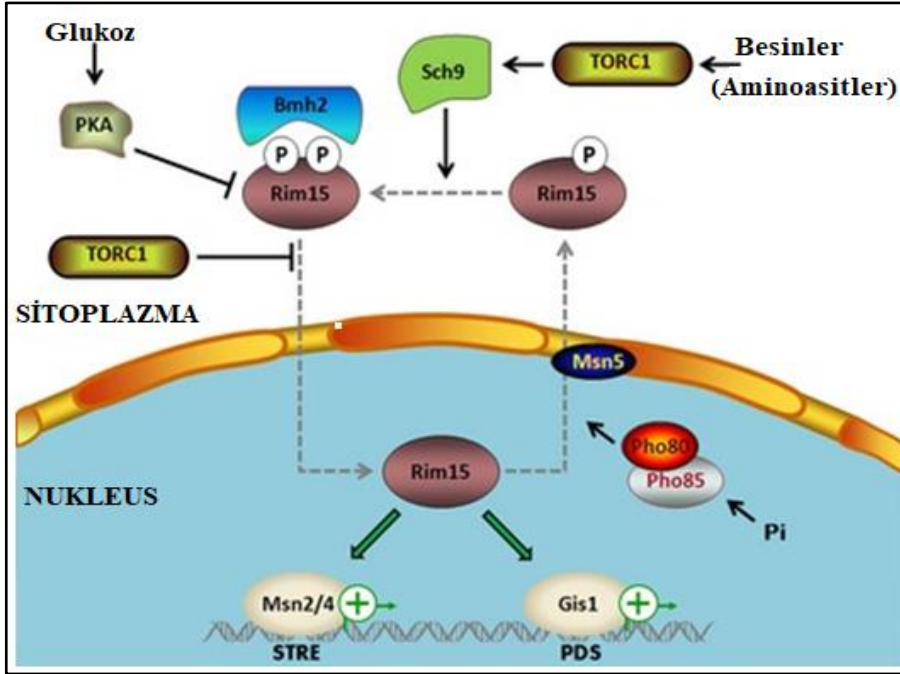
TOR sinyal yolağı mayada ribozom biyogenezini düzenler, genel protein biyosentezi yoluyla hücre büyümesini kontrol eder. TOR kinazlar translasyonun başlaması ve hücre

döngüsünün özellikle erken G1 fazında ilerlemesini kontrol etmektedir (Heitman, Movva, ve Hall, 1991; Kunz vd., 1993; Barbet vd., 1996). TOR sinyal yolağının besin stresi veya rapamisin ile baskılanması durumunda translasyon başlatma faktörü olan eIF4G (Eukaryotic Initiation Factor 4G) proteinini kararsız hale getirerek mayada translasyonu inhibe eder (Berset vd., 1998). Böylece protein sentezini ve hücre döngüsünü özellikle G1 fazında kontrol ederek büyümenin yavaşlamasına veya durmasına (G0 evresine girmesine) neden olur (Barbet vd., 1996; Bjornsti ve Houghton, 2004).

Hücre döngüsü ilerlemesi, kinazlar ve fosfatazların koordineli bir şekilde çalışması ile gerçekleşir. CDK substratlarının fosforilasyonlarını tersine çeviren fosfatazlar mitoz giriş, ilerleme ve mitozdan çıkış için oldukça önemli role sahiptir. CDK substratlarının net fosforilasyonu, CDK aktivitesi ile karşı etki yapan fosfatazlar arasındaki dengeye bağlıdır. Mitozda CDK substratlarının maksimum fosforilasyona ulaşması için, bu fosforilasyonları tersine çeviren ana fosfatazın (PP2A) inhibe edilmesi gerekmektedir. *S. cerevisiae* maya hücrelerinde Rim15 kinaz, mayotik gen ekspresyonunu uyarmak ve ayrıca G0 fazına giriş için gerekli olan TORC1 ve protein kinaz A (PKA) tarafından negatif olarak düzenlenen bir proteindir. *IGO1* (Initiation of G₀ 1; paralog with *IGO2*) geni tarafından kodlanan ve G0 programını başlatan Igo1 proteini Rim15 kinaz tarafından fosforlanarak aktive edilir. Igo1 proteini 5'-3' mRNA yıkım yolağı (5'-3' mRNA decay pathway) ile besine bağımlı mRNA yıkımını önlemekte olup Rim15p gibi fosforilasyon-defosforilasyon durumuna bağlı olarak sitoplazmada ve/veya nükleusta lokalize olmaktadır (Talarek vd., 2010, 2017).

Tor yolağı aktif olduğunda Tor1p proteini Sch9 kinazı fosforlayarak aktifleştirir. Aktif Sch9 proteini Rim15 kinazı fosforlayarak Bmh2 proteinin bağlanmasına ve Rim15 kinazın nükleusa geçmesini engeller (Şekil 10). Azot açlığıyla veya rapamisin ile TOR yolağının inhibe olması Sch9 kinazın inaktivasyonuna ve dolayısıyla Rim15 kinazın aktif hale geçmesine neden olur. Igo1/2p fosforilasyonunu ve PP2A^{Cdc55} aktivitesinin baskılanmasına neden olarak hücrelerin G0 (Quiescence) evresine girmesini sağlar (Bontron vd., 2013; Martín vd., 2017; Sarkar vd., 2014; Talarek vd., 2010). Cdc55 (Cell Division Cycle 55) proteini protein fosfataz 2A (PP2A) enziminin düzenleyici alt ünitesi olup PP2A aktivasyonu için gereklidir. Yapılan çalışmalarda *S. cerevisiae* maya hücrelerinin G1/S

geçişi Sic1p stabilizasyonu ve Whi5p inaktivasyonu olmak üzere iki temel olayla kontrol edilmektedir.



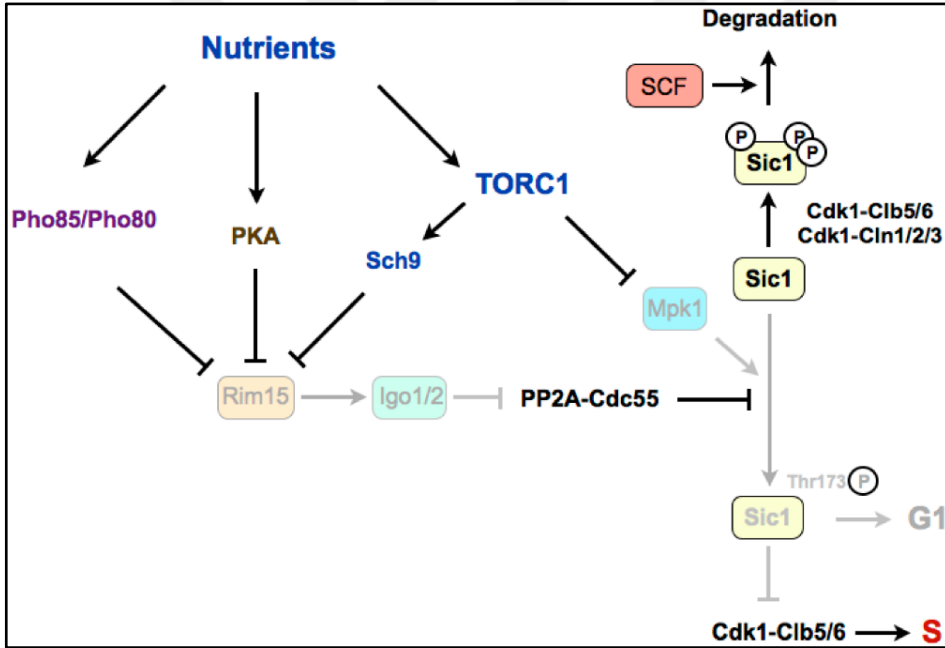
Şekil 10. TOR bağımlı Rim15 kinaz aktivasyonu

Swinnen vd., 2014'ten modifiye edilmiştir.

2.4.1. Sic1p Stabilizasyonu

Maya hücrelerinin rapamisin ile muamelesi iki farklı yol üzerinden hücre döngüsünün G1 fazında durmasına neden olur. Bunlardan ilki G1 siklinlerin aşağı regülasyonu diğeri ise DNA replikasyonunun başlaması için gerekli olan ve Cdk1-Clb5,6 komplekslerini inhibisyonundan sorumlu olan Sic1 proteininin akümüülasyonu ile gerçekleşir (Lengronne, ve Schwob, 2002; Zinzalla vd., 2007). TORC1, G1 siklinlerinin transkripsiyonunu ve translasyonunu uyararak G1/S geçişi için gerekli olan Cdk1-siklin komplekslerini aktive eder. Sic1 proteininin stabilitesi fosforilasyon ile düzenlenir (Şekil 11). TORC1 aktif olduğunda Cdk1-siklinler Sic1 proteinini fosforile edererek Sic1 proteininin SCF (Skp1–Cul1–F-box)–Cdc4 E3 ubikuitin -ligaz, kompleksine bağlanmasını sağlar. SCF kompleksi Sic1 proteininin ubikuitinasyonuna sebep olarak proteozom degradasyonu ile Sic1p seviyesinin azaltılmasını sağlar (Verma vd., 1997; Nash vd., 2001;

Köivomägi vd., 2011). Besin sınırlamasında veya rapamisin varlığında, TORC1 inaktive olur ve G1 siklin seviyeleri düşer, böylece Sic1p üzerindeki Cdk1-siklin komplekslerinin negatif regülasyonunu kalkar. Besin sınırlamasında Sic1p stabilizasyonu için G1 siklinlerinin aşağı regülasyonuna ilave olarak Sic1 proteininin 173. threonin (Thr173) amino asitinde fosforlanması gerekmektedir (Zinzalla vd., 2007). G1 fazında Rim15 aktivitesi daha yüksektir ve PP2A-B55 inaktive olur. Bu durum Sic1p-Thr173 fosforilasyonuna ve protein stabilizasyonuna neden olur. G1/S geçişinde, Rim15 kinaz Cdk1-Cln1,2,3 ve CDK kinaz Pho85p tarafından paralel olarak fosforlanarak 14-3-3 proteini Bmh2 tarafından sitoplazmada tutularak inaktive edilir. Rim15 inaktivasyonu Sic1-Thr173 defosforilasyonundan sorumlu PP2A enziminin aktivasyonuna sebep olur ve böylece Sic1p destabil hale geçer (Şekil 11) (Moreno-Torres vd., 2017).



Şekil 11. Sic1 protein stabilizasyonu

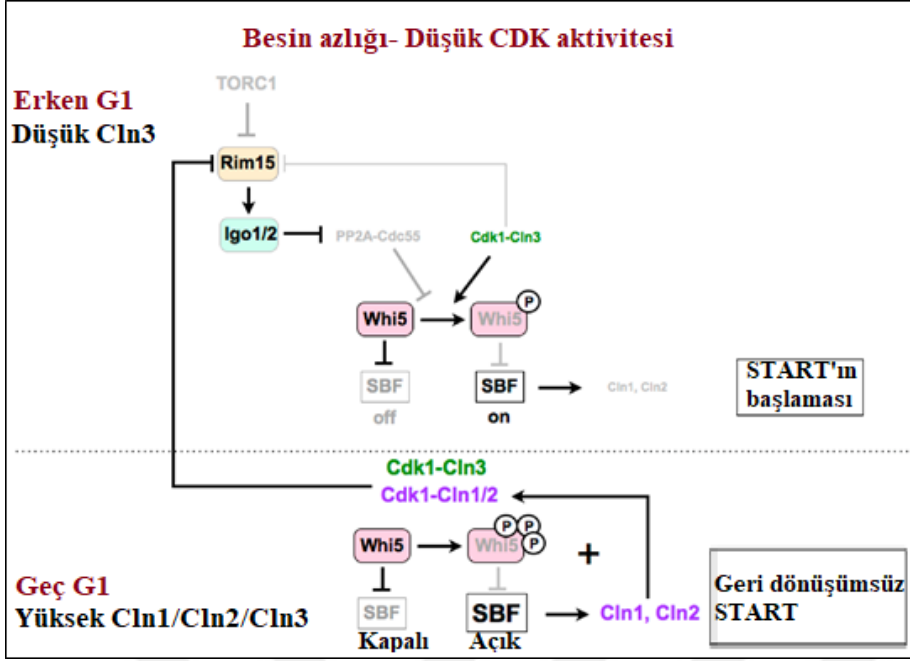
Pérez -Hidalgo ve Moreno, 2017'den modifiye edilmiştir.

2.4.2. Whi5p İnaktivasyonu

S. cerevisiae maya hücrelerinde G1/S geçişi için Cdk1 aktivitesi gereklidir. G1 siklini olan Cln3 Cdk1 ile birleşerek başlama (START) için hücre boyutunu belirler. Ayrıca Cdk1-

Cln3 kompleksi geç G1 fazında (Late G1) gerekli olan Cln1 ve Cln2 siklinlerin ekspresyonunun tetiklenmesine yardımcı olur. Böylece geç G1 fazında üç siklin (Cln1, Cln2 ve Cln3) START geçişini geri döndürülemez hale getirmek için işbirliği yapar. G1/S geçişi için CDK enziminin en önemli substratı *WHI5* (WHIskey) tarafından kodlanan Whi5p G1 represör proteindir. Whi5 proteininin fosforlanmamış formu SCB (Swi4/6 Cell cycle Box) bağlanma faktörü olan ve başlama için gerekli olan SBF (SCB -Binding Factor) transkripsiyon faktörünün represörüdür. Whi5 proteinini inhibe eden fosforilasyon Cdk1–Cln1,2,3 tarafından gerçekleştirilirken defosforilasyonu PP2A tarafından yapılır. Erken G1 safhasında (Early G1) Cdk1–Cln3 aktivitesi düşük seviyede iken Rim15 aktif durumdadır. Aktif Rim15 kinaz Igo1/2 proteinlerini aktive ederek PP2A enziminin inhibisyonunu sağlar (Şekil 12) (Talarek vd., 2017). Bu durum fosforlanmış ve inaktif formdaki Whi5 proteininin akümülyasyonuna ve SBF transkripsiyon faktörünün transkripsiyonunun başlamasına neden olur. Cln1 ve Cln2 siklinlerinin SBF tarafından Cln3 ile birlikte ekspresyonu, Cdk1 aktivitesinde ve Whi5 fosforilasyonunda bir artışa yol açarak START geçişini geri döndürülemez hale getirir (Şekil 12).

Erken G1 safhasında Cdk1–Cln3 aktivitesi düşük iken Rim15 aktivitesi yüksek olmasına rağmen G1 safhası ilerledikçe Cdk1–Cln1,2,3 aktivitesinden dolayı Rim15 aktivitesi azalmaya başlamaktadır (Moreno-Torres vd., 2017). Ortam koşulları uygun olduğunda CDK aktivitesi yüksek olduğundan PP2A inhibisyonuna gerek kalmaz. Dolayısıyla zengin ortamda, START geçişinde *IGO1/IGO2* içermeyen hücrelerdeki hücre boyutu *IGO1/IGO2* içeren hücrelerdeki hücre boyutuna benzemektedir. Zengin ortamda, hücreler START safhasından geçmeden önce yaklaşık $35 \mu\text{m}^3$ boyutuna ulaşmalıdır (Ko ve Moore, 1990, Moore, 1988). Ancak ortam koşulları uygun olmadığında (örneğin azot açlığında veya glikoz yerine gliserol/laktat varlığında) CDK aktivitesi azalmaya başladığında Whi5p fosforilasyonunu kolaylaştırmak ve daha küçük hücre boyutunda START'ı desteklemek için Rim15–Igo1/2 yolunun aktivitesine ihtiyaç duyulur. Sonuç olarak, zayıf ortamda veya Cdk1 aktivitesinin azaldığı koşullarda, *IGO1/IGO2* genlerinin yokluğu START basamağında hücre boyutunun arttığını gösterir (Talarek vd., 2017; Moreno-Torres vd., 2017)



Şekil 12. Whi5p inaktivasyonu

Pérez -Hidalgo ve Moreno, 2017'den modifiye edilmiştir.

2.5. Transkriptom Analizi

Transkriptom, belirli bir gelişim aşaması veya fizyolojik durum için belirli bir doku tipi veya hücrede ifade edilen tüm RNA transkriptlerinin toplamıdır. Transkriptomun anlaşılması, genomun fonksiyonel öğelerini yorumlamanın yanı sıra hastalığın ve biyolojik süreçlerinin neredeyse tüm genomik gelişiminin altında yatan mekanizmaları anlamak için gereklidir (Ozsolak ve Milos, 2011; Byron vd., 2016). Bir organizmadaki genlerin farklı koşullarda ve farklı dokulardaki gen ekspresyon seviyelerinin ölçülmesi bu genlerin nasıl düzenlendiği hakkında bilgi sahibi olmamıza olanak sağlar. Daha önce işlevleri bilinmeyen genlerin işlevlerini anlamaya da yardımcı olabilir. Transkriptomik analiz, farklı organizmalarda gen ekspresyonunun nasıl değiştiğinin incelenmesine olanak sağlamıştır (Lowe vd., 2017).

Bir organizmanın fenotipi ifade edilen genler tarafından belirlenir. Statik bir varlık olan genomun aksine, transkriptom iç ve dış faktörler tarafından değiştirilip, düzenlenebilir. Transkriptom böylece bir organizmanın genomu ile fiziksel özellikleri arasında dinamik bir

bağlantı görevi görür. Transkriptom insan genomunun yalnızca küçük bir bölümünü temsil etse de (<5%) çok karmaşıktır çünkü alternatif splicing, gen füzyonu, antisens transkripsiyon ve RNA düzenlemesi ile oluşturulan transkriptler, transkriptomun çeşitliliğini büyük ölçüde artırır. (Wang, vd. 2009; Ponting, 2008; Keren vd., 2010).

RNA dizileme (RNA-Seq), bir hücrenin transkriptomunun iç yüzünü anlamak için yüksek verimli dizileme yöntemlerini kullanır (Kukurba ve Montgomery, 2015). RNA örneklerinden sentezlenen cDNA'lar yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing, NGS) yöntemi kullanılarak dizilenir ve milyonlarca kısa okuma elde edilir. Bu okumalar daha sonra bir referans genom ile eşleştirilir ve ilgilenilen genomik özelliğe ait (bir gen veya bir ekson gibi) veriler elde edilir (Oshlack vd., 2010). RNASeq, çok düşük seviyelerde ifade edilen RNA seviyelerini tespit edebildiği gibi RNA-Seq ekson sınırlarının belirlenmesine, intronların keşfedilmesine de olanak tanır (Nagalakshmi vd., 2008). RNA dizileme henüz belirlenmemiş genomik dizilere sahip model olmayan organizmalar için avantajlıdır. Bu yöntem ile transkripsiyon sınırlarının kesin konumunu tek bazlık çözünürlüğe kadar ayırt etmek mümkündür. Bu durum karmaşık transkriptomları çalışmaya olanak sağlar. Ayrıca RNA dizileme transkribe edilen bölgelerdeki dizi varyasyonlarını (örneğin, SNP'ler) ortaya çıkarabilir (Cloonan vd., 2008; Marioni vd., 2008). RNA-seq analizi iş akışı; ham verilerin ön işleme, okuma-hizalama, transkriptom rekonstrüksiyonu (yeniden inşa edilmesi), ifade miktar belirleme diferansiyel ifade analizi olmak üzere beş ana basamaktan oluşur.

RNA-Seq, bir teknoloji olarak erken aşamalarında olmasına rağmen, gen ekspresyon çalışmalarına göre avantajlıdır. RNA-Seq *S. cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, fareler ve insan hücreleri dahil olmak üzere çeşitli organizmalara uygulanmaktadır (Wang, vd, 2009; Lister vd., 2008; Cloonan vd., 2008; Nagalakshmi vd., 2008).

S. cerevisiae maya türünde aynı suşta farklı büyüme koşulları altında gen ekspresyonundaki farklılıklar sıklıkla çalışılırken, son yıllarda yapılan çalışmalarda farklı maya türlerinde karşılaştırmalı analizlerde de kullanılmaktadır (Yvert vd., 2003; Kvitek, Will ve Gasch, 2008; Fay vd., 2004; Busby vd., 2011; Sardu vd., 2014). *Saccharomyces* Genom Veri tabanında (SGD) bulunan 5099 ORF'tan (Open Reading Frame) 4666 ORF için

anlamli ekspresyon belirlenmistir. Anlamli ekspresyon gosteren genlerin %20'si icin yuksek, %39'u icin orta ve %33'u icin dusuk ekspresyon seviyesi tespit edilmiştir (Nagalakshmi vd., 2008). Analiz edilen buyume kosullarında işlevi gerekmeyen mayoz, sporulasyon, çiftleşme, hücre farklılaşması, şeker taşınması ve vitamin metabolizmasıyla ilgili birçok genin ekspresyonu tespit edilememiştir (David vd., 2006).

Farklı firmalar tarafından üretilen çeşitli NGS (İllumina, Ion Torrent, Roche 454 life science v.b.) platformları mevcuttur. Ion Torrent dizileme platformu, sentezlenen DNA ipliğine bir nükleotid eklenmesi ve hidrojen iyonunun (H⁺) salınmasıyla indüklenen pH değışikliklerinin saptanmasına dayanan yarı iletken dizileme tekniğine dayanır. Ion Torrent platformunda kullanılan dizileme tekniğı 100-130 milyon (60–80 milyon-540 chip) okuma yapabilen İon torrent S5 cihazı 20-25 milyar baz okuma kapasitesine sahiptir. İon torrent dizileme teknolojisi başlıca, RNA izolasyonu, fragmentasyonu, cDNA kütüphanesinin oluşturulması, emPZR ile klonal çoğaltım ve zenginleştirme, nükleotid dizileme ve veri analiz işlemlerinden oluşmaktadır (Merriman vd., 2012; Quail vd., 2012; Grada ve Weinbrecht, 2013).

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. *S. cerevisiae* Maya Suşlarının Özellikleri

S. cerevisiae maya suşu olarak yaban tip (BY4741) (*MATa*; *ura3Δ0*; *leu2Δ0*; *his3Δ1*; *met15Δ0*) ve *TOR1* gen mutasyonu taşıyan (Y06864) (*MATa*; *ura3Δ0*; *leu2Δ0*; *his3Δ1*; *met15Δ0*; *YJR066w::kanMX4*) suşlar kullanıldı. Y06864 maya suşu BY4741 maya suşu ile izogenik maya suşudur. BY4741 suşu standart haploid *S. cerevisiae* suşu olup genomu tümüyle sekanslanmış ve metabolik yollarla ilgili genlerde herhangi bir mutasyon içermediği bilinmektedir. *S. cerevisiae* maya suşları Frankfurt Üniversitesi Mikrobiyoloji Enstitüsü'ndeki EUROSCARF (European *S. cerevisiae* Archive for Functional Analysis) koleksiyonundan satın alındı.

3.2. Maya Suşlarının Üreme Koşulları ve Örneklem

Maya suşları öncelikle zengin üreme ortamı olan YPD (10 g/L Yeast extract, 20 g/L Bacto peptone ve 20 g/L agar) içeren petrilerde 30 °C'de 2-3 gün inkübe edildi. Uzun süreli kullanım için taze YPD besi yerlerinde üretilen maya suşları %20 gliserol içinde -80 °C'de daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere stoklandı. Ayrıca kısa dönem kullanımlar için YPD petrilerde 4 °C'de muhafaza edildi.

Yaban tip ve mutant maya hücreleri azot kaynağı olarak % 0,5 Amonyum sülfat içeren YNBD minimal üreme ortamında (%0,8 Yeast Nitrogen Base + %0,2 Histidine + %0,3 Leucine + %0,2 Methionine + %0,2 Urasil + %2 Dextrose) 16-18 saat sabit çalkalama (120 g/dak) ile 30 °C'de üretildi. Ön kültürlerden OD₆₀₀ değeri yaklaşık 0,2-0,3 olacak şekilde %0,5 Amonyum sülfat içeren taze YNBD sıvı besin ortamına aktarılan maya hücreleri sabit sıcaklık ve çalkalama ile OD₆₀₀ değeri yaklaşık 0,8-1,0 (10⁷ hücre) oluncaya kadar inkübe edildi. Daha sonra maya hücreleri çöktürülerek (6000 g/dak) steril distile su ile yıkandı. Elde edilen hücre pelleti total RNA izolasyonu için kullanıldı. Yaban tip ve mutant

maya suşları ikili set olarak üretildi ve her iki kültürden elde edilen hücreler transkriptomik analizlerde kullanıldı.

3.3. Total RNA İzolasyonu

RNA-Seq çalışmalarında izole edilen RNA'nın dizileme için kütüphane oluşturmaya yetecek kalitede olması gereklidir (Kukurba ve Montgomery, 2015) total RNA izolasyonu için mayalara özel Total RNA izolasyon kiti (İnvitrogen, RiboPure RNA Purification Yeast kit, katalog no: AM1926 katalog numaralı) kullanıldı.

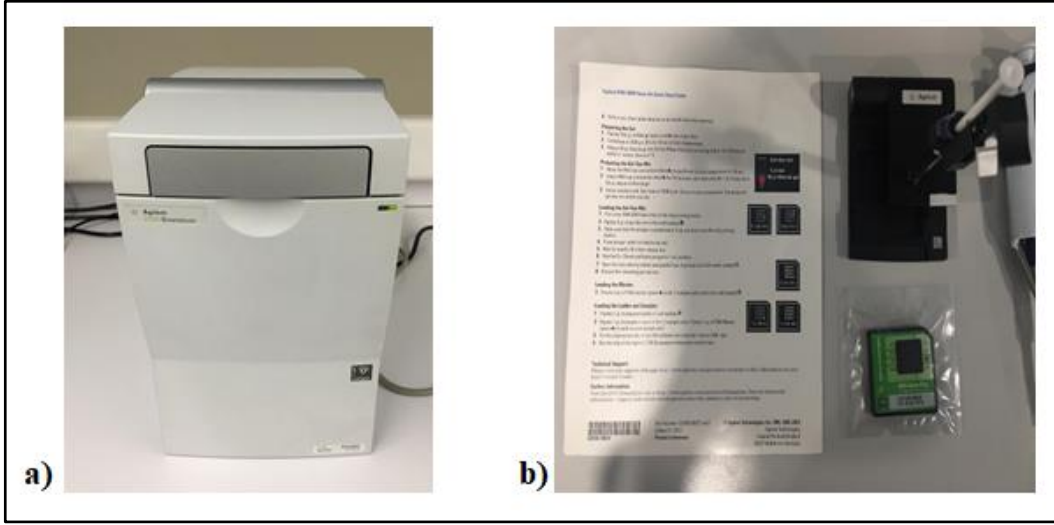
Daha önce hazırlanan hücre pelleti (yaklaşık 10^7 hücre) tekrar 12000g'de 2 dak santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Hücre pelleti üzerine 480 µl lysis solüsyonu, 48 µl %10 SDS, 480 µl fenol:kloroform:izoamilalkol eklendikten sonra hücreleri parçalamak için kit prosedüründe belirtilen 750 µl zirkonyum boncuk 1,5ml'lik mikrosantrifüj tüpüne eklendi. Hücre süspansiyonu içeren mikrosantrifüj tüpleri 10 dak vorteksledikten sonra hücre lizati 5 dak santrifüj (16100 g) edildi. Santrifüj işlemi sonrası tüp içerisinde oluşan üstteki şeffaf faz temiz bir falkon tüpe aktarıldı. Üzerine 1,9 ml bağlama solüsyonu (Binding Buffer) ve 1,25 ml %100 etil alkol eklendi. Oluşan karışım kit içinde bulunan kolonlara aktarıldı ve karışımın tamamı filtreden geçinceye kadar 1dak santrifüj (12,000 g) edilerek RNA'nın kolon içinde bulunan RNA bağlayıcı filtreler bağlanması sağlandı. Kolon içindeki filtrelerin üzerine 700 µl yıkama solüsyonu (Wash Solution 1) eklenerek tekrar 1dak santrifüj (12,000 g) edildi ve bu işlem filtrelerde RNA kalmaması için iki kez tekrarlandı. Filtreler kolonlardan alınarak yeni temiz tüplere geçirildi ve üzerine 50 µl elüsyon solüsyonu (Elution Solution) eklenerek filtreler bağlanan total RNA'nın filtrelerden ayrılması sağlandı. Total RNA üzerine DNase1 solüsyonu (DNase 1 Buffer) ve DNase1 (DNase I (8 U)) enzimi eklenerek 37 °C'de 30 dak bekletildikten sonra 5,9 µl DNase inaktivasyon solüsyonu (DNase Inactivation Reagent) eklenerek kalıntı DNA moleküllerinin degradasyonu sağlandı. Elde edilen total RNA daha sonraki işlemler için -20 °C'de muhafaza edildi.

Elde edilen total RNA'nın konsantrasyonu (Florometrik ölçümü) RNA'ya özgü Qubit® RNA HS Assay kiti (Thermofisher-İnvitrogen, Q32852) kullanılarak Qubit 3.0 Florometre (Thermofisher-İnvitrogen, Q33216) cihazında µg/µl olarak belirlendi.

3.4. RNA Kalitesinin Kalitatif ve Kantitatif Kontrolü

İzole edilen total RNA'ların kalitatif kontrolü agaroz jel elektroforezi ile belirlendi. Bu amaçla öncelikle stok 10X TBE (108 g/L Tris, 55 gr/L Borik Asit, 0,5M EDTA) tampon çözeltisi hazırlandı. 1,5 gr agaroz 100 ml 1X TBE tampon çözeltisi içinde çözüldü. Hazırlanan %1.5'lik agaroz karışımı üzerine 8 µl RedSafe nükleik asit boyama solüsyonu (İntron biotechnology, katalog no: 21141) eklenerek agaroz karışımı tamamen polimerleştikten sonra 1X TBE tampon çözeltisi içeren elektroforez tankına (Clever Scientific marka, CSL-CELLAS) geçirildi. 5 µl RNA örnekleri 1 ul yükleme boyasıyla (İntron biotechnology, katalog no: 21161) karıştırılarak jele yüklendi ve 45 dak (110 volt) (Wealtec, Elite 300 plus) yürütüldükten sonra UV görüntüleme sistemi kullanılarak (DNR, minibus pro model) fotoğrafları çekildi.

İzole edilen total RNA'ların kantitatif kontrolü ise Agilent Bioanalyzer cihazı kullanılarak ölçüldü (Şekil 13a). Agilent Bioanalyzer cihazı RNA'nın kalitesini 1 ila 10 arasında RIN (RNA Integrity Number) değeri vererek ölçen bir cihazdır. RIN, jel elektroforezi ve 28S ile 18S ribozomal bant oranlarının analizini kullanarak örnek bütünlüğü (bozunma durumu) hakkında bilgi vermektedir. RIN:10 değeri en az bozunmayı ve en yüksek kalitedeki örnekleri göstermektedir. Düşük kaliteli RNA (RIN <6), dizileme sonuçlarını önemli ölçüde etkilemekte (örneğin, düzensiz gen kapsamı, 3'-5' transkript sapması, vb.) ve hatalı transkriptomik sonucuna yol açmaktadır. Bu nedenle, RNA-Seq deneyleri için yüksek kaliteli RNA gerekmektedir (Tomita vd 2004; Thompson vd 2007; Rudloff vd 2010). İzole edilen total RNA'ların RIN değerleri SEM biyoteknoloji firması tarafından RNA 6000 Nano Lab Chip Kiti (5067-1511) (Şekil 13b) kullanılarak Agilent 2100 Bioanalyzer cihazında (Şekil 13a) belirlendi. Daha sonra elde edilen total RNA dan kodlanan RNA'yı ayırabilmek için poly(A) tekniği kullanılarak mRNA izolasyonları yapıldı.



Şekil 13. Agilent 2100 Bioanalyzer cihazı (a) RNA 6000 Nano Lab Chip (b)

3.5. poly(A) Yöntemi ile mRNA Eldesi

İzole edilen total RNA'dan mRNA'yı ayırmak için Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit (Thermofisher, Ambion, katalog no: 61021) kullanıldı. Bu amaçla kitin protokolünde belirtilen oligo dT (Dynabeads® Oligo (dT)25) homojen hale getirildikten sonra 22 µl ependorf tüpe geçirilerek süspansiyon şeffaflaşmaya kadar beklendikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Manyetik standdan alınan tüpün içindeki boncukların üzerine 20 µl çözücü- bağlayıcı (Lysis/Binding Buffer) solüsyon eklendi ve pipetaj yapılarak homojen hale getirildi. Kit protokolünde belirtildiği gibi final hacmi 50 µl olacak (100ng-1 µg) şekilde RNA örneği hazırlandı. Örneklerimizden en düşük konsantrasyona sahip örnek baz alınarak tüm örnekler 320 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı. Elde edilen RNA 70 °C'de 2 dak PZR cihazında (Veriti™ Thermal Cycler, A27924) denatüre edildikten sonra hazırlanmış olduğumuz 50 µl çözücü bağlayıcı solüsyon (Lysis/Binding Buffer) ve manyetik boncuk (oligo dT) karışımı ile birleştirildi. Pipetaj ile homojen hale getirilen karışım 5 dak oda sıcaklığında inkübe edilerek oligo dT'lerin poly(A) kuyruklu mRNA'lara bağlanması sağlandı. Karışımı içeren tüpler manyetik stand üzerine alındı, solüsyon şeffaflaşana kadar (5dak) beklendikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Manyetik boncuk içeren tüpler manyetik stand üzerinden alındı ve üzerlerine 100 µl yıkama solüsyonu A (Washing Buffer A) eklendi. Pipetaj yapılarak homojen hale getirilen karışım tekrar manyetik stand üzerine alınarak solüsyonun şeffaflaşması beklendikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Manyetik

boncuk içeren tüpler tekrar manyetik stand üzerinden alındı ve üzerlerine 100 µl yıkama solüsyonu B (Washing Buffer B) eklendi. Pipetaj yapılarak homojen hale getirilen karışım tekrar manyetik stand üzerine alınarak solüsyonun şeffaflaşması beklendikten sonra süpernatant pellete zarar vermeden uzaklaştırıldı. Daha sonra manyetik stand üzerinden alınan tüplere 80 °C’de ısıtılmış 10 µl nukleaz içermeyen su eklenerek poly(A) mRNA’ların boncuklardan ayrılması sağlandı. Tüpler tekrar manyetik stand üzerine alınarak karışım şeffaflaştıktan sonra süpernatant yeni steril tüplere alındı. Süpernatant ile ayrılmasını sağladığımız poly(A) mRNA’nın florometrik ölçümleri Qubit cihazında yapıldıktan sonra kütüphane oluşturma basamağına geçildi.

3.5.1. RNA’nın Fragmente Edilmesi ve Temizlenmesi

Kütüphane oluşturma işlemi, Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Thermo Fisher Scientific, İon Torrent, 4475936) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu işlem için 10 µl poly(A) RNA 200 µl’lik PZR tüpüne alındı. Üzerine kitin içeriğinde bulunan Rnase III enziminden 1 µl, 10X Rnase III reaksiyon tamponundan 1 µl eklendikten sonra pipetaj yapılarak karışım homojen hale getirildi. Daha sonra örnekler PZR cihazında 37 °C’de 3 dak süre ile inkübasyona bırakılarak fragmente edildi ve bu süre sonunda tüplere hızlı bir şekilde 20 µl nukleaz içermeyen su eklenerek buz üzerine alındı.

Fragmente edilen RNA’nın manyetik boncuk yöntemi kullanılarak temizlenmesi için kit içeriğinde bulunan nükleik asit bağlama boncukları (Nucleic Acid Binding Beads) homojen oluncaya kadar vortekslendi ve 5 µl’si kitin içinden çıkan Processing Plate’e aktarıldı. Aktarılan Nucleic Acid Binding Beads üzerine 90 µl binding solution concentrate eklendikten sonra homojen hale getirildi. Daha sonra karışımın üzerine fragmente edilen 30 µl RNA ve 150 µl %100’lük etanol eklendi. Elde edilen karışımın homojen hale gelmesi sağlandıktan sonra 5 dak oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra plate manyetik stand (ThermoFisher –Ambion, AM10050) üzerine alındı. 5-6 dak boncukların solüsyondan ayrışması beklendi. Süre sonunda manyetik boncuklara dokunmadan süpernatant atıldı. Pelletin üzerine 150 µl %100 etanol eklendi, 30 sn oda sıcaklığında manyetik stand üzerinde beklendikten sonra süpernatant pellete zarar vermeden uzaklaştırıldı. Manyetik boncuklar tamamen kurduktan sonra önceden 37 °C’de önceden ısıtılmış 12 µl nukleaz içermeyen su

eklendi. Boncuklar ve su homojen hale getirilerek oda sıcaklığında 1 dak inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda plate manyetik stand üzerine alınarak boncuklar ve sıvının ayrışması için 1 dak beklendi. Her örnek yeni bir tüpe alındı. Fragmente edilip temizlenen ürünlerin boyutlarının ve kalitesinin kontrolünü sağlamak amacıyla Qubit ve Bioanalyzer cihazları ile ölçümleri yapıldı.

Elde edilen total fragmente RNA'nın konsantrasyonu Qubit® RNA HS Assay kiti kullanılarak Qubit 3.0 Florometre cihazında $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak belirlendi. Fragmente RNA'ların ürün boyutlarının belirlenmesi için SEM biyoteknoloji firmasında RNA 6000 Pico Kiti (5067-1513) kullanılarak Agilent™ 2100 Bioanalyzer cihazında ölçümleri yapıldı.

3.5.2. Kütüphane Oluşturulması

Adaptör ve barkodların bağlanması için boyut ve kalitesinin uygunluğu belirlenen örneklere 2 μl İon adapter mix v2 ve 3 μl hybridizasyon solution bir tüpte karıştırıldıktan sonra 3 μl fragmente edilmiş (poly(A))RNA eklendi. Karışım 65 °C'de 10 dak sonrasında 30 °C'de 5 dak inkübe edildi. 8 μl 'lik hybridizasyon reaktifinin üzerine 10 μl 2X Ligation buffer ve ligation enzim miksi eklendi. Son hacmi 20 μl olan karışım 30 °C'de 30 dak inkübe edildi.

Ligasyon işlemi tamamlanan örnek tüplerinin üzerine 2 μl nükleaz içermeyen su, 4 μl 10X RT buffer, 2 μl 2.5 mM dNTP mix ve 8 μl RT primer v2 (toplamda 16 μl) eklendi ve pipetaj ile homojen hale getirildi. 10 dak 70 °C'de inkübe edildikten sonra buz üzerine alındı. Üzerine 4 μl 10X SuperScript III eklenip vortekslendikten sonra kısa süreli santrifüj yapıldı. PZR cihazında 42 °C'de 30 dak inkübasyona bırakıldı.

cDNA çevrimi yapılan ürünleri temizlemek için kit içeriğinde bulunan Nucleic Acid Binding Bead tüpü homojen oluncaya kadar vortekslendi. 5 μl Nucleic Acid Binding Bead Processing plate üzerine aktarıldıktan sonra üzerine 120 μl Binding Solution Concentrate eklendi. Son hacmi 40 μl olan cDNA üzerine 60 μl nükleaz içermeyen su eklendikten sonra karışımla birleştirildi ve üzerine 125 μl %100'lük etanol eklendi. Karışımın homojen hale

gelmesi sağlandıktan sonra 5 dak oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra plate manyetik stand üzerine alınarak 5-6 dak boncukların solüsyondan ayrışması beklendi. Süre sonunda manyetik boncuklara dokunmadan süpernatant atıldı. Manyetik stand üzerinden alına plate üzerine 150 µl Wash solution eklendi, 30 sn oda sıcaklığında manyetik stand üzerinde beklendikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Manyetik boncuklar tamamen kuruduktan sonra önceden 37 °C’de ısıtılmış 12 µl nükleaz içermeyen su eklendi. Boncuklar ve suyun homojen hale gelmesi için pipetaj yapıldı ve oda sıcaklığında 1 dak inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda plate manyetik stand üzerine alındı ve boncuklar ve sıvının ayrışması için 1 dak beklenerek her örnek yeni bir tüpe geçirildi.

cDNA’nın çoğaltılması için bir PZR tüpüne 45 µl Platinum PCR Super Mix High Fidelity, 1 µl İon Xpress RNA 3'Barcode Primer, 1 µl Ion Xpress RNA-Seq Barcode BC (Thermo Fisher, Ion Torrent™ Ion Xpress™ RNA-Seq Barcode 1-16 Kit,4475485) ve 6 µl cDNA eklendi. PZR cihazında 94 °C’de 2 dak, 94 °C’de 30 sn, [50 °C’de 30 sn, 68 °C’de 30 sn] 2 döngü, [94 °C’de 30 sn, 62 °C’de 30 sn, 68 °C’de 30 sn] 14 döngü, 68 °C’de 5 dak amplifikasyon reaksiyonu gerçekleştirildi.

Amplifiye edilen cDNA’nın pürifikasyonu için Nucleic Acid Binding Bead tüpü iyice homojen oluncaya kadar vortekslendi. 5 µl Nucleic Acid Binding Bead Processing plate üzerine aktarıldı. Aktarılan beadlerin üzerine 180 µl Binding Solution Concentrate eklendi ve pipetaj yapılarak homojen hale getirildi. Son hacmi 53 µl olan cDNA karışımının üzerine eklenerek üzerine 130 µl %100’lük etanol ilave edildi. Karışım homojen hale getirilerek 5 dak oda sıcaklığında inkübe edildi. Plate manyetik stand üzerine alınarak 5-6 dak boncukların solüsyondan ayrışması beklendi. Süre sonunda manyetik boncuklara zarar vermeden süpernatant atıldı. Manyetik stand üzerinden alınan plate üzerine 150 µl Wash solution eklenerek tekrar manyetik stand üzerinde oda sıcaklığında 30 sn beklendi ve süpernatant pellete zarar vermeden uzaklaştırıldı. Manyetik boncuklar tamamen kuruduktan sonra 15 µl nükleaz içermeyen su eklendi. Boncuklar ve suyun homojen hale gelmesi sağlanarak oda sıcaklığında 1 dak inkübe edildi. Süre sonunda plate manyetik stand üzerine alınarak boncuklar ve sıvının ayrışması için tekrar 1 dak beklendi. Her örnek yeni bir tüpe aktarıldı.

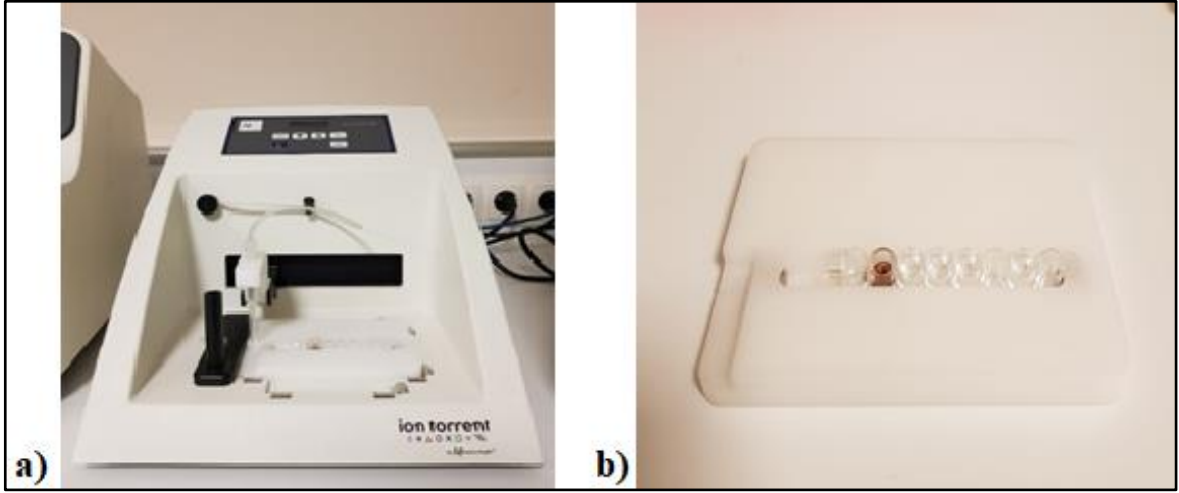
cDNA'nın Konsantrasyon Ölçümü Qubit® dsDNA HS Assay kiti (Q32854 katalog numaralı) kullanılarak Qubit 3.0 Florometre cihazında belirlendi. Total DNA konsantrasyonu $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak belirlendi. cDNA ürün boyutlarının belirlenmesi için SEM biyoteknoloji firmasında High Sensitivity DNA Kiti kullanılarak Agilent 2100 Bioanalyzer cihazında ölçümleri yaptırıldı.

3.5.3. Emülsiyon PZR (emPZR) ile Klonal Çoğaltım ve ürünün zenginleştirilmesi

Emülsiyon PCR yağ kürecikleri içerisinde bulunan boncuklara (mikroreaktör) bağlanan DNA parçalarının klonal olarak çoğalmasına olanak veren bir işlemdir. emPZR ile klonal çoğaltım için Ion One Touch System (Thermofisher- İontorrent Ion OneTouch 2, 4474778) ve ürünün zenginleştirilmesi için Ion One Touch Enrichment System (Thermofisher- İontorrent, Ion OneTouch 2 System, 4474779) cihazı kullanıldı (Şekil 14 ve Şekil 15a,b). Ion 540 Kit – OT2 (Thermofisher- İontorrent, A27753) kiti üreticinin önerdiği koşullarda ve yöntemle uygulanarak emPZR ve zenginleştirme işlemleri gerçekleştirildi. Ion One Touch Enrichment System cihazının sarf malzemeleri üreticinin önerdiği gibi tamamlandıktan sonra cihaz çalıştırılmıştır.



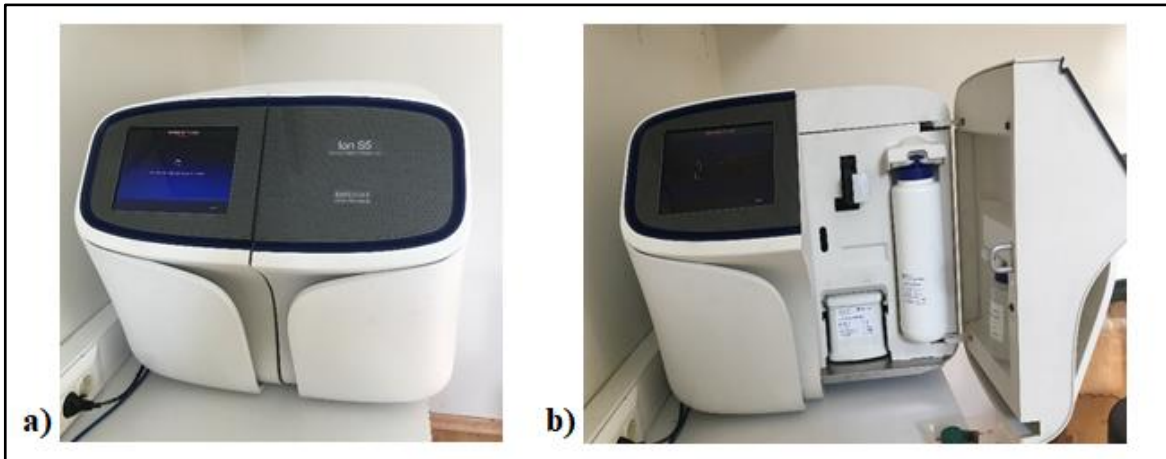
Şekil 14. Ion One Touch System; OT2 cihazı



Şekil 15. Ion One Touch System - Enrichment System (a), 8-well strip gerçek görünümü (b)

3.5.4. Dizileme

Dizileme işlemi için Thermo Fisher Scientific'in Ion S5 XL (Thermo- Ion torrent, A27214) Yeni Nesil Dizileme cihazı kullanıldı (Şekil 16a,b). Öncelikle Thermo Fisher Scientific'in Ion S5 cihazının ara yüzü olan Torrent server yazılımında çalışmanın planı yapıldı.

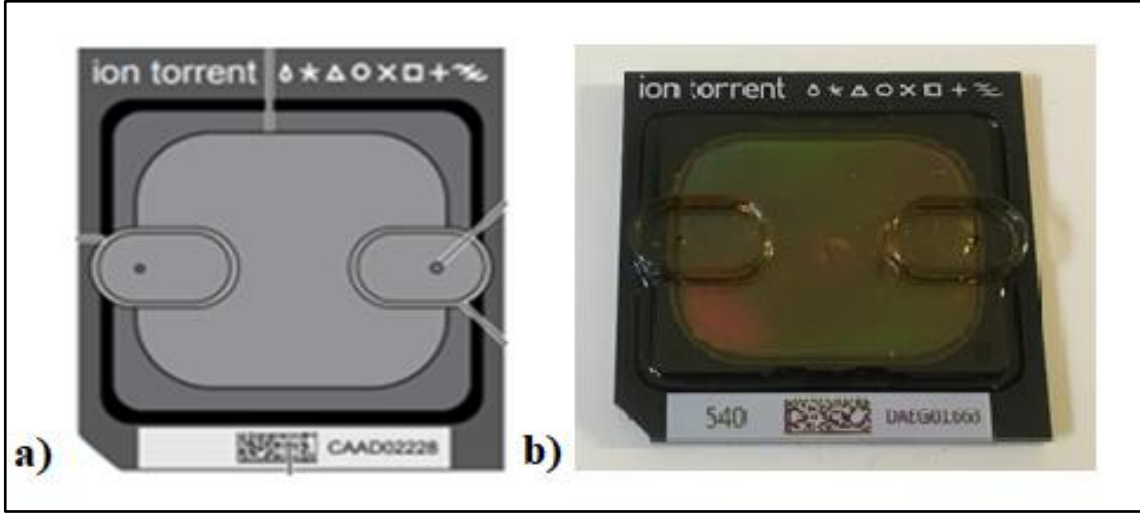


Şekil 16. Ion S5 XL dizileme cihazı (a), Ion S5 XL dizileme cihazı reaktiflerin yerleşimi (b)

Enrichment reaksiyonu sonrasında cihazdan aldığımız 0.2 ml 'lik PZR tüpü içerisinde bulunan ürün 15,500x g'de 5 dak santrifüj edildi. Tüpün dibinde yaklaşık 10 µl

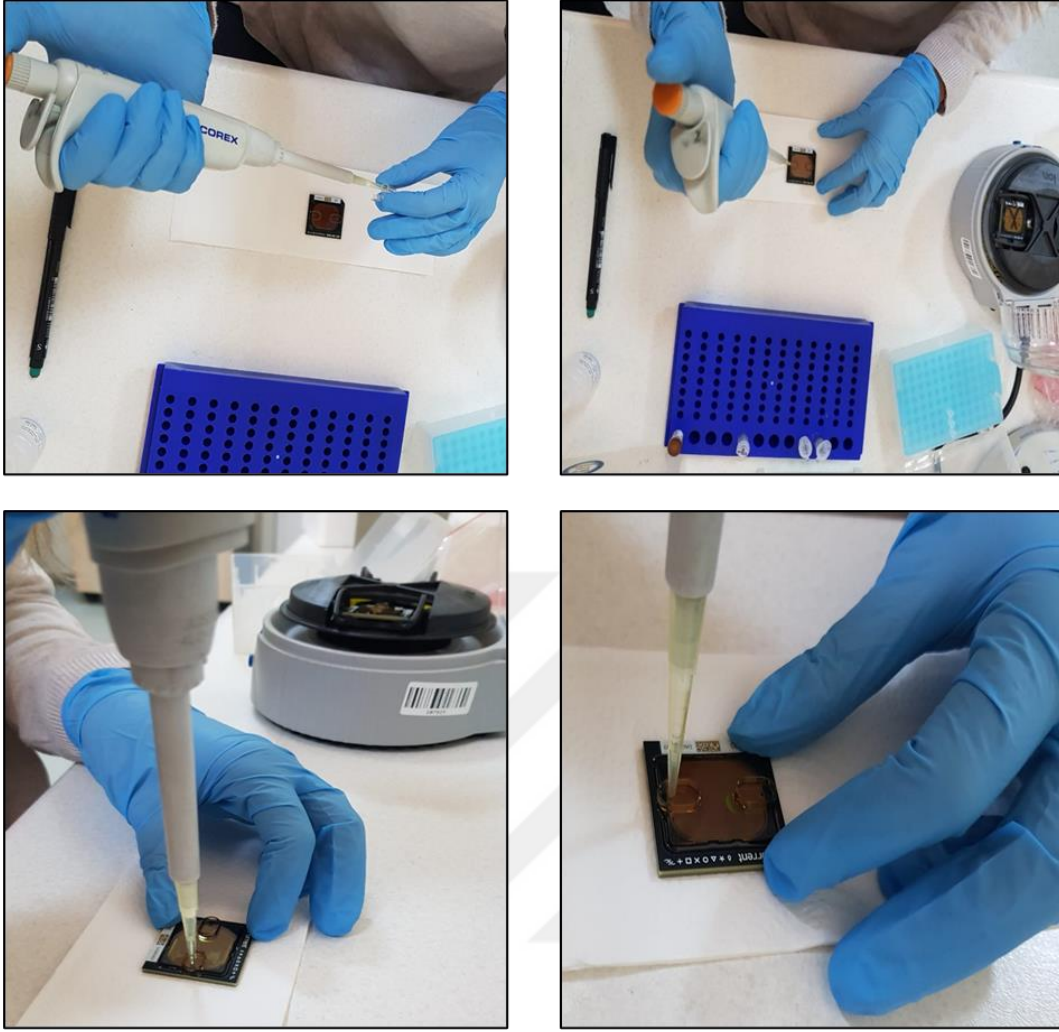
ürün kalıncaya kadar süpernatant pellete zarar vermeden uzaklaştırıldı ve 200 µl nükleaz içermeyen su eklendi. Karışım 15,500x g 'de 5 dak santrifüj edildi. Tüpün dibinde yaklaşık 10 µl ürün kalıncaya kadar süpernatant pellete zarar vermeden uzaklaştırıldı ve son hacim 100 µl olacak şekilde nükleaz içermeyen su eklendi. Elde edilen ürün çipe yüklenmek üzere 2-8 °C'de saklandı.

Dizileme reaksiyonunu başlatmak için ilk olarak Ion 540 Kit-OT2 (ThermoFisher-Ion Torrent, A27753) Ion 540 Chip Kit (ThermoFisher-Ion Torrent, A27765) kullanıldı (Şekil 17a-b). (Ion 540 Kit-OT2) içeriğinde -20 °C'de bulunan Ion S5 Sequencing Reagents cartridge 45 dak oda sıcaklığında çözülmeye bırakıldı. Süre sonunda Ion S5 Sequencing Reagents cartridge, Ion S5 Sequencing Reagents ve Ion S5™ Cleaning Solution şişesi cihazdaki yuvalarına yerleştirildi. Cihazın pH ayarlama işlemi başlatıldı. Yaklaşık 50 dak süren ayarlama işlemin ardından pH grafiği kontrol edildi. pH ayarlama işleminin ardından örneğin üzerine kit içeriğinde bulunan Control Ion Sphere Particles'tan 5 µl eklenerek 5 dak 15,500xg'de santrifüj yapıldı. Tüpün dibinde yaklaşık 10 µl ürün kalıncaya kadar süpernatant pellete zarar vermeden uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 15 µl of Ion S5 Annealing Buffer ve 20 µl Ion S5 Sequencing Primer eklendi. Elde edilen karışım vorteks yapıp ardından kısa santrifüj yapılan örnek PZR cihazında 95 °C'de 2 dak ve 37 °C'de 2 dak inkübe edildi. İnkübe edilen karışımın üzerine 10 µl Ion S5 Loading Buffer eklendi, vorteks ve ardından kısa santrifüj yapıldı. Temiz ve düz bir zemine alınan Ion 540 Chip'in loading well kısmına son hacmi 55 µl olan örnek aktarıldı ve Ion Chip Minifuge (ThermoFisher-Iontorrent, 4479673) cihazına yerleştirilip 10 dak santrifüj edildi.



Şekil 17. Ion 540 Chip şekilsel görünümü (a), Ion 540 Chip görüntüsü (b)

1.5-ml'lik ependorf içinde 49 μ l %50 Annealing Buffer ve 1 μ l Foaming Solution (%10 Triton X-100 solution) birleştirilip pipet yardımıyla köpürtüldü. Santrifüjden alınan çipin loading port kısmından köpürtmüş olduğumuz foaming solutions'dan 100 μ l yükleme yapıldı. 55 μ l %50 Annealing buffer chip loading well bölgesine aktarıldıktan sonra çip Ion Chip Minifuge cihazında 30 sn santrifüj yapıldı. Tekrar santrifüjden alınan çipin loading port kısmından köpürtmüş olduğumuz foaming solutions'dan 100 μ l yükleme yapıldı. 55 μ l %50 Annealing buffer chip loading well bölgesine aktarıldıktan sonra çip Ion Chip Minifuge cihazında 30 sn santrifüj yapıldı. İki kere tekrarlanan bu işlemin ardından 2 kere 100'er μ l Flushing solution (%50 Propanol+ %50 annealing buffer) çipin loading port kısmından yüklendi. Daha sonra 3 kere 100 μ l %50 Annealing Buffer toplamda 300 μ l olacak şekilde loading port kısmından yüklendi. 6 μ l Ion S5 Sequencing Polymerase 60 μ l %50 Annealing buffer ile karıştırılarak chip loading port kısmından yüklendi. 5 dak oda sıcaklığında inkübe edilen çip cihaza yüklendi. Çip yükleme aşamaları Şekil 18 'de verilmiştir. İşlemler sonunda ham veriler torrent suite software programından elde edildi.



Şekil 18. Çip yükleme aşamaları

3.5.5. Yeni Nesil RNA Dizileme Verisi Üretimi ve İşlenmesi

Dizileme işlemi tamamlandıktan sonra, her bir kütüphaneye ait sonuçlar UBAM (unmapped BAM) dosyası olarak oluşturuldu. Dizileme sonrası oluşan okumalardan, adaptör bölgeleri İontorrent cihazının özelliği gereği kırılmış olarak elde edildi. Düşük kaliteli okumalar atılarak okuma derinliği 0, minimum okuma uzunluğu 20 bç, minimum örtüşme uzunluğu 40 bç ve asgari örtüşme yüzdesi ise %90 olacak şekilde, ayrı ayrı birleştirildi.

3.5.6. Biyoinformatik Analizler ve Araçlar

Kalite Kontrol (Quality Control) ve Temizleme (Trimming)

RNA-dizileme analizlerinin yapılabilmesi için öncelikle “.fastq” dosyalarının kalite kontrollerinin yapılması gerekmektedir. FastQC programı bu amaçla kullanılan bir program olup, okuma sonuçlarında herhangi bir sorun olup olmadığını anlamamıza olanak sağlamaktadır. FastQC kalite kontrol programında elde edilen Phred Score değerlerine göre okuma sonuçlarının doğrulukları belirlenmektedir. Tablo 3’de FastQC programında yer alan puan değerleri gösterilmiştir (Andrews, 2014).

Ion torrent cihazından elde edilen “.ubam” dosyaları, çevrim içi bir program olan “usegalaxy” platformu aracılığıyla “.fastq” formatına dönüştürüldü. Daha sonra “.fastq” dosyalarının okuma kalitelerinin belirlenmesi için FastQC High Throughput Sequece QC Report (v0.11.9) programı kullanılarak analizi yapıldı ve RNA-dizileme sonuçlarına ait Phred Score değerleri belirlendi.

Tablo 3

FastQC program algoritmalarında yer alan puan değerleri

Phred Kalite Puanı	Yanlış Baz Arama olasılığı	Baz Arama Doğruluğu
10	10'da 1	% 90
20	100'de 1	% 99
30	1000'de 1	% 99.9
40	10.000'de 1	% 99,99

RNA-dizileme sonucunda elde edilen “.fastq” dosyalarının kalite kontrol değerlerine göre, düşük kalite puanına sahip olan okumaları ayrıştırıldı. Düşük kaliteli okumaların ayrıştırılması için Galaxy platformu üzerine yer alan Trimmomatic (Galaxy version 0.38.0) programı kullanıldı ve kalite puanı 20'nin altında kalan okumalar varsayılan parametrelere

göre ayrıştırıldı (Bolger vd., 2014). Ayrıca, Ion-Torrent dizilerine ait oligo dizileri tespit edilerek baz trim işlemine tabi tutuldu.

Haritalama (Mapping)

RNA-dizileme sonuçlarına göre elde edilen okuma sayılarını belirlemek için öncelikle RNA sekans dizilerinin haritalanması gerekmektedir. Bu amaçla, “.fastq” dosyaları TopHat2 programı, RNA-dizileme okumalarının haritalanması amacıyla kullanılmakta ve Bowtie ve Bowtie2 algoritmalarını kullanarak referans genom üzerinden haritalama yapmaktadır (Kim vd., 2013). Düşük okuma kalitesine sahip olan RNA okumaları temizlendikten sonra elde edilen “.fastq” dosyaları *S. cerevisiae* (S288C) referans genomu (.gtf formatında) kullanılarak haritalandı. *S. cerevisiae* (S288C) referans genomuna ait dizi “Ensembl Genomes” veri tabanından temin edildi. Genom haritalama işlemi için TopHat2 haritalama programı varsayılan parametreler kullanılarak gerçekleştirildi ve haritalama işlemi ardından elde edilen “.bam” dosyaları bilgisayar ortamına kaydedildi.

Transkript Sayılarının Belirlenmesi

Transkriptom analizlerinin yapılabilmesi için RNA-dizileme çalışmasından elde edilen transkript sayılarının belirlenmesi gerekmektedir. HTSeq (High-Throughput Sequencing) yeni nesil dizileme çalışmalarından elde edilen verilerin hızlı bir şekilde analiz edilebilmesine olanak sağlayan Python alt yapısında yer alan bir kütüphanedir (Anders vd., 2015). RNA-dizileme verilerinin referans genom ile yapılan haritalama işleminin ardından elde edilen veriler HTSeq-counts programında varsayılan parametreler kullanılarak analiz edildi ve transkript sayıları belirlendi.

Filtreleme ve Normalizasyon

RNA-dizileme sonucunda elde edilen okumaların hizalama ve transkript sayımı gerçekleştirildikten sonra çok az ifade olan ya da hiç ifade olmayan genleri barındıran veri setleri elde edilmektedir. Bu nedenle devam eden analizlerde sonuçları etkilememesi için

veri setleri filtreleme ve normalizasyon işlemine tabi tutulması gerekmektedir. Normalizasyon işlemi, RNA-dizileme verilerinin doğru bir şekilde yorumlanmasına olanak sağlayan bir yöntemdir. Elde edilen ham veriler normalize edilerek CPM (Counts Per million reads Mapped) dağılımları belirlendi. Devam eden analizlerde normalize edilmiş veriler kullanıldı. RNA-dizileme sonuçlarına ait verilerinin filtreleme ve normalizasyon işlemi için R:edgeR aracı kullanıldı. R:edgeR aracı, RNA-dizileme sonucu elde edilen transkript sayıları kullanılarak RNA molekülündeki farklılıkların ölçülmesi için kullanılan istatistiksel bir yöntemdir (Robinson vd., 2010).

3.5.7. Analiz Yöntemleri

Kümeleme

RNA-dizileme verileri arasındaki gen ekspresyon analizi açısından profil benzerliklerinin kontrol edilmesi için çok boyutlu ölçekleme (Multidimensional scaling, MDS) grafiği oluşturuldu. MDS grafiği, RNA-dizileme veri setleri arasındaki benzerlik ve farklılıkların anlaşılmasına olanak sağlamaktadır. Elde edilen ön bilgiler veri setlerinin ekspresyon seviyeleri hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca çalışmada kullanılan veri setleri arasında ekspresyon farklılığı gösteren genler için “Heatmap” grafiği oluşturuldu.

Diferansiyel Ekspresyon Analizi

Normalize edilmiş olan transkript sayısı kullanılarak deney grupları arasındaki ekspresyon seviyelerinde gözlemlenen kantitatif değişiklikleri belirlemek için diferansiyel ekspresyon analizi kullanılmaktadır. Gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan R::limma aracı, gen ekspresyon çalışmalarından elde edilen veri setlerini istatistiksel olarak analiz etmek için kullanılan R/Bioconductor programıdır (Ritchie vd 2015). Normalize edilen transkript sayılarına ait veri setleri kullanılarak, yaban tip ve mutant maya suşları arasındaki gen ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren genler (Differentially Expressed Genes) R::limma aracı yardımıyla tespit edildi, ayrıca LogFC, LogCPM ve p-value değerleri hesaplandı.

Gen Ontoloji Analizi

Gen ontolojisi, genlerin işlevini üç farklı yönden açıklamak için kullanılan biyolojik bir terimdir. RNA-dizileme veri setinde yer alan gen ürünlerinin moleküler işlevleri için moleküler fonksiyon (Molecular Function, MF), gen ürününü işlevini gerçekleştirdiği hücresel kısımlar (Cellular Component, CC) ve hücresel bileşen, çoklu moleküler aktivitelerinden oluşan büyük süreçler için biyolojik süreç (Biological Process, BP) şeklinde gruplandırılır. Yaban tip ve mutant (*Δtor1*) maya suşlarına ait gen ürünlerinin gen ontoloji analizi R::clusterProfiler paketi (R, açık kaynak kodlu programlama aracı) ve Shiny GO 76.3 kullanılarak gerçekleştirildi (Ihaka ve Gentleman, 1996; Yu vd., 2012; Ge vd., 2020)

Yolak Analizi

RNA-dizileme çalışmalarında deney ve kontrol grupları arasındaki gen ekspresyon seviyelerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık olup olmadığını incelemek için yolak (pathway) analizi kullanılmaktadır. Bu sayede moleküler bir yolak üzerinde yer alan genlerin ekspresyonlarındaki değişimler araştırılabilir ve biyolojik grupların fenotipik olarak farklı olmalarının nedenleri araştırılabilir. Bu amaçla, yaban tip ve mutant (*Δtor1*) maya suşlarının diferansiyel ekspresyon analiz sonuçları R::gage program paketi kullanılarak yolak analizi gerçekleştirildi. Bu analiz programı GAGE (Generally Applicable Gene-set Enrichment Analysis) farklı örnek büyüklüklerine ve farklı deneysel çalışmalarda uygulanabilen bir Gen-Set analiz programıdır (Luo vd., 2009). Yolak analizi için KEGG (KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) yolak veri tabanında (www.kegg.jp) yer alan *S. cerevisiae* S288C maya suşuna ait veri seti kullanılmıştır.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

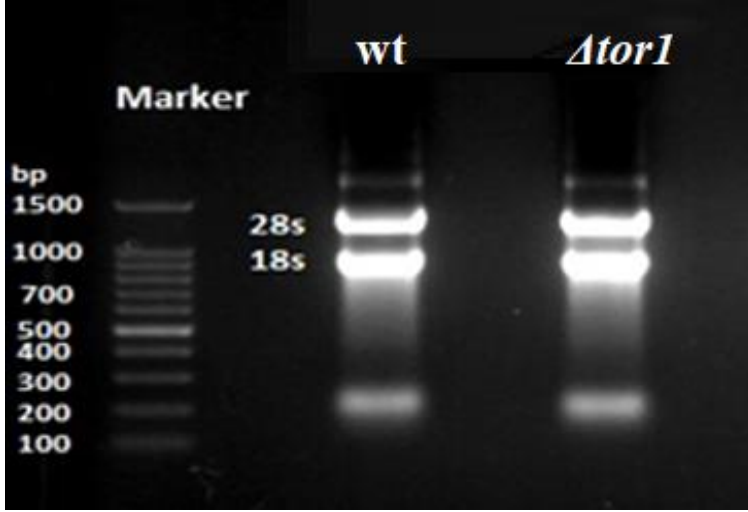
ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Total RNA ve mRNA Örneklerinin Konsantrasyonu ve Kalitesi

4.1.1. Total RNA Örneklerinin Konsantrasyonu ve Kalitesi

S. cerevisiae maya hücrelerinden total RNA izolasyonu yapmak için öncelikle yaban tip (BY4741) ve *Ator1* mutant (Y06864) maya suşları minimal üreme ortamında 30 °C sıcaklıkta ve 120 g çalkalama ile logaritmik aşamaya kadar üretildi. Her maya suşundan iki ayrı kültür hazırlanarak üretildiğinden çalışmada analiz edilen örnekler iki ayrı kültürden gelen örnekleri (yaban tip için wt1 ve wt2, *Ator1* için *Ator1-1* ve *Ator1-2*) temsil etmektedir. Logaritmik aşamada maya kültürleri steril distile su ile yıkandıktan sonra total RNA izolasyonu için kullanıldı. Maya suşlarından RNA izolasyon Total RNA izolasyon kiti kullanılarak yapıldı. İzole edilen total RNA'ların kalitatif kontrolü agaroz jel elektroforezi ile belirlenerek elde edilen sonuç Şekil 19'da verildi.

Elde edilen total RNA'nın konsantrasyonu Qubit 3.0 Florometre cihazında ve Agilent Bioanalyzer cihazında belirlendi (Tablo 4). Yaban tip maya hücrelerinden izole edilen total RNA'nın konsantrasyonu Qubit 3.0 Florometre cihazında wt-1 için 1080 ng/μl ve wt-2 için 796 ng/μl olarak belirlendi. *Ator1* mutant maya hücrelerinden izole edilen total RNA'nın Qubit 3.0 Florometre cihazında ölçülen miktarı ise *Ator1-1* için 1020 ng/μl ve *Ator1-2* için 758 ng/μl olarak belirlendi. Agilent Bioanalyzer cihazında belirlenen total RNA miktarları ise wt-1 için 654 ng/μl, wt-2 için 619 ng/μl, *Ator1-1* için 769 ng/μl ve *Ator1-2* için 530 ng/μl olarak ölçüldü (Tablo 4).



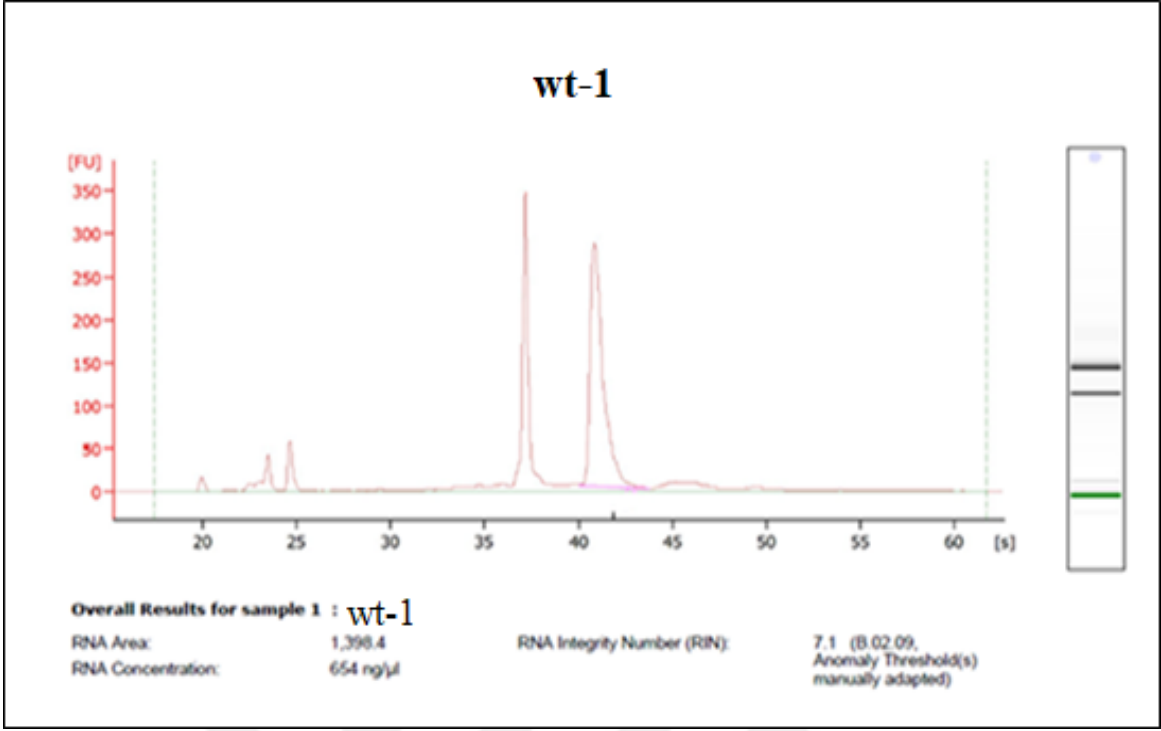
Şekil 19. İzole edilen total RNA örneklerinin kalitatif kontrolü

İzole edilen total RNA'ların kalitesinin belirlenmesi RNA-Seq analizlerinin başarılı olması için gereklidir. Total RNA'ların kalitesi RIN (RNA Integrity Number) değerine göre belirlenir. İzole edilen total RNA'ların kalitesi Agilent Bioanalyzer cihazı kullanılarak belirlendi. Bu cihazda sunulan RIN değer aralığı 1 ile 10 arasında olup RIN:10 değeri en az bozunmayı ve en yüksek kalitedeki RNA örneklerini, RIN <6 değerler ise düşük kaliteli RNA örneklerini temsil etmektedir. Agilent Bioanalyzer cihazında ölçülen RIN değerlerini gösteren elektroferogram görüntüleri wt-1 için Şekil 20'de, wt-2 için Şekil 21'te, *Δtor1-1* için Şekil 22'de ve *Δtor1-2* için Şekil 23'te verildi. Elde edilen sonuçlara göre izole edilen total RNA'ların RIN değeri wt-1 için 7,1 olarak, wt-2 için 7,3 olarak, *Δtor1-1* için 7,3 olarak ve *Δtor1-2* için 7,2 olarak belirlendi (Tablo 4).

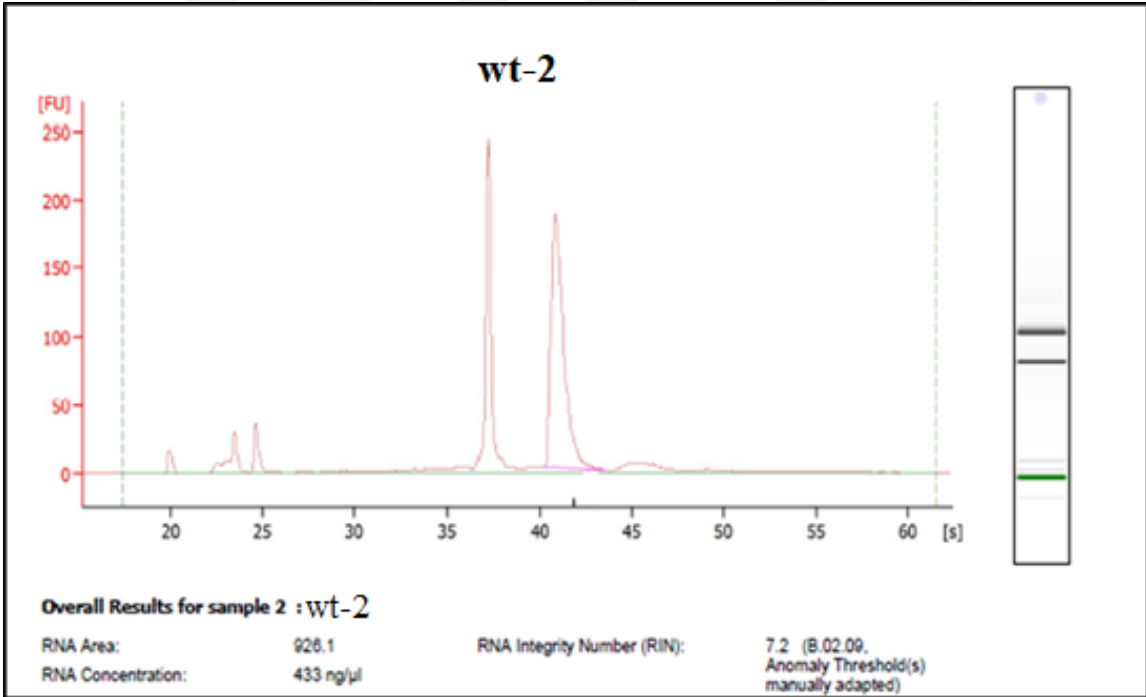
Tablo 4

İzole edilen total RNA örneklerinin miktarı ve kalitesi

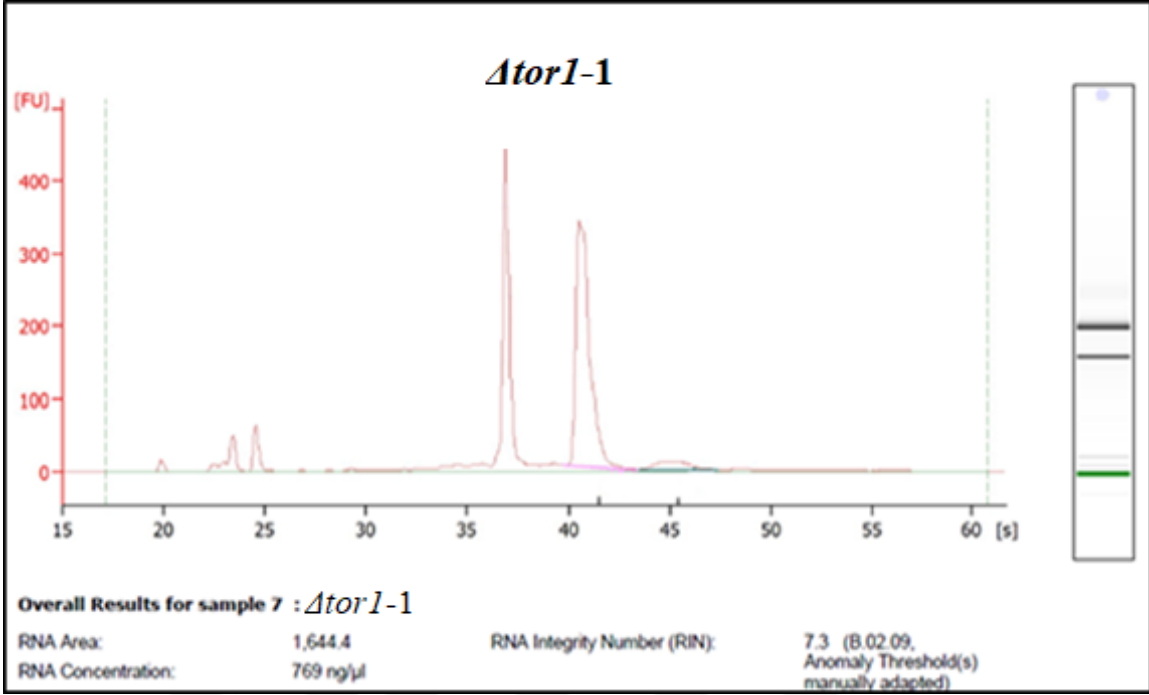
Ölçüm Yöntemi	wt-1	wt-2	<i>Δtor1-1</i>	<i>Δtor1-2</i>
Qubit konsantrasyonu (ng/μl)	1080	796	1020	758
Agilent Bioanalyzer konsantrasyonu (ng/μl)	654	619	769	530
Agilent Bioanalyzer sonuçları (RIN)	7,10	7,30	7,30	7,20



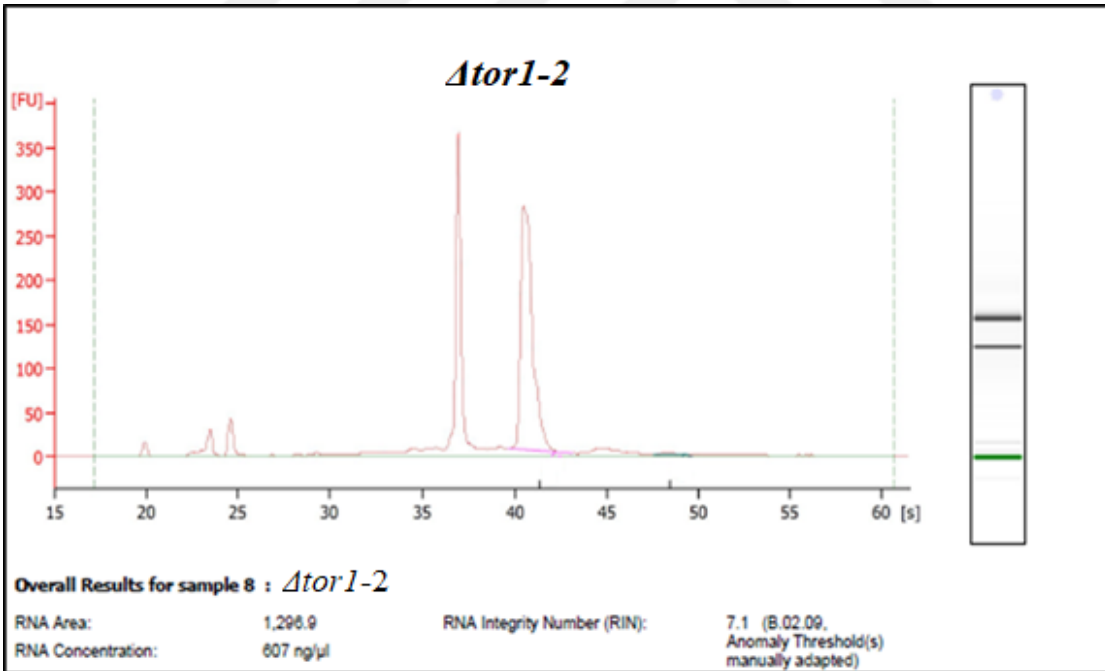
Şekil 20. wt-1 RNA örneklerinin RIN değerini gösteren elektroferogram görüntüsü



Şekil 21. wt-2 RNA örneklerinin RIN değerini gösteren elektroferogram görüntüsü



Şekil 22. *Δtor1-1* RNA örneklerinin RIN değerini gösteren elektroferogram görüntüsü



Şekil 23. *Δtor1-2* RNA örneklerinin RIN değerini gösteren elektroferogram görüntüsü

4.1.2. mRNA Konsantrasyonu ve Kalitesi

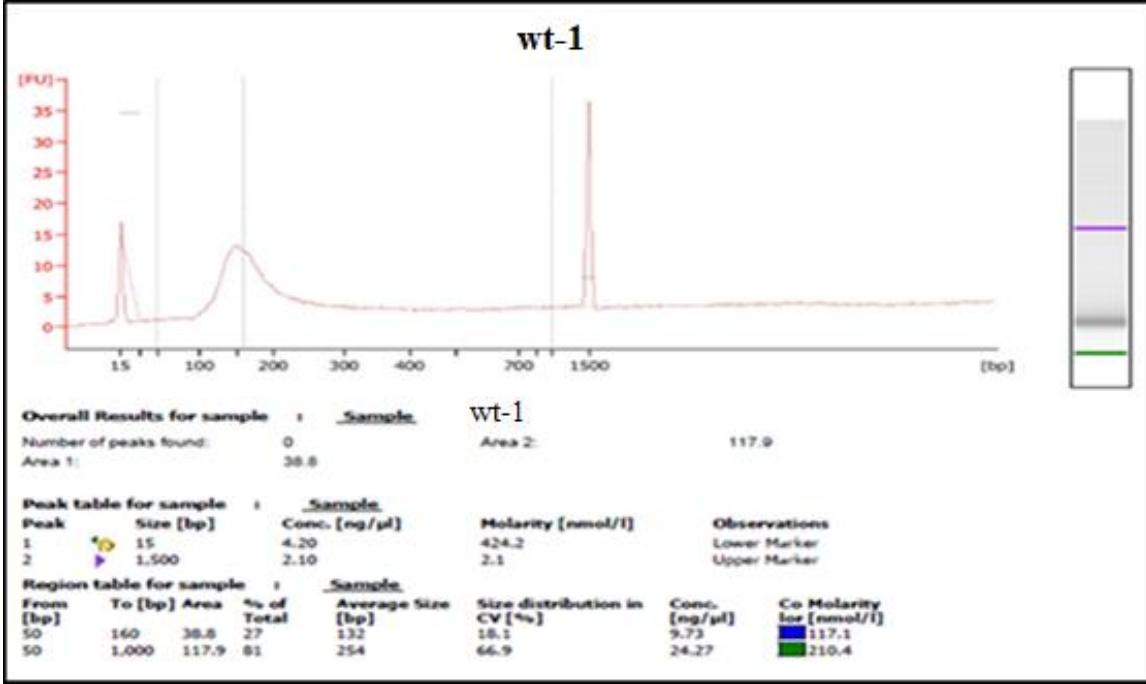
Transkriptom dizilemesinin yapılabilmesi total RNA izolasyonunu sonrasında RNA türünün seçilmesi ve NGS platformları arasında değişebilen bir RNA-Seq kütüphanesinin oluşturulması gerekmektedir. Dizileme kütüphanesinin oluşturulması süreci istenen RNA moleküllerinin izolasyonunu, RNA'nın cDNA'ya ters transkripsiyonunu, rastgele hazırlanmış cDNA moleküllerinin parçalanmasını (veya çoğaltılmasını) ve dizileme adaptörlerinin bağlanmasını içermektedir. Genel olarak RNA moleküllerinin çoğunluğunu rRNA (%95'inden fazlasını) oluşturur. Başarılı bir transkriptom dizilemesi için rRNA'nın verimli bir şekilde uzaklaştırılması önemli olduğu için, birçok protokol, poliadenile edilmiş (poly(A)) RNA'ları seçerek kütüphane oluşturmadan önce mRNA moleküllerini zenginleştirmeye odaklanır (Kukurba ve Montgomery, 2015).

Bu nedenle çalışmamızda poly(A) Yöntemi ile mRNA eldesi yöntemi kullanıldı. Fragmente edilmiş poly(A) RNA örneklerinin konsantrasyon Qubit 3.0 Florometre cihazında ölçüldü. Fragmente edilmiş poly(A) RNA örneklerinin konsantrasyonu wt-1 için 7,36 ng/μl, wt-2 için 7,04 ng/μl, *Ator1-1* için 9,68 ng/μl ve *Ator1-2* için 8,30 ng/μl olarak belirlendi (Tablo 5). Örneklerin cDNA molarite değerleri Agilent bioanalizer cihazında belirlendi. Agilent Bioanalizer cihazında ölçülen cDNA molarite değerlerini gösteren elektroferogram görüntüleri wt-1 için Şekil 24'de, wt-2 için Şekil 25'de, *Ator1-1* için Şekil 26'de ve *Ator1-2* için Şekil 27'de verildi. Elde edilen sonuçlara göre örneklerin cDNA molarite değerleri wt-1 için 210,4 nmol/L, wt-2 için 304,1 nmol/L, *Ator1-1* için 261,3 nmol/L ve *Ator1-2* için 271,3 nmol/L olarak belirlendi (Tablo 5).

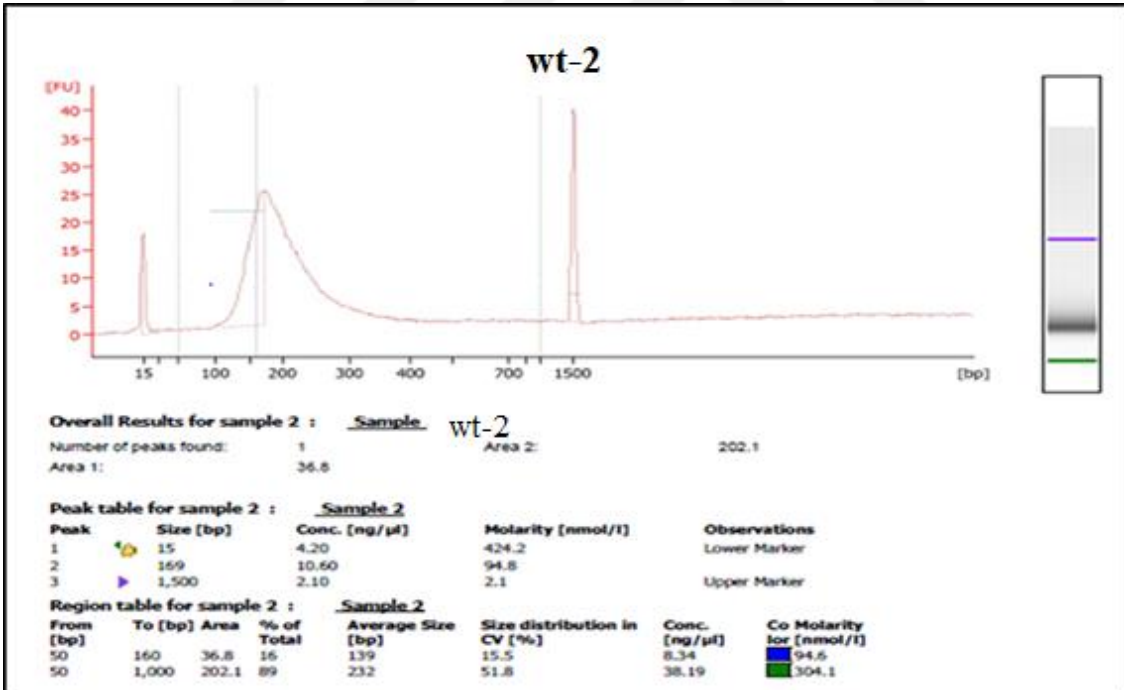
Tablo 5

Fragmente edilmiş poly(A) RNA örneklerinin konsantrasyon ve cDNA molarite değerleri

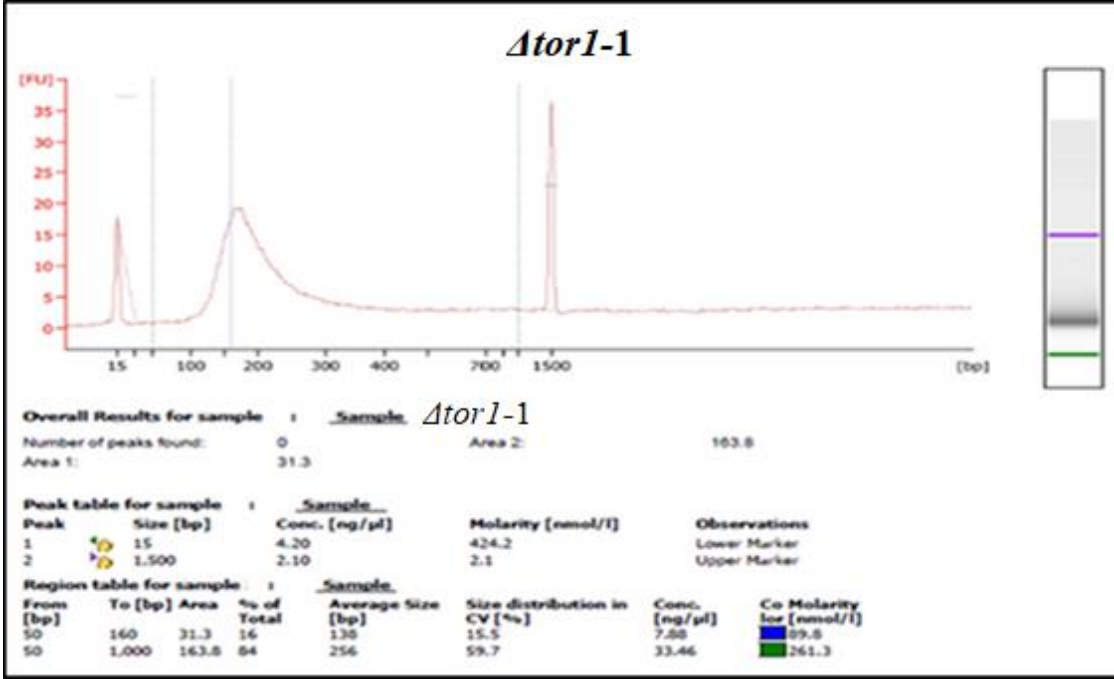
Ölçüm Yöntemi	wt-1	wt-2	<i>Ator1-1</i>	<i>Ator1-2</i>
Qubit konsantrasyonu (ng/μl)	7,36	7,04	9,68	8,30
Agilent Bioanalizer cDNA Molarite (nmol/L)	210,4	304,1	261,3	271,3



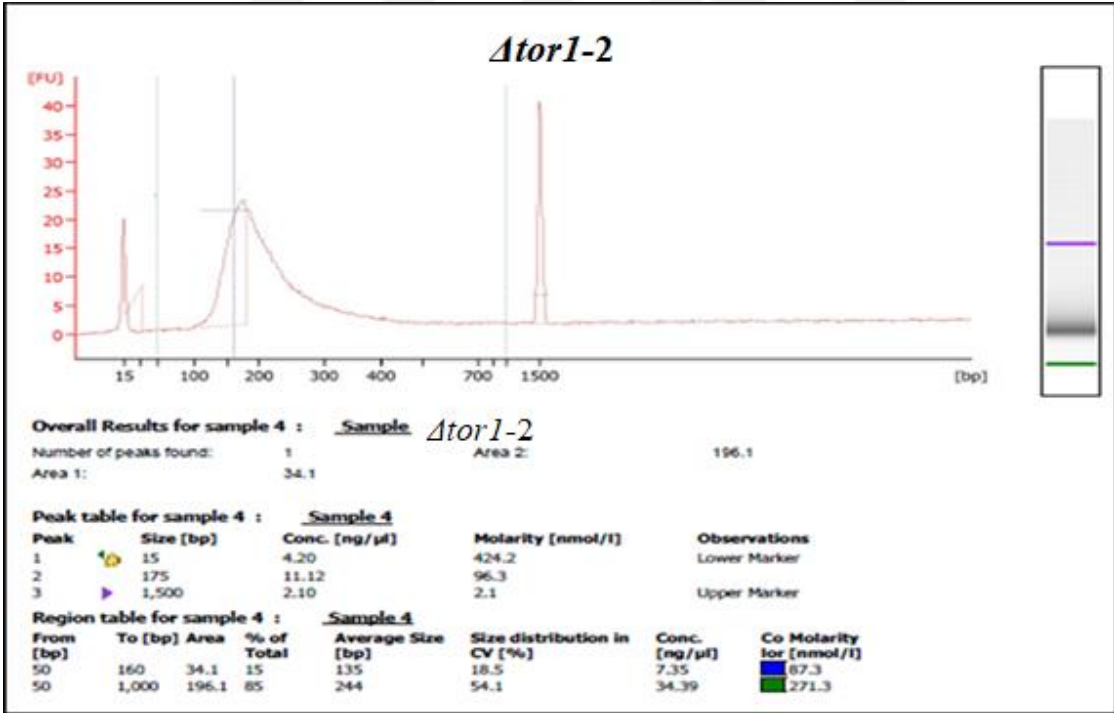
Şekil 24. wt-1 cDNA molarite değerlerini gösteren elektroferogram görüntüsü (nmol/L)



Şekil 25. wt-2 cDNA molarite değerlerini gösteren elektroferogram görüntüsü (nmol/L)



Şekil 26. *Ator1-1* cDNA molarite değerlerini gösteren elektroferogram görüntüsü (nmol/L)

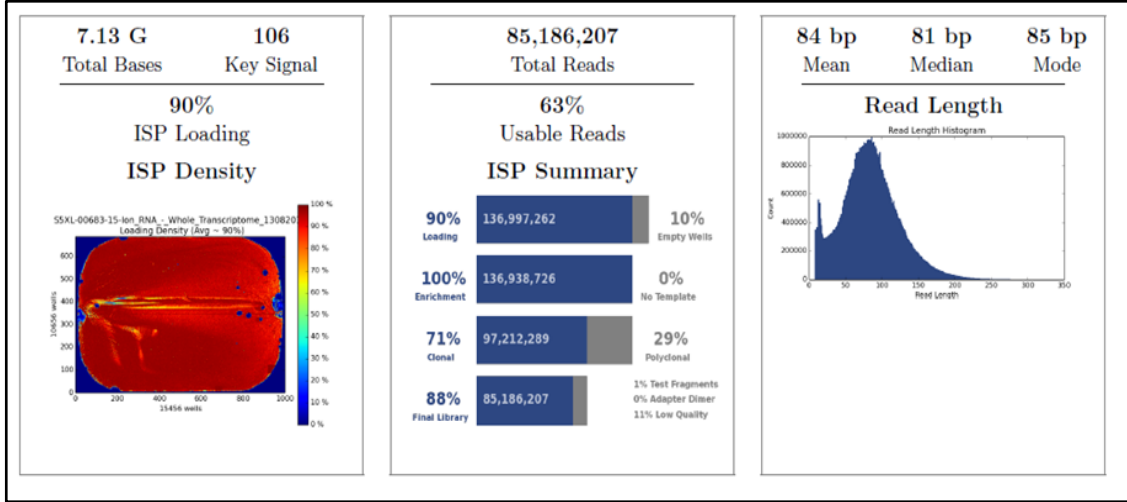


Şekil 27. *Ator1-2* cDNA molarite değerlerini gösteren elektroferogram görüntüsü (nmol/L)

4.1.3. Dizileme Kalitesi Bulguları

Dizileme işlemi için Thermo Fisher Scientific'in Ion S5 XL Ion Torrent Yeni Nesil Dizileme cihazı kullanıldı. Bu cihazın çalışma prensibine göre, DNA dizileme reaksiyonu aşamasında kalıp DNA dizisindeki her bir baz eşleşmesinde şeker-fosfat bağı koparak ortama bir H⁺ iyonu salınır. Bu salınım ortam pH'ını değiştirerek reaksiyonun içinde gerçekleştiği yarı iletken çip içerisinde bulunan iyon sensörü tarafından elektromanyetik sinyal olarak kaydedilir. Bazlar ortama tek tek salınır ve her eşleşmede bu sinyal değişimi algılanır. Nükleotitlerin salınımı belli bir sırayla olur eşleşmeyen baz olması durumunda hiçbir pH değişimi dolayısıyla sinyal değişimi olmaz.

Dizileme işlemi tamamlandıktan sonra, her bir kütüphaneye (wt-1, wt-2, *Ator1-1* ve *Ator1-2*) ait sonuçlar BAM (binary alignment and map) dosyası olarak Torrent Suite Software programından elde edildi. Çip yükleme kapasitesi ortalama %90 başarıyla, toplam 7,13 milyar bç ve 85 186 207 amplikon okuması elde edildi. Dizilenen fragmanların ortalama uzunluğu 84 bç olarak tespit edildi. Belirlenen cDNA ortalama fragment uzunluğunun yaklaşık 72-94 bç arasında olduğu ve örnek konsantrasyonunun uygun olduğu gözlemlendi. Çip yüklemesine ait ısı haritası, iyon küreciklerin yüzdeleri ve ortalama fragman uzunluğu gibi dizileme işleminin kalitesini gösteren değerler Şekil 28'de verildi. Dizileme işlemi sonrasında wt-1, wt-2, *Ator1-1* ve *Ator1-2* için elde edilen okuma sayıları ve okumaların ortalama uzunluğu Tablo 6'da verildi. Elde edilen sonuçlara göre RNA-Seq verilerinin transkriptom analizi için yüksek kalitede olduğu tespit edildi.



Şekil 28. Dizileme işleminin kalite özeti

Tablo 6

Dizileme sonrası elde edilen kütüphanelere ait okuma değerleri

Örnek	Filtreden Geçen Toplam Okuma Sayısı	$Q_{\geq 20}^*$	Toplam Okunan Baz Sayısı	Ortalama Okuma Uzunluğu (bç)
wt-1	29 255 365	1 801 480 637	2 119 186 855	72
wt-2	18 957 987	1 445 360 172	1 714 626 685	90
<i>Ator1-1</i>	15 787 260	1 202 542 851	1 423 269 485	90
<i>Ator1-2</i>	17 988 939	1 419 594 143	1 694 578 602	94

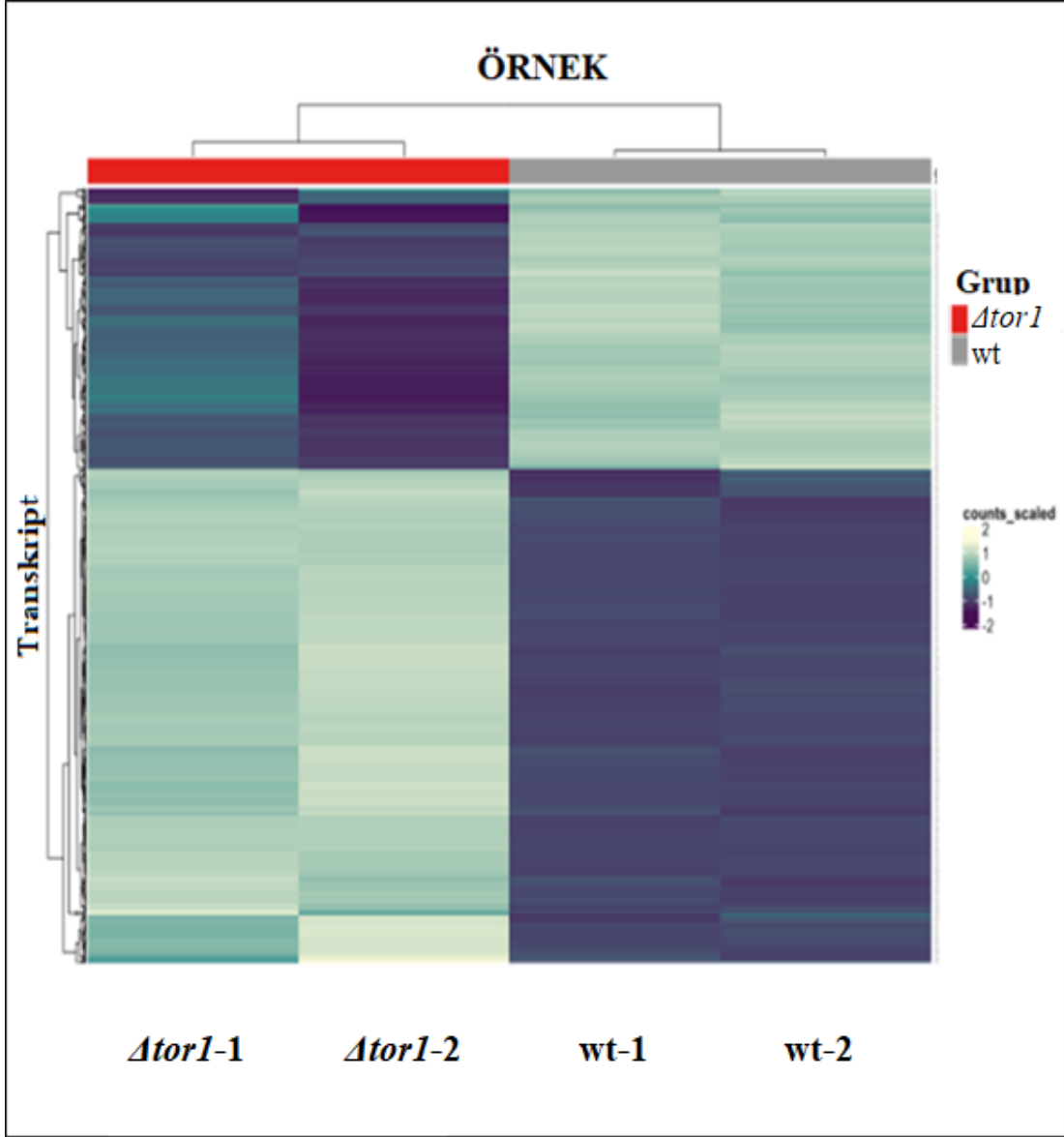
* $Q_{\geq 20}$: Bir fragman boyunca gerçekleşen %1 veya daha az hata payı ile başarılabilmiş okumaları ifade eden değer

4.2. Genel Transkriptom Analizi

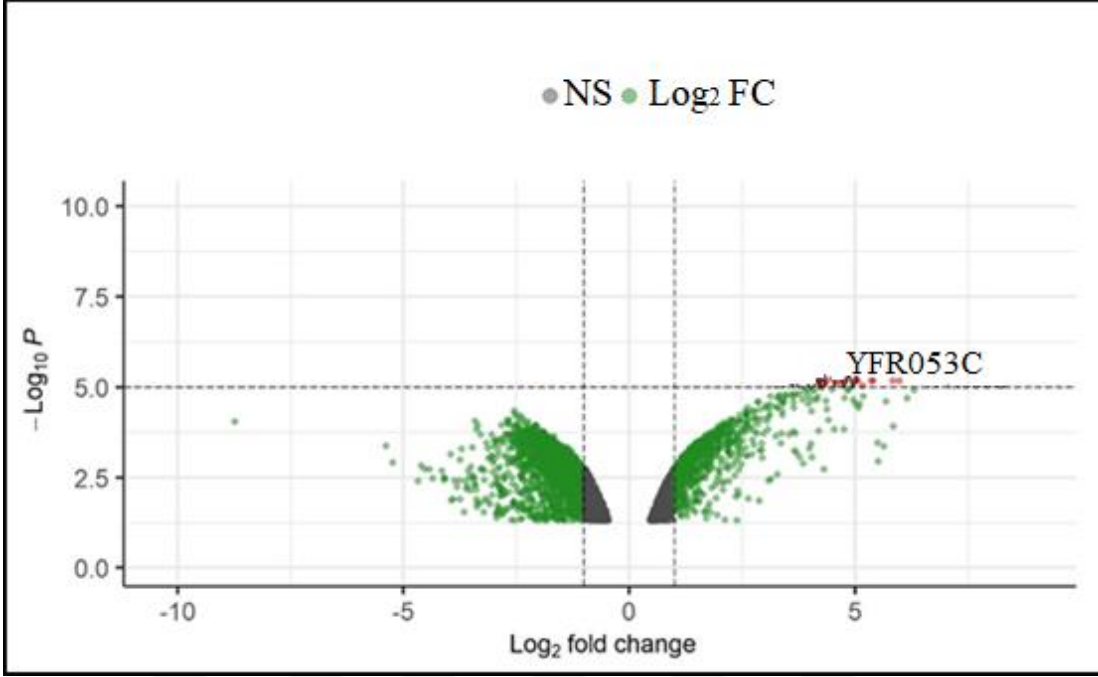
S. cerevisiae maya hücrelerinde *TOR1* geninin yokluğunda gerçekleşen transkripsiyonel değişim profili Diferansiyel gen ekspresyon analizi (Differential gene expression, DEG) ile belirlendi. Diferansiyel ekspresyon analizi, normalleştirilmiş okuma sayısı verilerinin belirlenmesi ve deney grupları arasındaki ekspresyon seviyelerindeki

kantitatif değişikliklerin tespit edilmesi için kullanılır. Yaban tip ve mutant maya hücreleri için iki farklı kültürden gelen ve dublike olarak işleme alınan RNA-Seq verisi analiz edildi. Ayrı kültürlerden gelen aynı yaban tip maya hücrelerinin (wt-1 ile wt-2) ve mutant maya hücrelerinin ($\Delta tor1-1$ ile $\Delta tor1-2$) gen ekspresyonları arasında fark gözlenmedi. Diferansiyel ekspresyon analizi sonucu ekspresyon açısından en fazla farklılık gösteren 500 genin karşılaştırma yapılan gruplardaki ekspresyonları örnek olarak ısı grafiğinde gösterildi (Şekil 29). Yaban tip (wt) ve mutant ($\Delta tor1$) maya hücrelerinin karşılaştırmalı gen ekspresyonlarının volcano plot dağılım grafiği oluşturularak Şekil 30'da verildi. Grafikte kat değişim oranı (Fold Change, FC) 1,5 (FC>1,5) olarak ayarlandı. Tüm genlerin log-CPM (Counts Per million reads Mapped) ve AveExpr (Average expression) verileri değerlendirildiğinde yeşil ile gösterilen genler, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon değişimi gösteren genleri ifade etmektedir.

YJR066W geninde mutant örneklerde hiç okuma bulunmamasına rağmen yaban tip maya hücrelerinde ortalama 250 okuma mevcuttur. Bu tür '0' değerindeki okuma değerleri normal ekspresyon çalışmalarında beklenmeyen bir durum olması sebebiyle, "low abundant" etiketi ile analizlerden çıkarılmaktadır. Çalışmamızda ise bu genin (*TOR1*) knock-out olması sebebiyle 0 okuma değerinin bir anlamı mevcuttur. Fakat çalışma başında konulan "abundance" filtresi sebebiyle, ilk analizlerden çıkarılmıştır



Şekil 29. Yaban tip ve mutant maya hücreleri arasında gen ekspresyonu en fazla farklılık gösteren 500 gen için oluşturulan ısı grafiği.



Şekil 30. Yaban tip ve mutant maya hücreleri arasında yapılan karşılaştırma sonrasında belirlenen gen ekspresyon seviyelerine göre oluşturulan volcano plot dağılım grafiği (NS: Non significant; Log₂ FC: Log₂ Fold Change)

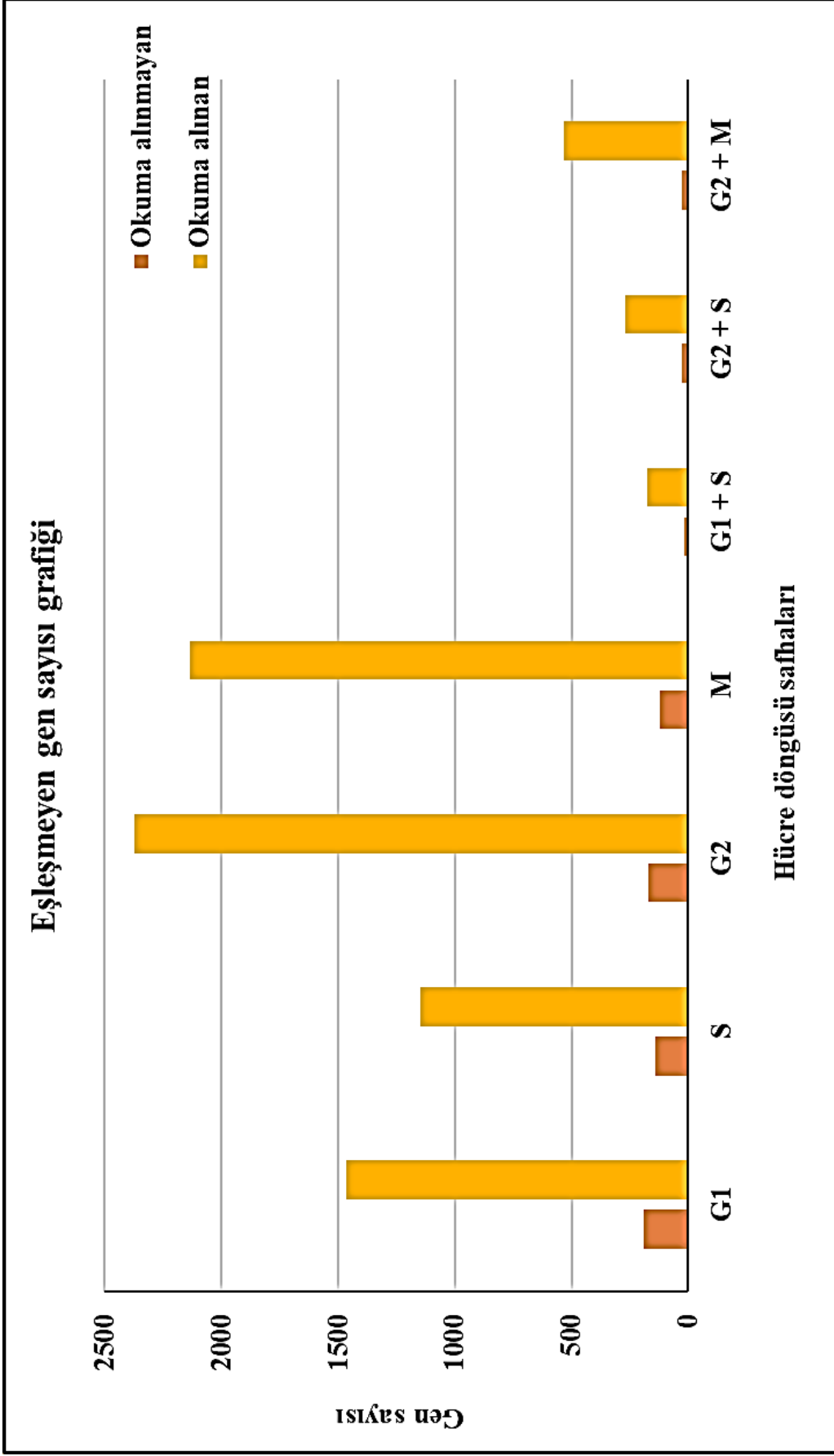
4.3. Hücre Döngüsünün Transkriptomik Analizi

Hücre büyümesi, çeşitli sinyal yollarından oluşan bir ağ tarafından düzenlenen, kapsamlı bir şekilde koordine edilmiş temel biyolojik bir süreçtir (Henriques vd., 2014; Ward ve Thompson, 2012). *S. cerevisiae* maya türünün hücre döngüsünde ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde görevli genlerin listesi Cycle Base (<https://cyclebase.org/CyclebaseSearch>) veri tabanından *S. cerevisiae* organizması seçilerek bilgisayar ortamına indirildi. Genler hücre döngüsü safhalarına (G1, S, G2, M) göre gruplandırıldı. Birden fazla hücre döngüsü safhasında (G1 ve S, S ve G2, G2 ve M) görevli genler ayrıca gruplandırıldı. Hücre döngüsü ve regülasyonunda görevli genler ile RNA seq analizi sonrası elde edilen genler belirlendi (Şekil 31).

Hücre döngüsünün G1 fazında görevli 1463 genden 191 genin, S fazında görevli 1147 genden 140 genin, G2 fazında görevli 2372 genden 169 genin ve M fazında görevli

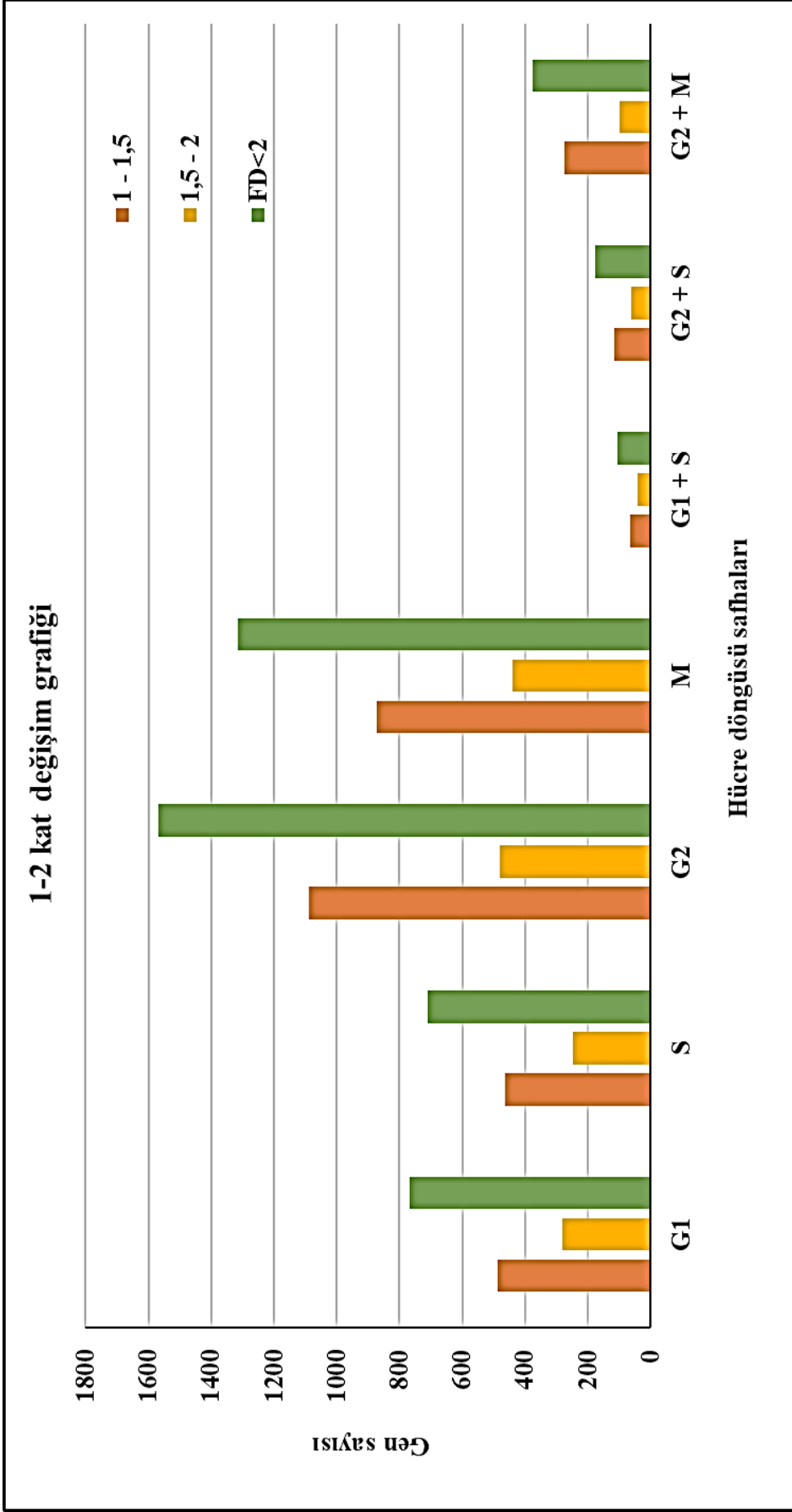
2137 genden 123 genin RNA seq verisinde okuma değeri olmadığı belirlendi. Ayrıca G1 ve S safhalarında görevli 178 genden 16 tanesinin, S ve G2 safhalarında görevli 269 genden 29 tanesinde, G2 ve M safhalarında görevli 535 genden 26 tanesine karşı RNA seq okuması alınmadığı gözlemlendi (şekil 31). Hücre döngüsü ve regülasyonunda gerekli ancak RNA seq okuma değeri olmayan genler analizlerde kullanılmadı.





Şekil 31. Hücre döngüsü safhaları ile ilişkili bulunan ancak okuma alınamayan genlerin grafiği

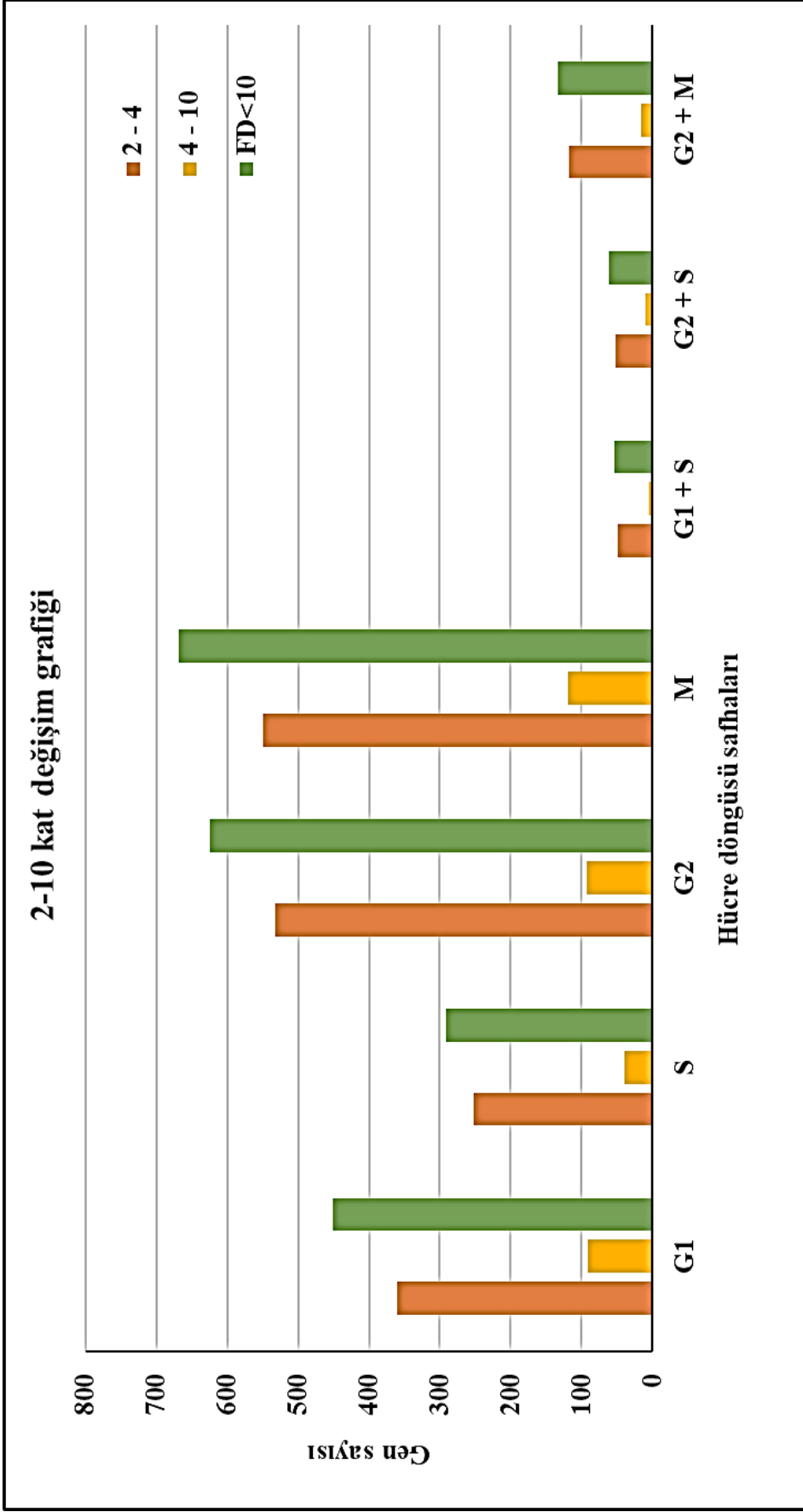
Hücre döngüsü ve regülasyonunda görevli ve RNA seq okuması alınan genlerden, 1-2 kat aralığında değişim gösteren genler (Fold Difference<2) istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon değişimi göstermeyen olarak kabul edildi. Ancak bu genler hücre döngüsü ile ilişkili genler olduğundan dolayı bu genlerin sayıları ve değişim oranı hücre döngüsü safhalarına göre Şekil 32’de verildi. Hücre döngüsünün G1 fazında görevli 1272 genden 487 tanesinin 1-1,5 kat 282 tanesinin 1,5-2 kat; S fazında görevli 1007 genden 462 tanesinin 1-1,5 kat 248 tanesinin 1,5-2 kat; G2 fazında görevli 2206 genden 1089 tanesinin 1-1,5 kat 479 tanesinin 1,5-2 kat; M fazında görevli 2014 genden 874 tanesinin 1-1,5 kat arası 440 tanesinin 1,5-2 kat; G1+S fazında görevli 162 genden 64 tanesinin 1-1,5 kat 42 tanesinin 1,5-2 kat; G2+S fazında görevli 240 genden 115 tanesinin 1-1,5 kat 61 tanesinin 1,5-2 kat ve G2+M fazında görevli 509 genden 275 tanesinin 1-1,5 kat 100 tanesinin 1,5-2 kat arası değişim gösterdiği belirlendi (Şekil 32).



Şekil 32. 1-2 kat değişim gösteren genlerin hücre döngüsü safhalarına göre dağılımı ($1 \leq FD < 2$)

Hücre döngüsü ve regulasyonunda görevli ve RNA seq okumaları alınan genlerden 2-10 kat aralığında (FD <10) değişim gösteren genlerin hücre döngüsünün safhalarına göre dağılımı Şekil 33'de verildi

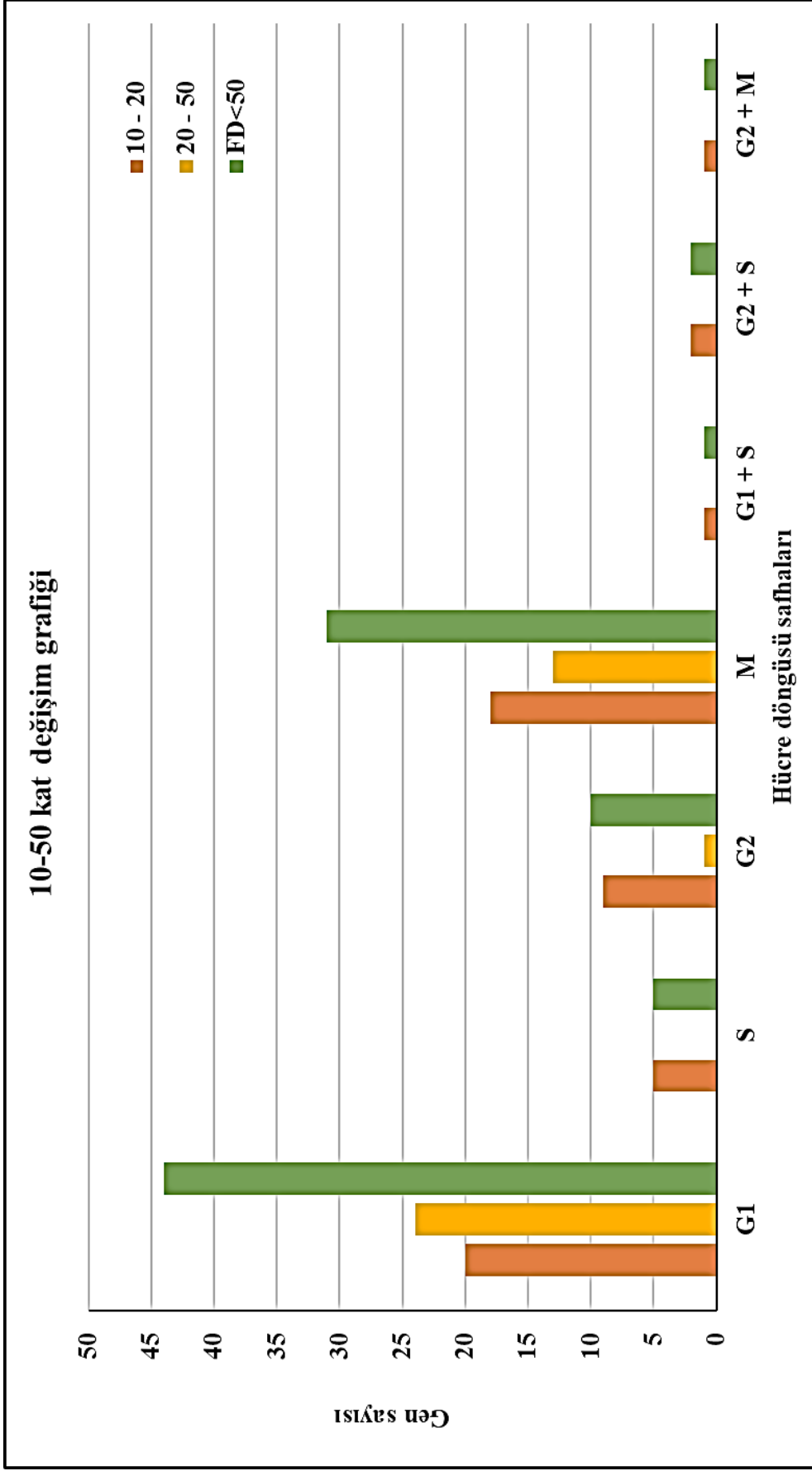
Hücre döngüsünün G1 fazında görevli 360 genin 2-4 kat 91 genin ise 4-10 kat, S fazında görevli 252 genin 2-4 kat ve 39 genin 4-10 kat, G2 fazında görevli 533 genin 2-4 kat 92 genin 4-10 kat, M fazında görevli 549 genin 2-4 kat ve 119 genin 4-10 kat, G1 ve S fazında görevli 49 genin 2-4 kat ve 5 genin 4-10 kat, G2 ve S fazında görevli 52 genin 2-4 kat ve 10 genin 4-10 kat, G2 ve M fazında görevli 117 genin 2-4 kat ve 16 genin 4-10 kat arası değişim gösterdiği belirlendi. *TOR1* geninin yokluğunda hücre döngüsü ve regulasyonunda görevli olan ve 2-10 kat değişim gösteren genlerden 1000 tanesinin ekspresyonunun arttığı 887 genin ise ekspresyonunun azaldığı tespit edildi.



Şekil 33. 2-10 kat değişim gösteren genlerin hücre döngüsü safhalarına göre dağılımı ($2 \leq FD < 10$)

Hücre döngüsü ve regulasyonunda görevli ve RNA seq okumaları alınan genlerden 10-50 kat aralığında ($10 \leq FD < 50$) değişim gösteren genlerin hücre döngüsünün safhalarına göre dağılımı Şekil 34'da verildi.

Hücre döngüsünün G1 fazında görevli 20 genin, S fazında görevli 5 genin, G2 fazında görevli 9 genin, M fazında görevli 18 genin, G1 ile S fazında görevli 1 genin, S ile G2 fazında görevli 2 genin ve G2 ile M fazında görevli 1 genin 10 ile 20 kat arasında değişim gösterdiği belirlendi ($10 \leq FD < 20$). Ayrıca G1 fazında 24 genin, G2 fazında 1 genin ve M fazında 13 genin ekspresyonunun 20-50 kat ($20 \leq FD < 50$) oranında artış gösterdiği tespit edildi. *TOR1* geninin yokluğunda ekspresyonları 10 ile 20 kat oranında artış gösteren genlerin listesi Tablo 7'de, 20 ile 50 kat oranında artış gösteren genlerin listesi Tablo 8'de verildi. Hücre döngüsü safhaları ile ilişkili bulunan ve 20 kat ve üzeri kat değişim gösteren genlerin fonksiyonları ve değişim miktarları Tablo 9'da verilmiştir.



Şekil 34.10-50 kat değişim gösteren genlerin hücre döngüsü safhalarına göre dağılımı(10≤FD<50)

Tablo 7

Hücre döngüsünün safhalarında görevli olan ve 10-20 kat oranında değişim gösteren genler

Hücre Döngüsü Safhaları	10-20 Kat Değişim Gösteren Genler				
G1	<i>GDB1</i>	<i>JEN1</i>	<i>NQM1</i>	<i>STF2</i>	<i>USV1</i>
	<i>GSY2</i>	<i>LEE1</i>	<i>PBI2</i>	<i>SUE1</i>	<i>XBP1</i>
	<i>GUT2</i>	<i>MAL11</i>	<i>PHM7</i>	<i>TFS1</i>	<i>YJR115W</i>
	<i>ISF1</i>	<i>MIG1</i>	<i>SDH1</i>	<i>TPS1</i>	<i>YNL195C</i>
S	<i>PUT1</i>	<i>UGP1</i>	<i>YDR133C</i>	<i>YLR177W</i>	<i>YNL195C</i>
G2	<i>ADR1</i>	<i>NCE10</i>	<i>PUT1</i>	<i>SPL2</i>	<i>YKR075C</i>
	<i>FUN19</i>	<i>PHO84</i>	<i>RG12</i>	<i>UGP1</i>	
M	<i>ACH1</i>	<i>GIP2</i>	<i>SDH4</i>	<i>TPK2</i>	<i>YNL234W</i>
	<i>EIS1</i>	<i>KIN82</i>	<i>SDS24</i>	<i>TPS2</i>	<i>YPL247C</i>
	<i>FMP48</i>	<i>LSP1</i>	<i>SPL2</i>	<i>YBR285W</i>	
	<i>GCY1</i>	<i>MTH1</i>	<i>TDH1</i>	<i>YER121W</i>	
G1+S	<i>YNL195C</i>				
G2+S	<i>UGP1</i>	<i>PUT1</i>			
G2+M	<i>SPL2</i>				

Tablo 8

Hücre döngüsünün safhalarında görevli olan ve 20-50 kat oranında değişim gösteren genler

Hücre Döngüsü Safhaları	20-50 Kat Değişim Gösteren Genler				
G1	<i>ALD4</i>	<i>GAD1</i>	<i>HSP12</i>	<i>PGM2</i>	<i>TSL1</i>
	<i>CTT1</i>	<i>GLC3</i>	<i>HXT2</i>	<i>PHO89</i>	<i>ZNF1</i>
	<i>DCS2</i>	<i>GLK1</i>	<i>HXT5</i>	<i>RTC3</i>	<i>YGR067C</i>
	<i>EMI2</i>	<i>GPH1</i>	<i>MSC1</i>	<i>RTN2</i>	<i>YMR206W</i>
	<i>MPC3</i>	<i>GSY1</i>	<i>OM45</i>	<i>SOL4</i>	
S	-				
G2	<i>HSP30</i>				
M	<i>ALD6</i>	<i>FMP16</i>	<i>MAL31</i>	<i>SPI1</i>	<i>YRO2</i>
	<i>BDH2</i>	<i>FMP45</i>	<i>SPG1</i>	<i>AQY3</i>	
	<i>CYC7</i>	<i>IGD1</i>	<i>SPG4</i>	<i>YGP1</i>	
G1+S	-				
G2+S	-				
G2+M	-				

Tablo 9

Hücre döngüsü safhaları ile ilişkili bulunan ve 20 kat ve üzeri kat değişim gösteren genlerin fonksiyonları ve değişim miktarları

Gen Adı	Gen Kodu	Fonksiyonu	Değişim Miktarı (FD)
<i>GAD1</i>	<i>YMR250W</i>	<u>G</u> lutamate <u>D</u> ecarboxylase; glutamat katabolizması sırasında glutamatu gama-aminobütirik aside (GABA) dönüştüren enzim; Oksidatif stres yanıtında görev alır	21,2
<i>IGD1</i>	<i>YFR017C</i>	<u>I</u> nhibitor of <u>G</u> lycogen <u>D</u> ebranching; Sitoplazmik protein, Gdb1 proteinin <u>D</u> ebranching aktivitesini önler. DNA replikasyon stresine yanıt olarak protein miktarı artar; <i>YOL024W</i> ile paralogdur.	21,2
<i>MPC3</i>	<i>YGR243W</i>	<u>M</u> itochondrial <u>P</u> yruvate <u>C</u> arrier; <i>MPC</i> , mitokondriyal iç zara yerleşir ve piruvat alımına aracılık eder. Fermente edilemeyen karbon kaynaklarında büyüme sırasında ekspres edilir. DNA replikasyon stresine yanıt olarak protein miktarı artar; <i>MPC2</i> ile paralogdur	21,2
<i>BDH2</i>	<i>YAL061W</i>	<i>BDH1</i> (Butanediol <u>D</u> e <u>H</u> ydrogenase) enzimine benzer orta zincirli alkol dehidrojenaz; aktif <i>PDR1</i> ve <i>PDR3</i> varlığında <i>BDH2</i> transkripsiyonu devamlı olarak ekspres edilir. <i>BDH2</i> , içermeyen maya hücreleri hiperozmotik strese duyarlı olup açlık stresine karşı dirençleri azalır	21,8
<i>MAL31</i>	<i>YBR298C</i>	<u>M</u> ALtose fermentation; yüksek afiniteli maltoz taşıyıcı protein. <i>MAL31</i> içermeyen maya hücrelerinin strese direnci azalır	22,5
<i>ZNF1</i>	<i>YFL052W</i>	<u>Z</u> inc Finger protein; transkripsiyon faktörü; solunum, glikoneogenez ve glioksilat şantı ile ilgili genlerin promotörlerine bağlanır; normal karbon kaynağı kullanımı ve özellikle fermentatif olmayan metabolizma sırasında pH, ozmotik ve etanol stresine uyum için gereklidir	22,6
<i>ALD6</i>	<i>YPL061W</i>	<u>A</u> ldehyde <u>D</u> ehydrogenase; Sitolik aldehit dehidrojenaz enzim; Mg ²⁺ tarafından aktive edilir ve koenzim olarak NADP ⁺ 'yi kullanır; asetaldehitin asetata dönüştürülmesi için gereklidir; devamlı olarak ekspres edilir; oksidatif stres sonrası sitozolik enzim mitokondri dış yüzeyine yerleşir	22,7
-	<i>YMR206W</i>	İşlevi bilinmeyen protein; <i>YNR014W</i> ile paralogdur	22,5

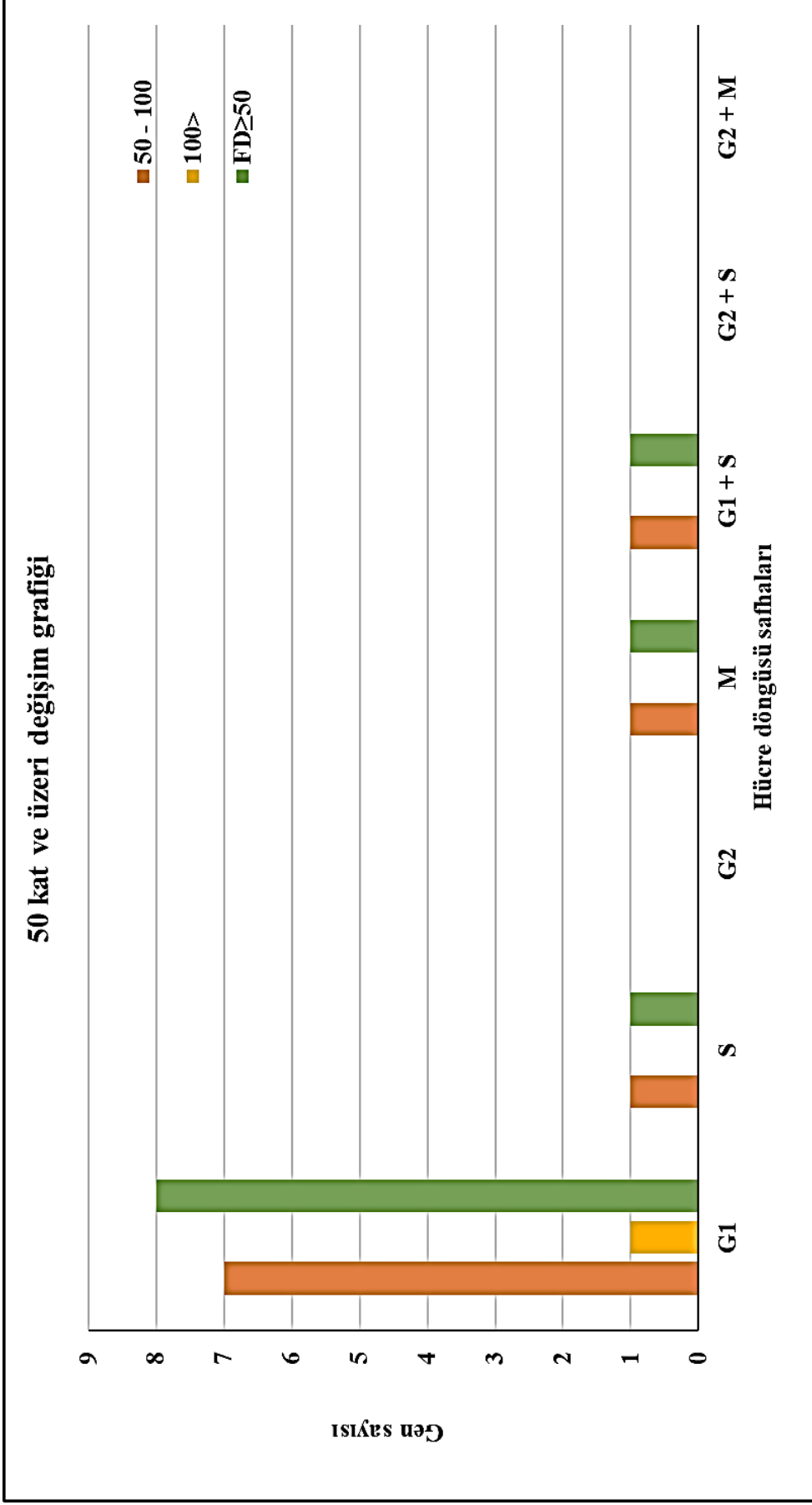
<i>OM45</i>	<i>YIL136W</i>	<u>O</u> uter <u>M</u> embrane; İşlevi bilinmeyen mitokondriyal dış zar protein. DNA replikasyon stresine yanıt olarak protein miktarı artar	22,5
<i>SPI1</i>	<i>YER150W</i>	<u>S</u> tationary <u>P</u> hase <u>I</u> nduced; Zayıf asit direncinde yer alan GPI bağımlı hücre duvarı proteini; bazal gen ekspresyonu için Msn2p/Msn4p gereklidir; <i>SPI1</i> ekspresyonu, stres koşulları altında ve diauksik kayma sırasında aktive olur; <i>SEDI</i> ile paralogdur	23,3
<i>AQY3</i>	<i>YFL054C</i>	<u>A</u> Quaporin from <u>Y</u> east; Kanal benzeri protein; Fps1p'ye benzer; etanol varlığında gliserolün pasif difüzyonuna aracılık eder. Fazla ekspres edildiğinde rapamisin duyarlılığı artar	23,4
<i>FMP16</i>	<i>YDR070C</i>	<u>F</u> ound in <u>M</u> itochondrial <u>P</u> roteome; Fonksiyonu bilinmeyen protein; Stres koşullarına yanıt vermede görev alıyor olabilir. DNA replikasyon stresine yanıt olarak protein miktarı artar	23,5
<i>EMI2</i>	<i>YDR516C</i>	<u>E</u> arly <u>M</u> eiotic <u>I</u> nduction; düşük glikoz içeren ortamda heksokinaz aktivitesine sahiptir. <i>EMI2</i> gen ekspresyonu glukoz azlığında ve fermente edilemeyen karbon kaynağında artar. Fermente edilemeyen karbon kaynaklarında büyüme sırasında aktive olur. Erken mayoz-spesifik transkripsiyon faktörünün (<i>IME1</i>) transkripsiyonel indüksiyonu için gereklidir; sporlanma için gereklidir; ekspresyonu glukoz-represyon transkripsiyon faktörleri (Mig1/2p) tarafından düzenlenir; <i>GLK1</i> ile paralogdur, DNA replikasyon stresine yanıt olarak protein miktarı artar	24,8
<i>TSL1</i>	<i>YML100W</i>	<u>T</u> rehalose <u>S</u> ynthase <u>L</u> ong chain; Trehaloz 6-fosfat sentaz/fosfataz kompleksinin büyük alt birimidir; maya hücrelerinin ısı stresinde hayatta kalması için gereklidir. <i>TPS3</i> ile paralogdur	25,6
<i>SPG1</i>	<i>YGR236C</i>	<u>S</u> tationary <u>P</u> hase <u>G</u> ene yüksek sıcaklıkta durağan safhadaki maya hücrelerinin hayatta kalması için gerekli protein; fermente edilemeyen karbon kaynaklarında büyüme için gerekli değildir; mitokondride lokalize olur	25,9
<i>HSP30</i>	<i>YCR021C</i>	<u>H</u> eat <u>S</u> hock <u>P</u> rotein; H ⁺ -ATPase Pma1p'nin negatif düzenleyicisi; stress cevap proteini; ısı şoku, etanol muamelesi, zayıf organik asit, glikoz sınırlaması ve durağan faza giriş ile aktive edilir. Plazma zarında lokalize olur	26,0

<i>YRO2</i>	<i>YBR054W</i>	Asit stresine yanıt olarak varsayılan rolü olan protein; null mutant, asetik aside duyarlıdır; transkripsiyon, Haalp tarafından düzenlenir ve asetik asit varlığında indüklenir; asetik asit varlığında plazma zarı odaklarında gözlenen protein asetik asit mamelesinde mitokondri ve plazma zarında lokalize olur. Ekspresyonu asetik asit ile aktive olur. <i>MRH1</i> ile paralogdur	26,5
<i>CTT1</i>	<i>YGR088W</i>	<u>C</u> aTalase <u>T</u> ; Sitolik enzim; hidrojen peroksitin neden olduğu oksidatif hasardan hücrenin korunması için gereklidir. <i>CTT1</i> geni yokluğunda hücrenin kronolojik yaşam uzunluğu artar, <i>CTT1</i> geni yokluğunda hücreler kuraklık, ısı şoku, oksidatif stress ve diğer kimyasalların stresine karşı dirençli olamaz	27,7
<i>CYC7</i>	<i>YEL039C</i>	<u>C</u> Ytochrome <u>C</u> ; hipoksik koşullarda ifade edilir; hücre solunum sırasında elektronları ubikinon-sitokrom c oksidoredüktazdan sitokrom c oksidaza aktaran mitokondrinin zarlar arası boşluğunda lokalize olan taşıyıcı protein; <i>CYCI</i> ile paralogdur	28,5
-	<i>YGR067C</i>	İşlevi bilinmeyen protein; Adr1p proteinine benzer bir çinko parmak motifi içerir	29,0
<i>PHO89</i>	<i>YBR296C</i>	<u>P</u> Hosphate metabolism; Plazma zarında (Na ⁺ /Pi için) taşıyıcı protein: symporter; inorganik fosfat konsantrasyonu ve Pho4p tarafından transkripsiyonu düzenlenir	29,6
<i>GLC3</i>	<i>YEL011W</i>	<u>G</u> LyCogen; Glikojen dallanma enzimi glikojen birikiminde görevli, DNA replikasyon stresine yanıt olarak nukleustan sitoplazmaya geçer	30,0
<i>HXT5</i>	<i>YHR096C</i>	<u>H</u> eXose <u>T</u> ransporter; Glikoz için orta derecede afiniteye sahip heksoz taşıyıcı protein; fermente edilemeyen karbon kaynaklarında active edilir. <i>HXT3</i> ile paralogdur	31,0
<i>GLK1</i>	<i>YCL040W</i>	<u>G</u> Luco <u>K</u> inase; Glikozun C6'da fosforilasyonunu katalize eden enzim; fermente edilemeyen karbon kaynaklarında ekspresyonu artar, <i>EMI2</i> ile paralogdur	32,4
<i>RTC3</i>	<i>YHR087W</i>	<u>R</u> estriction of <u>T</u> elomere <u>C</u> apping; RNA metabolizmasında yer alan ve fonksiyonu bilinmeyen protein; nukleus ve sitoplazmada lokalize olur. DNA replikasyon stresine yanıt olarak protein miktarı artar	34,6
<i>SPG4</i>	<i>YMR107W</i>	<u>S</u> tationary <u>P</u> hase <u>G</u> ene yüksek sıcaklıkta durağan safhadaki maya hücrelerinin hayatta kalması için gerekli protein; fermente edilemeyen karbon kaynaklarında büyüme için gerekli değildir; mitokondride lokalize olur	34,8

<i>MSC1</i>	<i>YML128C</i>	<u>Meiotic Sister-Chromatid</u> recombination; Fonksiyonu bilinmeyen protein; mitokondriyal protein, mayotik rekombinasyonda görevli; ayrıca hücre zarı ve endoplazmik retikulumda lokalize olabilir	36,6
<i>RTN2</i>	<i>YDL204W</i>	<u>ReTiculoN-like</u> ; nükleer gözenek oluşumu ve ER tübül yapısının oluşumunda görevli. DNA replikasyon stresine yanıt olarak protein miktarı artar ve tekrar plazma zarına yerleşir	36,5
<i>SOL4</i>	<i>YGR248W</i>	<u>Suppressor Of Los1-1</u> ; 6-fosfoglukonolaktonaz enzimi; DNA replikasyon stresine yanıt olarak protein miktarı artar; nükleus ve sitoplazmada lokalize olur. <i>SOL3</i> ile paralogdur	39,2
<i>ALD4</i>	<i>YOR374W</i>	<u>ALdehyde Dehydrogenase</u> ; Mitokondriyal aldehit dehidrojenaz enzimi; etanol varlığında büyüme ve asetaldehitin asetata dönüşümü için gereklidir; gen ekspresyonu glikoz tarafından baskılanır; sitozole yönlendirildiğinde sitozolik NADP'ye bağımlı aldehit dehidrojenazın yerini alabilir. Mitokondride lokalize olur	40,4
<i>HXT2</i>	<i>YMR011W</i>	<u>Hexose Transporter</u> ; yüksek afiniteli glikoz taşıyıcı protein; gen ekspresyonu, düşük glukozda aktive edilirken yüksek glukozda baskılanır. Hücre zarında lokalize olur	41,5
<i>HSP12</i>	<i>YFL014W</i>	<u>Heat Shock Protein</u> ; Membran organizasyonunun muhafazasında görev alan plazma membran proteini; stres koşullarında zar yapısının korunmasında görev alır; ısı şoku, oksidatif stres, osmotik stres, durağan faz, glukoz yokluğu, oleat ve alkol muamelesi ile aktive edilir. DNA replikasyon stresine ve besin kısıtlamasına yanıt olarak protein miktarı artar; <i>HOG</i> ve Ras-Pka yolları tarafından düzenlenir; besin kısıtlamasına bağlı yaşam süresinin uzatılması için gereklidir	42,9
<i>YGP1</i>	<i>YNL160W</i>	<u>Yeast GlycoProtein</u> ; Hücre duvarı ile ilgili salgı glikoproteini; besin eksikliğinde ve durağan faza girdikten sonra büyümenin durmasıyla aktive edilir; <i>SPS100</i> ile paralogdur	43,0
<i>PGM2</i>	<i>YMR105C</i>	<u>PhosphoGlucose Mutase</u> ; heksoz metabolizmasında önemli bir adım olan glikoz-1-fosfattan glikoz-6-fosfata dönüşümü katalize eden enzim; DNA replikasyon stresine ve besin kısıtlamasına yanıt olarak protein miktarı artar. <i>PGM1</i> ile paralogdur	44,8
<i>GSY1</i>	<i>YFR015C</i>	<u>Glycogen Synthase</u> ; glikojen sentezinden sorumlu enzim; glukoz azlığında, azot açlığında, çevresel streste ve durağan faza girişte ekspresyonu artar; <i>GSY2</i> ile paralogdur	47,2

<i>GPH1</i>	<i>YPR160W</i>	<u>G</u> lycogen <u>P</u> Hosphorylase; Glikojenin mobilizasyonu için gerekli olan glikojen fosforilaz enzimi; Cdc28p tarafından fosforilasyonu, karbonhidrat metabolizmasını ve hücre döngüsünü control eder; gen ekspresyonu, strese tepki elemanları ve <i>HOG MAP</i> kinaz yolu tarafından düzenlenir	47,8
<i>FMP45</i>	<i>YDL222C</i>	<u>F</u> ound in <u>M</u> itochondrial <u>P</u> roteome; Mitokondri zarında lokalize olan zar proteini; sporlanma ve sfingolipid içeriğinin korunması için gereklidir; <i>SUR7</i> 'ye benzer; <i>YNL194C</i> ile paralogdur	48,3
<i>DCS2</i>	<i>YOR173W</i>	<u>D</u> e <u>C</u> apping <u>S</u> cavenger; stress kaynaklı active edilen protein, Dcs1p'yi inhibe eder; Msn2p, Msn4p ve Ras-cAMP-cAPK sinyal yolu tarafından düzenlenir; <i>DCS1</i> ile paralogdur, <i>DCS2</i> geninin yokluğunda büyüme yavaşlar ve durağan safhada hayatta kalma süresi uzar	48,4

50 kat ve üzerinde ($FD \geq 50$) değişim gösteren genlerin hücre döngüsünün safhalarına göre dağılımı Şekil 35'te verildi. G1 fazında görevli 7 genin, S fazında 1 görevli 1 genin, M fazında görevli 1 genin G1+S fazında görevli 1 genin ekspresyonları 50 ile 100 kat arasında artış gösterirken, G1 fazında görevli 1 genin ekspresyonunun 238,6 kat arttığı tespit edildi. *TOR1* geninin yokluğunda ekspresyonu 50 kat ve üzerinde değişim gösteren genlerin listesi Tablo 10'da, fonksiyonları ise Tablo 11'de verildi.



Şekil 35. 50 kat ve üzeri değişim gösteren genlerin hücre döngüsü safhalarına göre dağılımı

Tablo 10

Hücre döngüsü safhaları ile ilişkili 50 kat ve üzeri değişim gösteren genler

Hücre Döngüsü Safhaları	50 Kat ve Üzerinde Değişim Gösteren Genler
G1	<i>HXK1, DDR2, HXT4, HXT6, HXT7, HSP26, TMA10, YNL194C,</i>
S	<i>TMA10</i>
G2	-
M	<i>RCK1</i>
G1+S	<i>TMA10</i>
G2+S	-
G2+M	-

Tablo 11

Hücre döngüsü safhaları ile ilişkili 50 kat ve üzeri değişim gösteren genlerin fonksiyonları ve değişim miktarları

Gen Adı	Gen Kodu	Fonksiyon	Değişim Miktarı
<i>TMA10</i>	<i>YLR327C</i>	<u>T</u> ranslation <u>M</u> achinery <u>A</u> ssociated; Ribozomlarla ilişkilendirilen ancak işlevi bilinmeyen protein; DNA replikasyon stresine yanıt olarak protein miktarı artar; sitoplazma ve nükleusta lokalize olur, <i>STF2</i> ile paralogdur	53,4
<i>HXT4</i>	<i>YHR092C</i>	<u>H</u> e <u>X</u> ose <u>T</u> ransporter; Yüksek afiniteli glikoz taşıyıcı protein; gen ekspresyonu düşük glukoz seviyesinde aktive edilirken yüksek glukoz seviyesinde baskılanır, <i>HXT7</i> ile paralogdur	53,3
<i>HSP26</i>	<i>YBR072W</i>	<u>H</u> eat <u>S</u> hock <u>P</u> rotein; şaperon aktivitesine sahip küçük ısı şoku proteini; ısı stresine cevapta görev alır. Sitoplazma ve nükleusta lokalize olur	53,8
<i>RCK1</i>	<i>YGL158W</i>	<u>R</u> adiation sensitivity <u>C</u> omplementing <u>K</u> inase; Oksidatif stres tepkisinde yer alan protein kinaz; Ubp3p fosforilasyonunun aktivasyonu yoluyla psödohifal büyümeyi teşvik eder; <i>RCK2</i> ile paralogdur	75,4
-	<i>YNL194C</i>	İntegral zar proteini; sporlanma ve plazma zarının sfingolipid içeriği için gerekli protein; <i>SUR7</i> ye benzer; <i>FMP45</i> ile paralogdur	77,3

<i>HXT6</i>	<i>YDR343C</i>	<u>HeXose</u> <u>Transporter</u> ; yüksek afiniteli glikoz taşıyıcı protein, yüksek glikoz varlığında <i>HXT</i> gen ekspresyonunun bastırılması için Snf3p gereklidir; <i>HXT1</i> ile paralogdur	77,6
<i>HXT7</i>	<i>YDR342C</i>	<u>HeXose</u> <u>Transporter</u> ; yüksek afiniteli glikoz taşıyıcı protein, yüksek glikoz varlığında gen ekspresyonu bastırılır ifade; <i>HXT4</i> ile paralogdur	79,5
<i>DDR2</i>	<i>YOL052C-A</i>	<u>DNA</u> <u>Damage</u> <u>Responsive</u> ; Çoklu stres tepki proteini; Vakuolar protein, gen ekspresyonu çeşitli ksenobiyotik ajanlar ve çevresel veya fizyolojik stresler tarafından aktive edilir. <i>DDR2</i> geni yokluğunda maya hücrelerinin durağan safhada hayatta kalma oranı azalır. <i>HOR7</i> ile paralogdur	86,3
<i>HXK1</i>	<i>YFR053C</i>	<u>HeXo</u> <u>Kinase</u> ; glikoz metabolizması sırasında glikozun fosforilasyonunu katalize eden sitosolik enzim; gen ekspresyonu, glikoz dışındaki karbon kaynaklarında büyüme sırasında aktive olur; glikoz tarafından baskılanırken Hxk2p gereklidir; <i>HXK2</i> ile paralogdur	238,6

4.4. Hücre Döngüsünün Fonksiyonel Analizi

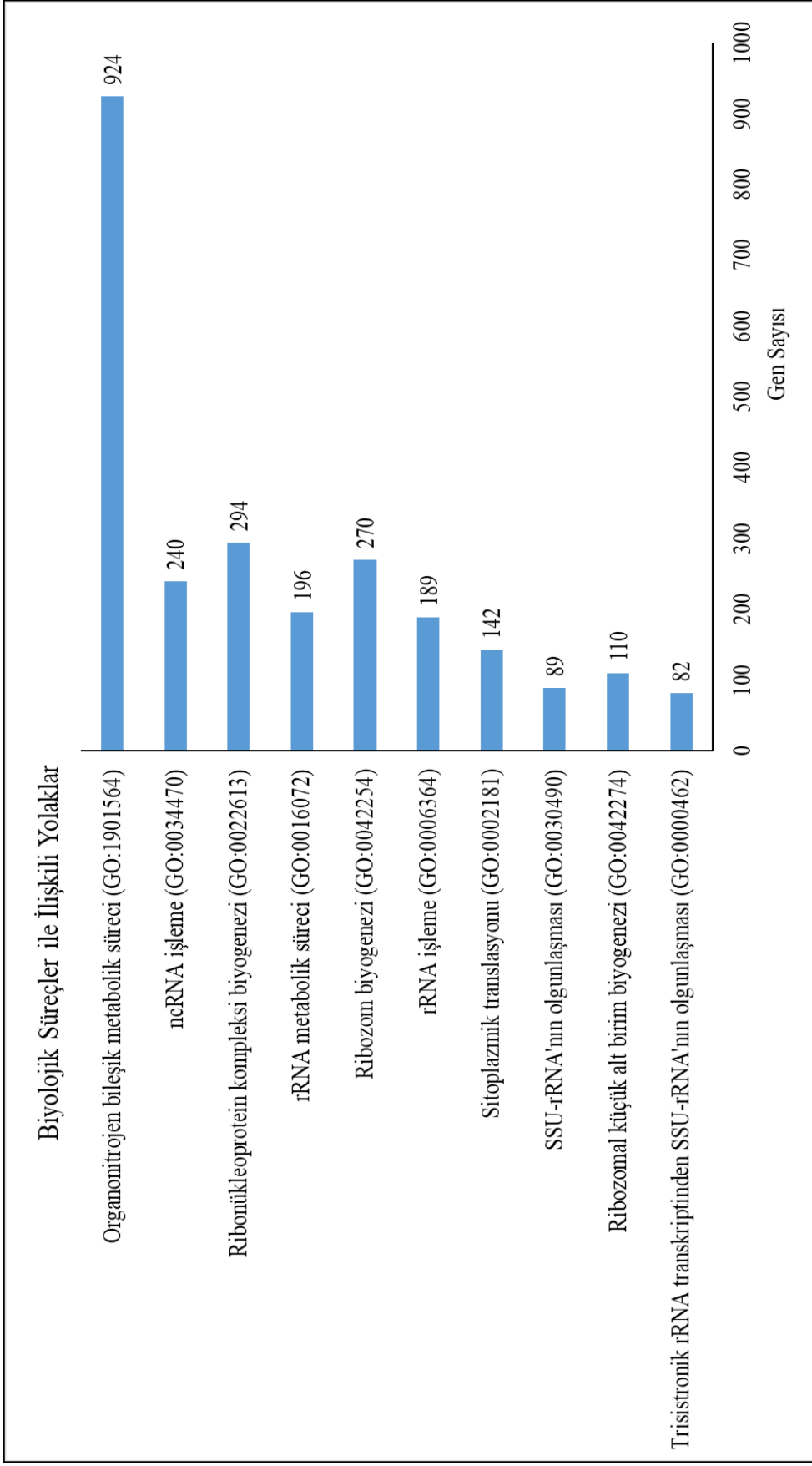
4.4.1. Hücre Döngüsünün GO Analizi

Gen ontolojisi, gen işlevini tanımlamak için kullanılan kavramları/sınıfları ve bu kavramlar arasındaki ilişkileri tanımlamaktadır. Gen ontolojisi analizi ile ifadesi değişen genler üç farklı özelliğe göre gruplandırılırlar. (1) Moleküler Fonksiyon (Molecular Function, MF): Gen ürünlerinin moleküler aktivitelerini kapsar, (2) Hücresel Bileşen (Cellular Component, CC): Gen ürünlerinin hücrede bulunduğu yerleri kapsar, (3) Biyolojik Süreç (Biological Process, BP): Çoklu gen ürünlerinin faaliyetlerinden oluşan yolları ve daha büyük süreçleri içerir.

Gen ontoloji analizi sonuçlarına göre biyolojik süreçte en çok değişim gösteren ilk 10 grupta bulunan genlerin sayıları Şekil 36'da verildi. GO analizi sonucunda biyolojik süreçlerde görevli genlerden 924 tanesinin organonitrojen bileşik metabolik süreçte, 294 genin ribonükleoprotein kompleksinin biyogenezi sürecinde, 270 genin ribozom biyogenezi sürecinde, 240 genin ncRNA işleme sürecinde, 196 genin rRNA metabolik sürecinde, 189 genin rRNA işleme sürecinde, 142 genin sitoplazmik translasyon sürecinde, 110 genin ribozomal küçük alt birim biyogenezi sürecinde, 89 genin SSU-rRNA'nın olgunlaşması

sürecinde ve 82 genin trisistronik rRNA transkriptinden SSU-rRNA'nın olgunlaşması sürecinde görevli olduğu belirlendi.

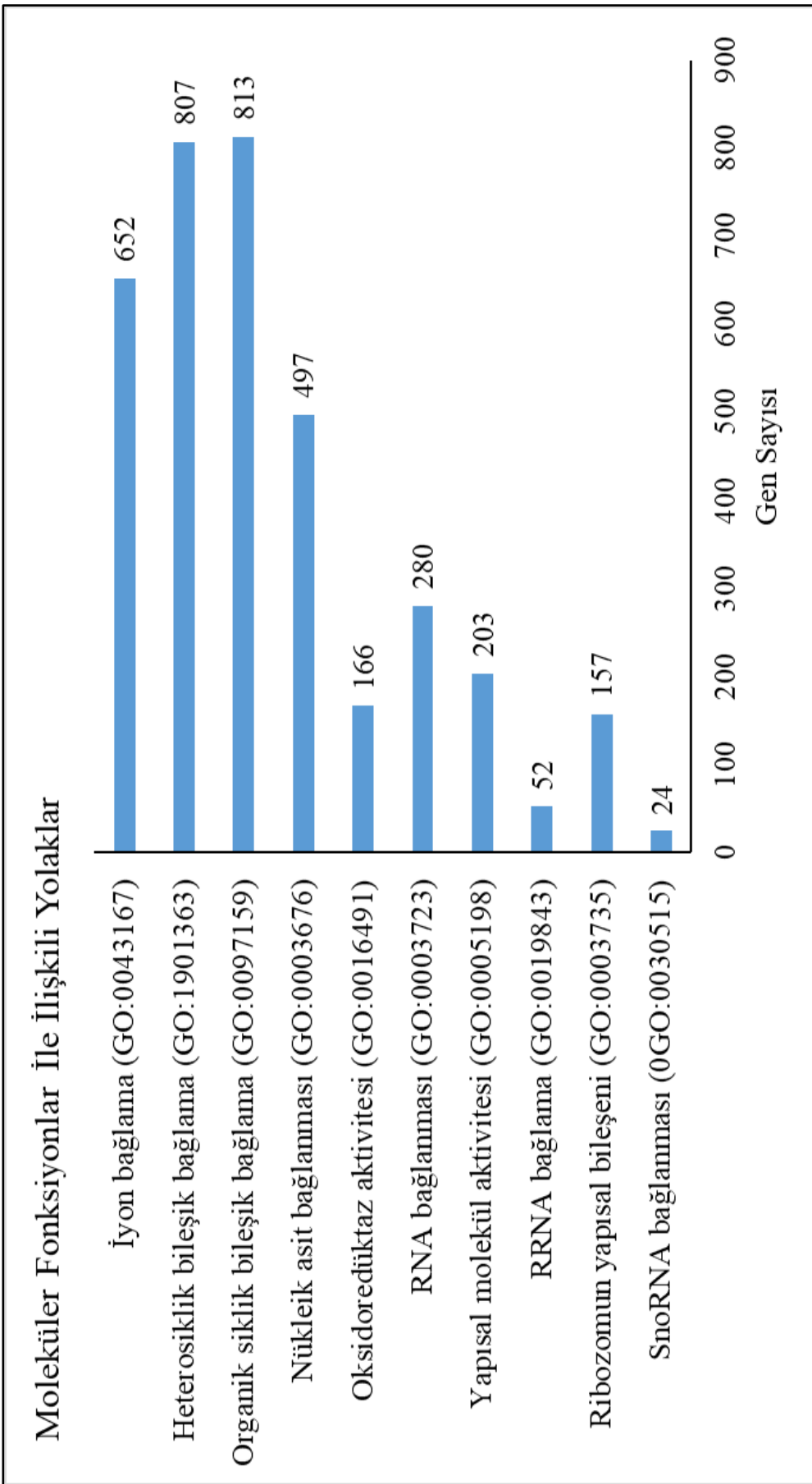




Şekil 36. Hücre döngüsünde görevli (FD \geq 2) genlerin GO analizi sonrası Biyolojik Süreçlere göre dağılımı

Gen ontoloji analizi sonuçlarına göre moleküler fonksiyonda en çok değişim gösteren ilk 10 grupta bulunan genlerin sayıları Şekil 37’de verildi. Moleküler fonksiyonuna göre oluşturulan grupta 813 genin organik siklik bileşik bağlama fonksiyonuna, 807 genin heterosiklik bileşik bağlama fonksiyonuna, 652 genin iyon bağlama fonksiyonuna, 497 genin nükleik asit bağlanması fonksiyonuna, 280 genin RNA bağlanması fonksiyonuna, 203 genin yapısal molekül aktivitesi fonksiyonuna, 166 genin oksidoredüktaz aktivitesi fonksiyonuna, 157 genin ribozomun yapısal bileşeni olma fonksiyonuna, 52 genin rRNA bağlama fonksiyonuna, 24 genin snoRNA bağlanması fonksiyonuna sahip olduğu tespit edildi.

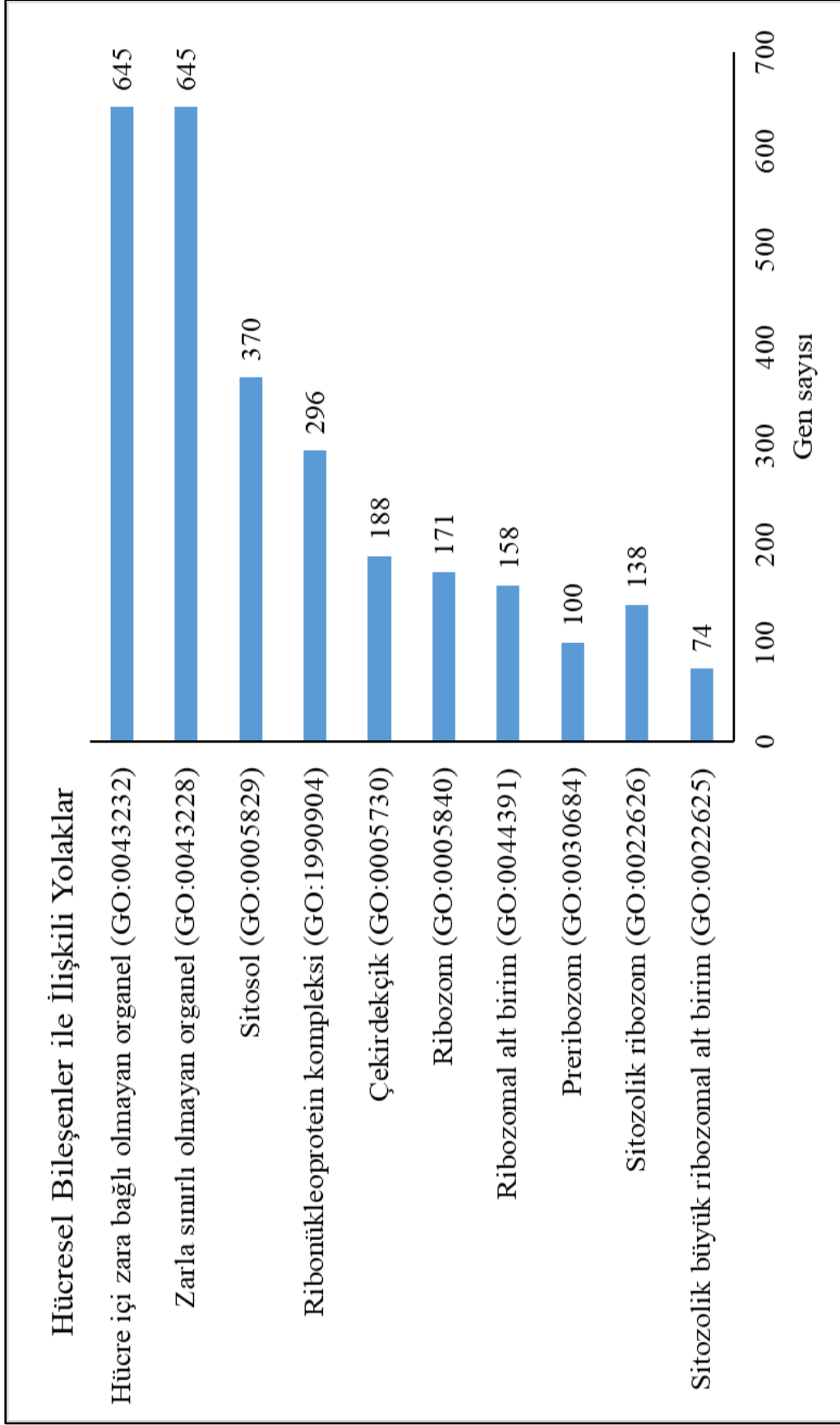




Şekil 37. Hücre döngüsünde görevli (FD \geq 2) genlerin GO analizi sonrası Moleküler Fonksiyonlarına göre dağılımı

Hücre döngüsünde görevli olan genlerin Hücresel Bileşen analiz sonucuna göre en çok değişim gösteren ilk 10 grupta bulunan genlerin sayıları Şekil 38’de verildi. 645 genin hücre içi zarla bağlı olmayan organel yapısında, 645 genin zarla sınırlı olmayan organel yapısında, 370 genin sitosolde, 296 genin ribonükleoprotein kompleksinin yapısında, 188 genin çekirdekçikte, 171 genin ribozom yapısında, 158 genin ribozomal alt biriminde, 138 genin sitozolik ribozomlarda, 100 genin preribozom yapısında, 74 genin Sitosolik büyük ribozomal alt birim yapısında bulunduğutespit edildi.





Şekil 38. Hücre döngüsünde görevli (FD \geq 2) genlerin GO analizi sonrası Hücresel Bileşenlerine göre dağılımı

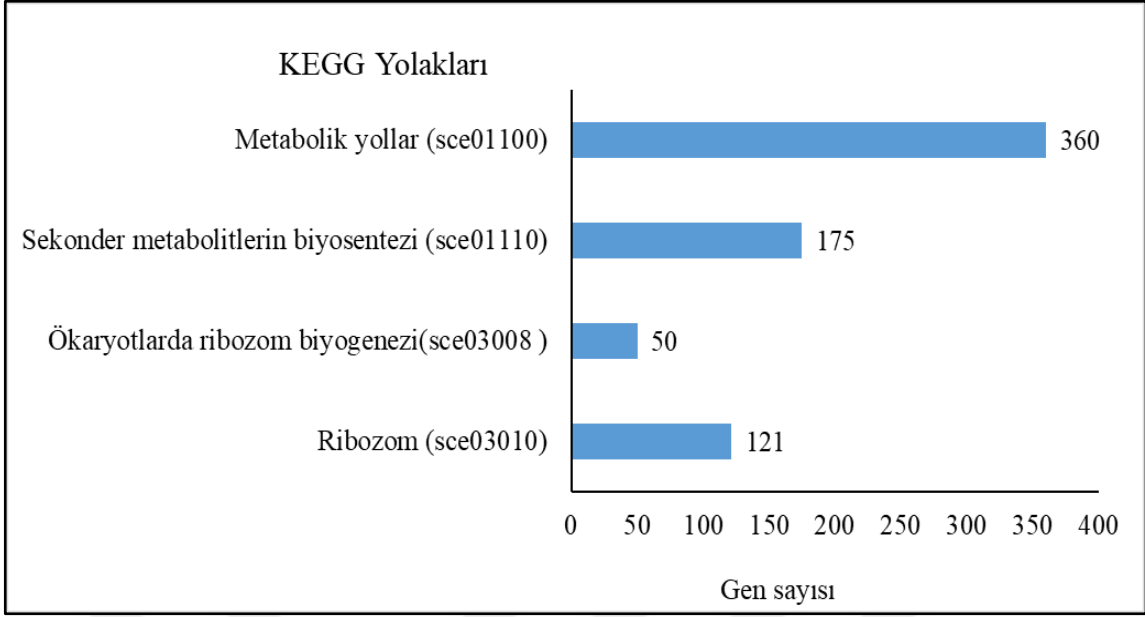
4.4.2. Hücre Döngüsünün KEGG Analizi

Yolak analizi, bir moleküler yolak içinde yer alan proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonunun, deney ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterip göstermediğini belirlemek için yapılır. Böylece bir yolaktaki gen ekspresyonundaki değişiklikleri inceleyerek biyolojik gruplar arasındaki fenotip farklılıkları belirlenmiş olur.

Hücre döngüsünün düzenlenmesinde görevli olan genlerin transkriptom analizi sonucunda 2 kat ve üzerinde değişim gösteren 2536 genin KEGG yolak analizi ve GO analizi Shyni GO 76.3 çevrimiçi program kullanılarak yapıldı.

Hücre döngüsünde ve regülasyonunda görevli genlerin KEGG yolak analizi sonrası elde edilen yollar ve gen sayıları Şekil 39'da verildi. Hücre döngüsünde görevli 2 kat ve üzeri ifade değişimi olan genlerin KEGG analiz sonuçlarına göre, 360 genin metabolik yollarda, 175 genin sekonder metabolit biyosentezinde, 121 genin ribozom yollarında ve 50 genin ribozom biyogeneziinde bulunduğu belirlendi.

Gen ekspresyonunun değişim seviyesine göre sırasıyla ekspresyon değişimi gösteren metabolik yollar ise ribozom biyogenezi (121 gen), ökaryotlarda ribozom biyogenezi (50 gen), sekonder metabolitlerin biyosentezi (175 gen) ve metabolik yollar (360 gen) olarak belirlendi. Ribozom yolağında değişim gösteren genlerin listesi Tablo 12'de, ökaryotlarda ribozom biyogenezi yolağında değişim gösteren genlerin listesi Tablo 13'e, sekonder metabolitlerin biyosentezi yolağında değişim gösteren genlerin listesi Tablo 14'te ve metabolik yollarda değişim gösteren genlerin listesi Tablo 15'te verildi.



Şekil 39. Hücre döngüsünde görevli 2 kat ve üzeri değişim gösteren genlerin KEGG analiz sonuçları

Tablo 12

Ribozom metabolik yolağında ekspresyon değişimi gösteren genler

KEGG Yolağı	Gen Kodu					
Ribozom (sce03010)	<i>RPL32</i>	<i>RPP2B</i>	<i>RPL26B</i>	<i>RPL14A</i>	<i>RPS17A</i>	<i>RPL25</i>
	<i>RPL4A</i>	<i>MRP20</i>	<i>RPL11B</i>	<i>RPS27A</i>	<i>YML6</i>	<i>RPL3</i>
	<i>RPS11B</i>	<i>RPL12B</i>	<i>RPL24B</i>	<i>RPL17A</i>	<i>RPS1B</i>	<i>RPS7A</i>
	<i>MRPS9</i>	<i>RPS17B</i>	<i>RPS0A</i>	<i>RPS21A</i>	<i>RPL6A</i>	<i>MRPL23</i>
	<i>RPS6B</i>	<i>RPS18A</i>	<i>RPL14B</i>	<i>RPL8B</i>	<i>RPL13B</i>	<i>RPS28A</i>
	<i>RPS9B</i>	<i>RPL27B</i>	<i>RPS20</i>	<i>RPL15A</i>	<i>RPS16A</i>	<i>RPL33B</i>
	<i>RPL21A</i>	<i>RPL37B</i>	<i>RPL8A</i>	<i>RPS0B</i>	<i>MRPS17</i>	<i>RPS10A</i>
	<i>RPS14A</i>	<i>RPL34A</i>	<i>RPL27A</i>	<i>RPL22A</i>	<i>RPL36A</i>	<i>RPS12</i>
	<i>RPS29B</i>	<i>RPS8B</i>	<i>RPS27B</i>	<i>RPL10</i>	<i>RPS10B</i>	<i>MRPS16</i>
	<i>RPL31A</i>	<i>RPL23B</i>	<i>RPL42B</i>	<i>RPS31</i>	<i>RPL9B</i>	<i>RPL21B</i>
	<i>RPP1A</i>	<i>RPS26B</i>	<i>RPS4B</i>	<i>RPL37A</i>	<i>RPL16B</i>	<i>RPS9A</i>
	<i>RPL13A</i>	<i>RPL22B</i>	<i>RPL2B</i>	<i>RPS28B</i>	<i>RPS7B</i>	<i>RPL5</i>
	<i>RPP1B</i>	<i>RPL30</i>	<i>RPL34B</i>	<i>RPS30A</i>	<i>RPS3</i>	<i>RPL33A</i>
	<i>RPL41B</i>	<i>RPL24A</i>	<i>RPS24B</i>	<i>RPL38</i>	<i>MRPL10</i>	<i>RPL7B</i>
	<i>RPL35B</i>	<i>RPL7A</i>	<i>RPL16A</i>	<i>RPP0</i>	<i>RPL18B</i>	<i>RPL11A</i>
	<i>MRPL11</i>	<i>RPL28</i>	<i>RPL40A</i>	<i>RPL26A</i>	<i>RPS19B</i>	<i>RPS23B</i>
	<i>RPL4B</i>	<i>RPS2</i>	<i>RPS21B</i>	<i>RPS22B</i>	<i>MRPS18</i>	
	<i>RSM10</i>	<i>RPL1B</i>	<i>RPL17B</i>	<i>RPS29A</i>	<i>MRPS12</i>	
	<i>RPS13</i>	<i>RPL9A</i>	<i>RPS22A</i>	<i>RPL31B</i>	<i>RPP2A</i>	
	<i>MRX14</i>	<i>RPS26A</i>	<i>RPS14B</i>	<i>RPS1A</i>	<i>RPS15</i>	
	<i>MRPL1</i>	<i>RPS25A</i>	<i>RPS5</i>	<i>RPL6B</i>	<i>RPS19A</i>	

Tablo 13

Ökaryotlarda ribozom biyogenezi metabolik yolağında ekspresyon değişimi gösteren genler

KEGG Yolağı	Gen Kodu				
Ökaryotlarda Ribozom Biyogenezi (sce03008)	<i>POP8</i>	<i>NUG1</i>	<i>UTP9</i>	<i>NOP56</i>	<i>POP3</i>
	<i>POP7</i>	<i>LSG1</i>	<i>UTP18</i>	<i>UTP13</i>	<i>NOG2</i>
	<i>PWP2</i>	<i>POP6</i>	<i>UTP10</i>	<i>UTP21</i>	<i>RCL1</i>
	<i>NOP1</i>	<i>UTP22</i>	<i>MPP10</i>	<i>UTP14</i>	<i>GSP2</i>
	<i>NHP2</i>	<i>UTP8</i>	<i>RIX7</i>	<i>UTP15</i>	<i>NOP58</i>
	<i>UTP4</i>	<i>RNH70</i>	<i>SDO1</i>	<i>RNT1</i>	<i>NOP4</i>
	<i>UTP5</i>	<i>RPP1</i>	<i>DIP2</i>	<i>IMP4</i>	<i>NOG1</i>
	<i>UTP6</i>	<i>GAR1</i>	<i>RMP1</i>	<i>KRE33</i>	<i>NANI</i>
	<i>SNM1</i>	<i>IMP3</i>	<i>CBF5</i>	<i>RIA1</i>	<i>HRR25</i>
	<i>SNU13</i>	<i>NMD3</i>	<i>EMG1</i>	<i>POP1</i>	<i>BMS1</i>

Tablo 14

Sekonder metabolitlerin biyosentezi metabolik yolağında ekspresyon değişimi gösteren genler

KEGG Yolağı	Gen Kodu					
Sekonder Metabolitlerin Biyosentezi (sce01110)	<i>ACS1</i>	<i>ARO3</i>	<i>STR3</i>	<i>PHS1</i>	<i>IMD4</i>	<i>MDH2</i>
	<i>BDH1</i>	<i>HEM13</i>	<i>ADE5,7</i>	<i>ACO2</i>	<i>HMG1</i>	<i>ARG8</i>
	<i>BDH2</i>	<i>HEM12</i>	<i>HXK2</i>	<i>MET3</i>	<i>TSL1</i>	<i>RIB4</i>
	<i>SCT1</i>	<i>TPS2</i>	<i>MCY1</i>	<i>BAT2</i>	<i>COQ5</i>	<i>RK11</i>
	<i>RIB1</i>	<i>SDH4</i>	<i>NQM1</i>	<i>UGP1</i>	<i>ERG13</i>	<i>LEU9</i>
	<i>PRS4</i>	<i>HEM1</i>	<i>ERG25</i>	<i>OAR1</i>	<i>ADH3</i>	<i>IDH2</i>
	<i>NTH2</i>	<i>FMN1</i>	<i>CTT1</i>	<i>FBA1</i>	<i>PGM2</i>	<i>LSC1</i>
	<i>COQ1</i>	<i>DPP1</i>	<i>CYS4</i>	<i>YNK1</i>	<i>HFD1</i>	<i>HEM15</i>
	<i>RFS1</i>	<i>INM2</i>	<i>TDA10</i>	<i>MDH1</i>	<i>SHH3</i>	<i>MOD5</i>
	<i>TPS1</i>	<i>PRO1</i>	<i>SER2</i>	<i>AAT1</i>	<i>PAH1</i>	<i>PRO2</i>
	<i>ADH5</i>	<i>ASP1</i>	<i>LSC2</i>	<i>SDH3</i>	<i>ALD3</i>	<i>PYK2</i>
	<i>TYR1</i>	<i>STE14</i>	<i>SOL4</i>	<i>SDH1</i>	<i>ALD2</i>	<i>ALD4</i>
	<i>MET8</i>	<i>SAM2</i>	<i>ENO1</i>	<i>GLG1</i>	<i>GCV2</i>	<i>ALD6</i>
	<i>PDB1</i>	<i>LPP1</i>	<i>COQ6</i>	<i>GPT2</i>	<i>ERG2</i>	<i>CAR1</i>
	<i>HIS7</i>	<i>EMI2</i>	<i>ARG4</i>	<i>MET1</i>	<i>GAD1</i>	<i>SAM4</i>
	<i>ILV6</i>	<i>PAD1</i>	<i>INM1</i>	<i>TGL4</i>	<i>TPS3</i>	<i>CIT3</i>
	<i>GLK1</i>	<i>GLC3</i>	<i>PAN5</i>	<i>SDH2</i>	<i>RCE1</i>	<i>ATH1</i>
	<i>CHA1</i>	<i>HEM14</i>	<i>ERG9</i>	<i>MHT1</i>	<i>PRM15</i>	<i>ARO7</i>
	<i>YCP4</i>	<i>PRO3</i>	<i>BAT1</i>	<i>ERG3</i>	<i>ADE4</i>	<i>ASN1</i>
	<i>CIT2</i>	<i>HOM3</i>	<i>IMD2</i>	<i>ERG27</i>	<i>IDH1</i>	<i>GPH1</i>
	<i>SOL2</i>	<i>HIS1</i>	<i>HIS6</i>	<i>PUT1</i>	<i>LAT1</i>	
	<i>GPM2</i>	<i>ICL1</i>	<i>SER33</i>	<i>ACS2</i>	<i>ZWF1</i>	
	<i>GPD1</i>	<i>ARG5,6</i>	<i>KGD1</i>	<i>ASP3-4</i>	<i>GOR1</i>	
	<i>FAD1</i>	<i>COX15</i>	<i>GUT2</i>	<i>IDP2</i>	<i>PHA2</i>	
	<i>MDH3</i>	<i>ADK2</i>	<i>POT1</i>	<i>SAM1</i>	<i>CIT1</i>	
	<i>THI3</i>	<i>AGX1</i>	<i>SUC2</i>	<i>PNP1</i>	<i>GPM3</i>	
	<i>LYS20</i>	<i>GSY1</i>	<i>DAL7</i>	<i>GSY2</i>	<i>ARG1</i>	
	<i>NUS1</i>	<i>HIS2</i>	<i>TDH1</i>	<i>FBP1</i>	<i>GPD2</i>	
	<i>NTH1</i>	<i>HXK1</i>	<i>ARG2</i>	<i>CAR2</i>	<i>ADH1</i>	
	<i>PST2</i>	<i>IRC7</i>	<i>ARG3</i>	<i>AMD1</i>	<i>COQ3</i>	

Tablo 15

Metabolik Yolaklarda ekspresyon değişimi gösteren genler

KEGG Yolağı	Gen Kodu						
	<i>CYS3</i>	<i>ATP16</i>	<i>PRO3</i>	<i>QCR10</i>	<i>PMT4</i>	<i>IMD4</i>	<i>RIB4</i>
	<i>CYC3</i>	<i>GPM2</i>	<i>PHM8</i>	<i>ARG4</i>	<i>BAT2</i>	<i>DAK1</i>	<i>HST3</i>
	<i>ACS1</i>	<i>DIA3</i>	<i>HOM3</i>	<i>PUT2</i>	<i>MET14</i>	<i>HMG1</i>	<i>GLO4</i>
	<i>GDH3</i>	<i>FAD1</i>	<i>HIS1</i>	<i>INM1</i>	<i>ATP7</i>	<i>ALO1</i>	<i>CYT1</i>
	<i>PHO11</i>	<i>MDH3</i>	<i>CEM1</i>	<i>COX6</i>	<i>URA6</i>	<i>TSL1</i>	<i>CDC21</i>
	<i>SCT1</i>	<i>THI3</i>	<i>ICL1</i>	<i>PAN5</i>	<i>UGP1</i>	<i>COQ5</i>	<i>RK11</i>
	<i>FMT1</i>	<i>PMT5</i>	<i>ARG5,6</i>	<i>QNS1</i>	<i>OAR1</i>	<i>ERG13</i>	<i>LEU9</i>
	<i>ACH1</i>	<i>DLD1</i>	<i>COX15</i>	<i>GEP4</i>	<i>FBA1</i>	<i>FMS1</i>	<i>GCY1</i>
	<i>RIB1</i>	<i>LYS20</i>	<i>ADK2</i>	<i>GRE3</i>	<i>YNK1</i>	<i>ARA2</i>	<i>IDH2</i>
	<i>URA7</i>	<i>GDH2</i>	<i>BST1</i>	<i>DCD1</i>	<i>MDH1</i>	<i>ADH3</i>	<i>LSC1</i>
	<i>COR1</i>	<i>GUD1</i>	<i>AGX1</i>	<i>ERG9</i>	<i>YJU3</i>	<i>SNO1</i>	<i>THI80</i>
	<i>PRX1</i>	<i>NTH1</i>	<i>DAK2</i>	<i>PPX1</i>	<i>GFA1</i>	<i>PGM2</i>	<i>ISN1</i>
	<i>PRS4</i>	<i>DAS2</i>	<i>GSY1</i>	<i>BAT1</i>	<i>AAT1</i>	<i>HFD1</i>	<i>HEM15</i>
	<i>PET112</i>	<i>PST2</i>	<i>FAB1</i>	<i>PHO12</i>	<i>SDH3</i>	<i>SHH3</i>	<i>DGA1</i>
	<i>ALG3</i>	<i>ARO3</i>	<i>HIS2</i>	<i>IMD2</i>	<i>SDH1</i>	<i>PAH1</i>	<i>TUM1</i>
	<i>BNA4</i>	<i>HEM13</i>	<i>MET10</i>	<i>HIS6</i>	<i>GLG1</i>	<i>ALD3</i>	<i>PAC1</i>
	<i>ATP1</i>	<i>HEM12</i>	<i>QCR6</i>	<i>DFG10</i>	<i>GPT2</i>	<i>ALD2</i>	<i>MOD5</i>
	<i>NTH2</i>	<i>TPS2</i>	<i>HXK1</i>	<i>SER33</i>	<i>MET1</i>	<i>GCV2</i>	<i>FAA1</i>
	<i>MNN2</i>	<i>EK11</i>	<i>IRC7</i>	<i>SGA1</i>	<i>TGL4</i>	<i>ERG2</i>	<i>PMT3</i>
	<i>GAL1</i>	<i>SDH4</i>	<i>CWH41</i>	<i>PFK26</i>	<i>COX17</i>	<i>GUA1</i>	<i>PRO2</i>
	<i>CHS3</i>	<i>CDC1</i>	<i>PNC1</i>	<i>AYR1</i>	<i>GPI13</i>	<i>FAA4</i>	<i>PYK2</i>
	<i>ETR1</i>	<i>HST4</i>	<i>OCH1</i>	<i>KGD1</i>	<i>SDH2</i>	<i>GAD1</i>	<i>ALD4</i>
	<i>ATP3</i>	<i>CAB5</i>	<i>ALG13</i>	<i>POT1</i>	<i>MHT1</i>	<i>COX7</i>	<i>HST2</i>
	<i>RFS1</i>	<i>HEM1</i>	<i>OLE1</i>	<i>SUC2</i>	<i>MEU1</i>	<i>TPS3</i>	<i>PMA2</i>
	<i>ALG14</i>	<i>FMN1</i>	<i>PYC1</i>	<i>NIT1</i>	<i>ERG3</i>	<i>PRM15</i>	<i>ALD6</i>
	<i>MIS1</i>	<i>MNN10</i>	<i>ALG2</i>	<i>IMA3</i>	<i>MNL2</i>	<i>GPI12</i>	<i>GPI2</i>
	<i>PHO3</i>	<i>EXG2</i>	<i>STR3</i>	<i>DAL7</i>	<i>ERG27</i>	<i>ADE4</i>	<i>ATP4</i>
	<i>YSA1</i>	<i>GLO2</i>	<i>COX4</i>	<i>GTT1</i>	<i>PUT1</i>	<i>NCE103</i>	<i>YDC1</i>
	<i>TPS1</i>	<i>INM2</i>	<i>COX13</i>	<i>CYR1</i>	<i>SPE4</i>	<i>IDH1</i>	<i>CAR1</i>
	<i>ADH5</i>	<i>SUR2</i>	<i>SDT1</i>	<i>RNR2</i>	<i>ACS2</i>	<i>LAP2</i>	<i>COX11</i>
	<i>ARA1</i>	<i>ATP5</i>	<i>ADE5,7</i>	<i>AIM22</i>	<i>ASP3-4</i>	<i>ALG11</i>	<i>PPT2</i>
	<i>TYR1</i>	<i>PRO1</i>	<i>HXK2</i>	<i>TDH1</i>	<i>IDP2</i>	<i>COX5A</i>	<i>SPT14</i>
	<i>YPC1</i>	<i>ASP1</i>	<i>MCY1</i>	<i>BNA3</i>	<i>SAM1</i>	<i>LAT1</i>	<i>THI6</i>
	<i>MET8</i>	<i>ATP17</i>	<i>UGA1</i>	<i>ARG2</i>	<i>PNP1</i>	<i>NRK1</i>	<i>ALG5</i>
	<i>PYC2</i>	<i>ARO10</i>	<i>CAX4</i>	<i>ARG3</i>	<i>BNA5</i>	<i>AAH1</i>	<i>ATP15</i>
	<i>PDB1</i>	<i>URH1</i>	<i>NQM1</i>	<i>GWT1</i>	<i>GSY2</i>	<i>URE2</i>	<i>SAM4</i>
	<i>PCS60</i>	<i>DOT1</i>	<i>ERG25</i>	<i>PHS1</i>	<i>LCB5</i>	<i>ZWF1</i>	<i>CIT3</i>
	<i>ROT2</i>	<i>SAM2</i>	<i>CTT1</i>	<i>LSB6</i>	<i>CTS1</i>	<i>FOL1</i>	<i>PDH1</i>
	<i>HIS7</i>	<i>EMI2</i>	<i>CYS4</i>	<i>URA2</i>	<i>ATP14</i>	<i>GOR1</i>	<i>ATH1</i>
	<i>DUT1</i>	<i>QCR7</i>	<i>RNR4</i>	<i>LCB3</i>	<i>ECM38</i>	<i>PHA2</i>	<i>ARO7</i>
	<i>TSC10</i>	<i>APA2</i>	<i>QCR9</i>	<i>FBP26</i>	<i>CDA1</i>	<i>CIT1</i>	<i>ASN1</i>
	<i>PGS1</i>	<i>PAD1</i>	<i>XKS1</i>	<i>QCR8</i>	<i>NMA1</i>	<i>LRO1</i>	<i>GPH1</i>

Metabolik
Yolaklar
(sce01100)

Tablo 15

Metabolik Yolaklarda ekspresyon değişimi gösteren genler (devam)

KEGG Yolağı	Gen Kodu						
Metabolik Yolaklar (sce01100)	<i>ILV6</i>	<i>GLC3</i>	<i>PCT1</i>	<i>MNN11</i>	<i>FKS1</i>	<i>BIO4</i>	<i>MET16</i>
	<i>GLK1</i>	<i>RIP1</i>	<i>TDA10</i>	<i>ACO2</i>	<i>FBP1</i>	<i>BIO3</i>	<i>GDB1</i>
	<i>APA1</i>	<i>BUD16</i>	<i>SER2</i>	<i>IMA5</i>	<i>COX8</i>	<i>GPM3</i>	<i>QCR2</i>
	<i>PBN1</i>	<i>ANP1</i>	<i>LSC2</i>	<i>MET3</i>	<i>CAR2</i>	<i>ARG1</i>	
	<i>CHA1</i>	<i>CYC7</i>	<i>SOL4</i>	<i>GPI14</i>	<i>GAB1</i>	<i>MET22</i>	
	<i>YCP4</i>	<i>DSF1</i>	<i>ENO1</i>	<i>CDC8</i>	<i>GLO1</i>	<i>ADH1</i>	
	<i>CIT2</i>	<i>MNN1</i>	<i>COQ6</i>	<i>HAM1</i>	<i>APT1</i>	<i>COQ3</i>	
	<i>ATG15</i>	<i>HEM14</i>	<i>MES1</i>	<i>ATP2</i>	<i>AMD1</i>	<i>MDH2</i>	
	<i>SOL2</i>	<i>FAA2</i>	<i>GUT1</i>	<i>MET5</i>	<i>CYB2</i>	<i>ARG8</i>	

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

TOR sinyal sistemi besin miktarına ve içeriğine bağlı olarak hücrelerin büyümesini ayarlayan merkezi sinyal sistemi olup aynı zamanda farklı streslerin algılanmasında ve cevap oluşturulmasında görev almaktadır. Maya hücrelerinde *TOR* kompleksi ribozom biyosentezi ve düzenlenmesi, amino asit alımı ve metabolizması, hücre döngüsünün ilerlemesi, otofajinin baskılanması ve hücrel stres cevabının oluşturulması gibi fizyolojik proseslerde görev almaktadır. Tamamlanan tez çalışması kapsamında *S. cerevisiae* maya hücrelerinde *TOR1* geninin yokluğunda hücre döngüsünün ilerlemesinde ve düzenlenmesinde görev alan genlerin transkriptomik analizi yapıldı. *S. cerevisiae* hücre döngüsünde görevli genler Cycle Base veri tabanından alınarak transkriptom verisi ile birlikte analiz edildi. Analiz sonrası hücre döngüsünde görevli toplam 6137 ORF'den 623 tanesi (G1 safhasından 191 gen, S safhasından 140 gen, G2 safhasından 169 gen ve M safhasından 123 gen) RNA seq verisinde okuma alınmadığı için daha sonraki analizlerde kullanılmadı. Çalışmada gen ekspresyon değişim oranı iki kat ve üzerindeki ($FD \geq 2$) değerler için anlamlı kabul edildiğinden bu değerlerin altında değişim gösteren ($FD < 2$) 4361 gen (G1 safhasından 769 gen, S safhasından 710 gen, G2 safhasından 1568 gen ve M safhasından 1314 gen) ekspresyon değişimi göstermeyen genler olarak belirlendi. Hücre döngüsünde ve düzenlenmesinde görevli genlerden 2035 tanesinin (G1 safhasından 451 gen, S safhasından 291 gen, G2 safhasından 625 gen ve M safhasından 668 gen) 2 ile 10 kat arasında, 90 tanesinin (G1 safhasından 44 gen, S safhasından 5 gen, G2 safhasından 10 gen ve M safhasından 31 gen) 10 ile 50 kat arasında ve 10 tanesinin (G1 safhasından 8 gen, S safhasından 1 gen ve M safhasından 1 gen) 50 kat ve üzerinde ekspresyon değişimi gösterdiği belirlendi. Bazı genlerin tek bir hücre döngüsü safhasında bazı genlerin ise birden fazla safhada (örneğin 54 genin hem G1 hem de S safhasında, 62 genin hem G2 hem de S safhasında ve 133 genin hem G2 hem de M safhasında) görev aldığı gözlemlendi. *TOR1* geninin yokluğunda 10 kata kadar değişim gösteren genlerin %53'ünün ekspresyonunun arttığı %47'sinin ise ekspresyonunun azaldığı gözlenirken 10 kat ve üzerinde değişim gösteren genlerin %100'ünün ekspresyonunun arttığı belirlendi. *TOR1* geninin yokluğunda hücre döngüsünün ilerlemesinde ve düzenlenmesinde görev alan genlerin ağırlıklı olarak metabolik yollarda ve ribozom biyogenezi ile ilgili yollarda görevli oldukları gözlemlendi. Gen Ontoloji analizinin sonucunda ekspresyonu

değişen genlerin moleküler fonksiyonlarına bakıldığında ribozom yapısındaki proteinleri kodlayan genlerin baskılandığı gözlemlendi.

TOR1 geninin yokluğunda 99 genin ekspresyonunun 10 kat ve üzerinde artış gösterdiği 88 genin ise 2-10 kat arasında azaldığı belirlendi. *HXT4*, *HXT6*, *HXT7*, *HXK1*, *RCK1*, *HSP26*, *DDR2*, *TMA10* ve *YNL194C* genlerinin ekspresyonunun 50 kat üzerinde arttığı gözlemlendi. Tam olarak işlevi bilinmeyen *YMR206W*, *YIL136W*, *YDR070C* ve *YGR067C* genlerinin ekspresyonlarının Tor1p yokluğunda 20 kat ve üzerinde artmasından dolayı bu genlerin ilk defa TOR sinyal sistemi aracılığıyla kontrol edildiği gösterildi.

S. cerevisiae maya hücrelerinde glikoz alımı 20 genin kodladığı proteinlerden oluşan heksoz transport (HXT) ailesi tarafından gerçekleştirilmektedir. *HXT1-HXT17* ve *GAL2* olmak üzere toplam 18 gen tarafından kodlanan proteinler şekerlerin transportundan sorumlu iken *SNF3* ve *RGT2* genleri tarafından kodlanan proteinler şeker sensörleri olarak görev yapmaktadır (Boles ve Hollenberg, 1997). HXT ailesinin 6 üyesi (*HXT1*, *HXT2*, *HXT3*, *HXT4*, *HXT6* ve *HXT7*) ana heksoz taşıyıcıları olup stres içermeyen normal koşullarda hücre dışındaki glikoz miktarına bağlı olarak çalışırlar. Düşük glikoz konsantrasyonunda yüksek afiniteli Hxt6 ve Hxt7 proteinleri (high-affinity transporters), yüksek glikoz konsantrasyonunda düşük afiniteli Hxt1 ve Hxt3 proteinleri (low-affinity transporters) ve orta seviyedeki glikoz konsantrasyonunda orta afiniteli Hxt2, Hxt4 ve Hxt5 proteinleri (moderate-affinity transporters) glikozun hücre içine alınmasında görev alırlar. Glikoz miktarına ilave olarak ozmotik stres, besin açlığı ve hücrenin fizyolojik durumu HXT proteinlerinin ekspresyonunu etkilemektedir (Rep vd., 2000; Greatrix ve van Vuuren, 2006; Roy vd., 2014; Diderich vd., 1999). Yüksek ve orta afiniteli heksoz taşıyıcıları (Hxt2, Hxt4, Hxt5, Hxt6 ve Hxt7) yüksek glikoz konsantrasyonunda baskılanırken düşük glikoz konsantrasyonunda aktive olmaktadır. *HXT6* ve *HXT7* gen ekspresyonlarının durağan safhaya girerken arttığı ve bu safha süresince seviyesini koruduğu; glikoz miktarı yüksek olmasına rağmen azot açlığında sabit bir şekilde ekspres olduğu belirlenmiştir (Perez vd., 2005). Başka bir çalışmada ise *sch9Δ*, *tor1Δ* ve *ras2Δ* maya hücrelerinde durağan safhanın ikinci gününde yapılan DNA mikroarray analizinde *HXT2* ve *HXT4* gen ekspresyonları artarken *HXT6* ve *HXT7* gen ekspresyonlarının yaban tip maya hücrelerinde belirlenen seviye olduğu gözlemlenmiştir (Wei vd., 2009). Hücrelerin özellikle yavaş büyüme hızı

sergilediği durağan fazın uzatılmış G1 fazı ile benzerlik göstermektedir (Werner-Washburne vd., 1996). Bu nedenle durağan safhada belirlenen fizyolojik değişimlerin ve gen ekspresyon değişimlerinin hücre döngüsünün G1 fazında ve farklı stres koşullarında belirlenen fizyolojik değişimler ve gen ekspresyon değişimleri ile benzerlik göstermektedir (Herman, 2002). Düşük oksijen varlığında *HXT2*, *HXT4* ve *HXT5* genlerinin transkripsiyonunun azaldığı *HXT6*, *HXT13*, *HXT15* ve *HXT16* genlerinin transkripsiyonunun arttığı, diğer transporter genlerinin ise transkripsiyonlarında değişim olmadığı rapor edilmiştir (Rintala vd., 2008). Çalışmamızda logaritmik safhadaki (yüksek glikoz içeren ve stres içermeyen koşullarda) maya hücrelerinde gen ekspresyon değişimi belirlenmesine rağmen Tor1 proteinin yokluğu hücre içinde besin açlık sinyali oluşturmaktadır. Çalışmamızda Tor1p yokluğunda *HXT2* (41 kat), *HXT4* (53 kat), *HXT5* (31 kat), *HXT6* (77 kat), *HXT7* (78 kat), *HXT3* (5 kat) ve *HXT15* (2,4 kat) gen ekspresyonlarının arttığı gözlenirken diğer transporter genlerinin ekspresyonlarında anlamlı ($FD < 2$) bir değişim olmadığı belirlendi. Böylece ilk defa çalışmamız ile Tor1p yokluğunda özellikle yüksek ve orta afiniteli transporter proteinlerinin gen ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir.

S. cerevisiae genomunda hem aldo- hem de keto-heksozları fosforlayan heksokinaz izoenzimlerine (Hxk1 ve Hxk2) ilave olarak yalnızca aldoheksozları fosforlayan glukokinaz (Glk1) enzimi bulunmaktadır. Hxk1 ve Hxk2 proteinleri fosfoprotein yapısında olup Hxk2 aynı zamanda hücre içi glikoz sensörü olarak Mig1 represör kompleksinin yapısını ve aktivitesini kontrol etmektedir (Vega vd., 2016). Çalışmamızda *HXK1* (236 kat), *HXK2* (2 kat) ve *GLK1* (32 kat) genlerinin ekspresyonlarının Tor1p yokluğunda arttığı belirlenmiştir. Glikoz açlığı uygulamasından 60 dakika sonra Hxk1 mRNA miktarında artış gözlenirken Hxk2 mRNA miktarının azaldığı belirlenmiştir (Herrero vd., 1995). Hxk1 ve Hxk2 protein miktarları ile mRNA miktarları arasında büyük oranda paralellik olduğu yapılan proteomik çalışma ile gösterilmiştir (Müller vd., 2022). Ancak aynı çalışmada yüksek glikoz konsantrasyonunda Hxk2 baskın enzim iken düşük glikoz konsantrasyonunda Hxk1 ve Hxk2 enzimlerinin seviyesinin benzer olduğu, kısa vadede heksokinaz miktarları arasında fark olsa da uzun vadede hücre içindeki heksokinaz seviyesinin bir dengeye ulaştığı ve bu seviyede tutulduğu belirlenmiştir (Müller vd., 2022). *TDA1* geninin yokluğunda Hxk1 enzim miktarının azaldığı ve bu yüzden Tda1 proteininin Hxk2 proteinini fosforladığı gibi Hxk1 proteininin de fosforlanmasından sorumlu olduğu gösterilmiştir. (Müller vd., 2022). Tda1

kinaz H3 histon proteininin (Thr¹¹) fosforlamaktadır. Besin açlığında *HXK1* geninin kromozomal lokusunda bulunan H3 histonlarının Sch9 ve Cka1 kinaz bağımlı olarak fosforlanması nedeniyle *HXK1* transkripsiyonunun arttığı rapor edilmiştir (Oh vd., 2018; Oh vd., 2020). Tor1 proteini içeren TORC1 kompleksi Sch9 ve Tap42 proteini üzerinden iki ayrı yolla etkisini gösterir. Birinci yolda Sch9 kinazı aktiveleştirirken ikinci yolda Tap42 proteinini baskılar. Tor1p yokluğunda Sch9 kinaz çalışmazken Tap42 yolu aktif hale geçer. Bu nedenle Tor1p yokluğunda *HXK1* gen ekspresyonundaki artışın Sch9 kinaz bağımlı olmadığı görülmektedir. Ayrıca transkriptom analizinde Tor1p yokluğunda *SCH9* gen ekspresyonunun baskılandığı (benzer şekilde *CKA1* gen ekspresyonunda baskılandığı) belirlenmiştir. *HXK1* gen ekspresyonundaki artışın *HXT* genlerindeki artış gibi stres-cevap oluşumuna bağlı bir artış olması kuvvetle muhtemeldir. Ortamda glikoz düşük olduğunda veya hücreler fermente edilemeyen karbon kaynakları üzerinde büyürken *HXK1* geninin aşırı ifade edildiği bilinmektedir (Rodriguez vd. 2001). Farklı stres koşullarında *HXK1* geninin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Hacısalıhoğlu vd. 2019; de Lucena vd. 2015; Dong vd. 2017; Tekarslan vd. 2018). Koniferil aldehite (CA) dirençli *S. cerevisiae* maya hücrelerinde yapılan transkriptomik analiz sonrasında *HXT6*, *HXT7*, *HXT8*, *HXK1* ve *GLK1* genlerin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Hacısalıhoğlu vd. 2019). Başka bir çalışmada ise asetik asit ve sülfürik asit kullanılarak oluşturulan stres koşullarında *HXK1* geninin ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir (Dong vd. 2017; de Lucena vd. 2015). Benzer şekilde tuz stresine dirençli *S. cerevisiae* maya suşunda *HXT6*, *HXT7*, *HXK1* ve *GLK1* genlerinin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Tekarslan vd. 2018).

Farklı streslere karşı cevap oluşturulmasında görev alan *DDR2* geninin, ısı şoku proteini olan *HSP26* geninin ve oksidatif strese cevap oluşturulmasında görev alan *RCK1* geninin ekspresyonunun Tor1p yokluğunda yüksek oranda arttığı belirlenmiştir. *HSP42* ve *HSP26* ısı şoku proteinleri moleküler şaperonlar olup proteinlerin katlanmasında görev almalarına rağmen Hsp42p stres içeren ve içermeyen ortamlarda Hsp26p ise yalnızca stres koşullarında aktif olan bir proteindir. Bir diğer ısı şoku proteini olan Hsp12 ise hücre zarı proteini olup farklı stres koşullarında (ısı stresi, oksidatif stres, ozmotik stres, glikoz açlık stresi, DNA replikasyon stresi ve durağan safha gibi besin kısıtlaması içeren koşullarda) aktive olan bir proteindir. Çalışmamızda da Tor1p yokluğunda *HSP42* gen ekspresyonunun (4 kat), *HSP26* gen ekspresyonundan (53 kat) ve *HSP12* gen ekspresyonunun (42 kat) arttığı

belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda *HSP26* gen ekspresyonunun ısı stresinde Hsf1 transkripsiyon faktörü ile ve genel stres koşullarında Msn2/4 transkripsiyon faktörleri ile arttığı belirlenmiştir (Amorós ve Estruch, 2001). Ancak çalışmamızda *HSF1* ve *MSN4* gen ekspresyonlarının arttığı *MSN2* gen ekspresyonunun ise baskılandığı gözlenmiştir. Daha önce çinko eksikliği ile oluşturulan stres koşullarında $\Delta msn2msn4$ mutant maya hücrelerinde *HXT6*, *HXT7*, *HXK1*, *HSP12*, *HSP26*, *DDR2* ve *TMA10* gen ekspresyonlarının arttığı ve bu genlerin promotor bölgelerinde Msn2/4 transkripsiyon faktörlerinin bağlanabildiği STRE dizilerini içerdiği belirlenmiştir (Gauci vd., 2009). Ayrıca en yüksek gen ekspresyonunun henüz görevi bilinmeyen ancak dioksik ve durağan safhada ekspres edilen *EGO4* geninde (240 kat) olduğu gözlenmiştir. *EGO4* geninin promotör bölgesinde STRE elementleri bulunmakta olup çalışmamızda da 39 kat artış gösterdiği belirlenmiştir. Ribozom ile ilişkili olan ancak tam olarak fonksiyonu bilinmeyen Tma10 proteininin DNA replikasyon stresinde miktarı artmaktadır. Fermentasyon inhibitörü olan vanilin uygulaması ile oluşturulan stres koşullarında *TMA10*, *MCH2*, *SNG1* ve *GPH1* gen ekspresyonlarının arttığı, bu genlerin promotor bölgesinde Msn2/4 transkripsiyon faktörlerinin bağlanması için gerekli olan STRE dizilerinin bu artış için gerekli olduğu gösterilmiştir (Park ve Kim, 2015). Çalışmamızda Tor1p yokluğunda *GPH1* gen ekspresyonunun 47 kat arttığı, ancak diğer genlerin (*MCH2* ve *SNG1*) ekspresyonlarında anlamlı bir değişim olmadığı belirlendi.

Çalışmamızda integral plazma zar proteinini kodlayan *YNL194C* geninin ekspresyonunun (76 kat) Tor1p yokluğunda arttığı belirlenmiştir. Ayrıca *YNL194C* geni ile paralog olan ve mitokondri zarında lokalize olan integral protein için kodlu *FMP45* geninin ekspresyonunun da Tor1p yokluğunda 48 kat arttığı belirlenmiştir. Ancak diğer bir zar proteini olan *SUR7* geninin ekspresyonunun ise ancak 2,4 kat artış gösterdiği belirlendi. Daha önce yapılan çalışmalarda ozmotik stres koşullarında *YNL194C* ve *FMP45* genlerinin ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir (Runner ve Brewster, 2003; Posas vd., 2000; Szopinska vd., 2011).

TORC1 kompleksi Sch9 kinazı aktifleştirirken diğer bir kinaz olan Rim15 proteininin nükleusa geçişini engelleyerek sitoplazmada kalmasına neden olur. Rim15 kinaz, aktif Sch9 kinaz ile fosforlanarak sitoplazmada tutulduğu gibi direk TORC1 kompleksinin etkisi ile de sitoplazmada tutulabilir. Bu nedenle TORC1 kompleksinin Rim15 üzerindeki

etkisi Sch9 bağımlı veya bağımsız olabilir. Aktif Rim15 kinaz nükleer Msn2/4 proteinlerini fosforlayarak sitoplazmada kalmasını ve stres cevap genlerinin promotoruna bağlanarak transkripsiyonlarını aktive etmesine neden olur. Aynı zamanda aktif TORC1 kompleksi Bmh2p aracılığıyla Msn2/4 proteinlerinin sitoplazmada kalmasını sağlar. Tor1p yokluğunda aktif TORC1 kompleksi oluşmadığı için Msn2/4 proteinleri nükleusa geçer. Aynı zamanda TORC1 kompleksi Rim15 üzerindeki baskılayıcı etkisi kalmadığı için Rim15 kinaz nükleusa geçer ve nükleer Msn2/4 proteinlerinin STRE dizilerine bağlanmasını sağlar. Bu nedenle çalışmamızda ekspresyonu artan genlerin büyük olasılıkla Rim15 kinaz üzerinden Msn2/4 aracılığıyla gen ekspresyonlarının artması oldukça kuvvetli bir olasılıktır.



KAYNAKÇA

- Amorós, M., ve Estruch, F. (2001). “Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes HSP26 and HSP104 in a gene- and stress type-dependent manner”. *Molecular Microbiology*, 39(6), 1523–1532. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02339.x>
- Anders, S., Pyl, P. T., ve Huber, W. (2015). “HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data”. *Bioinformatics* (Oxford, England), 31(2), 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Andrews, S. (n.d.)” FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data”. Retrieved from <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Aronova, S., Wedaman, K., Aronov, P. A., Fontes, K., Ramos, K., Hammock, B. D., ve Powers, T. (2008). “Regulation of ceramide biosynthesis by TOR complex 2”. *Cell Metabolism*, 7(2), 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.11.015>
- Barbet, N. C., Schneider, U., Helliwell, S. B., Stansfield, I., Tuite, M. F., ve Hall, M. N. (1996). “TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast”. *Molecular Biology of The Cell*, 7(1), 25–42. <https://doi.org/10.1091/mbc.7.1.25>
- Berset, C., Trachsel, H., ve Altmann, M. (1998). “The TOR (target of rapamycin) signal transduction pathway regulates the stability of translation initiation factor eIF4G in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”. *Proceedings of The National Academy of Sciences ff The United States of America*, 95(8), 4264–4269. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4264>
- Bjornsti, M. A., ve Houghton, P. J. (2004). “The TOR pathway: a target for cancer therapy”. *Nature Reviews. Cancer*, 4(5), 335–348. <https://doi.org/10.1038/nrc1362>
- Bloom, J., ve Cross, F. R. (2007). “Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control”. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(2), 149–160. <https://doi.org/10.1038/nrm2105>
- Boles, E., ve Hollenberg, C. P. (1997). “The molecular genetics of hexose transport in yeasts”. *FEMS Microbiology Reviews*, 21(1), 85–111. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00346.x>
- Bolger, A. M., Lohse, M., ve Usadel, B. (2014). “Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data”. *Bioinformatics*, 30 (15), 2114-2120.

<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

- Bontron, S., Jaquenoud, M., Vaga, S., Talarek, N., Bodenmiller, B., Aebersold, R., ve De Virgilio, C. (2013). “Yeast endosulfines control entry into quiescence and chronological life span by inhibiting protein phosphatase 2A”. *Cell Reports*, 3(1), 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.11.025>
- Bosotti, R., Isacchi, A., ve Sonnhammer, E. L. (2000). “FAT: a novel domain in PIK-related kinases”. *Trends In Biochemical Sciences*, 25(5), 225–227. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)01563-2](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01563-2)
- Botstein, D., Chervitz, S. A., ve Cherry, J. M. (1997). “Yeast as a model organism”. *Science New York, N.Y.*, 277(5330), 1259–1260. <https://doi.org/10.1126/science.277.5330.1259>
- 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(1), 352–367. DOI:10.1091/mbc.e07-08-0779
- Brown, E. J., Albers, M. W., Shin, T. B., Ichikawa, K., Keith, C. T., Lane, W. S., ve Schreiber, S. L. (1994). “A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex”. *Nature*, 369(6483), 756–758. <https://doi.org/10.1038/369756a0>
- Busby, M. A., Gray, J. M., Costa, A. M., Stewart, C., Stromberg, M. P., Barnett, D., Chuang, J. H., Springer, M., ve Marth, G. T. (2011). “Expression divergence measured by transcriptome sequencing of four yeast species”. *BMC Genomics*, 12, 635. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-635>
- Byron, S. A., Van Keuren-Jensen, K. R., Engelthaler, D. M., Carpten, J. D., ve Craig, D. W. (2016). “Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: opportunities and challenges”. *Nature Reviews. Genetics*, 17(5), 257–271. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.10>
- Cafferkey, R., Young, P. R., McLaughlin, M. M., Bergsma, D. J., Koltin, Y., Sathe, G. M., Faucette, L., Eng, W. K., Johnson, R. K., ve Livi, G. P. (1993). “Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity”. *Molecular and Cellular Biology*, 13(10), 6012–6023. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.10.6012>
- Chang, F., ve Herskowitz, I. (1990). “Identification of a gene necessary for cell cycle arrest by a negative growth factor of yeast: *FAR1* is an inhibitor of a G1 cyclin, *CLN2*”.

- Cell*, 63(5), 999–1011. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90503-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90503-7)
- Chen, E. J., ve Kaiser, C. A. (2003). “LST8 negatively regulates amino acid biosynthesis as a component of the TOR pathway”. *The Journal of Cell Biology*, 161(2), 333–347. <https://doi.org/10.1083/jcb.200210141>
- Chen, K.C., Csikasz-Nagy, A., Gyorfyy, B., Val, J., Novak, B. ve Tyson, J.J. (2000). “Kinetic analysis of a molecular model of the budding yeast cell cycle”. *Molecular Biology of The Cell* 11:369-391. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.1.369>
- Chen, Y., Chen, H., Rhoad, A. E., Warner, L., Caggiano, T. J., Failli, A., Zhang, H., Hsiao, C. L., Nakanishi, K., ve Molnar-Kimber, K. L. (1994). “A putative sirolimus (rapamycin) effector protein”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 203(1), 1–7. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2140>
- Cherry, J. M., Hong, E. L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E. T., Christie, K. R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Engel, S. R., Fisk, D. G., Hirschman, J. E., Hitz, B. C., Karra, K., Krieger, C. J., Miyasato, S. R., Nash, R. S, Park J., Skrzypek, M. S., Simison, M., Weng, S., ve Wong, E. D. (2012) “*Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast”. *Nucleic Acids Research*, 40 (Database issue), D700-5. PMID: 22110037
- Cheung, T. H., ve Rando, T. A. (2013). “Molecular regulation of stem cell quiescence”. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 14(6), 329–340. <https://doi.org/10.1038/nrm3591>
- Chiu, M. I., Katz, H., ve Berlin, V. (1994). “RAP1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(26), 12574–12578. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.12574>
- Cloonan, N., Forrest, A. R., Kolle, G., Gardiner, B. B., Faulkner, G. J., Brown, M. K., Taylor, D. F., Steptoe, A. L., Wani, S., Bethel, G., Robertson, A. J., Perkins, A. C., Bruce, S. J., Lee, C. C., Ranade, S. S., Peckham, H. E., Manning, J. M., McKernan, K. J., ve Grimmond, S. M. (2008). “Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing”. *Nature Methods*, 5(7), 613–619. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1223>
- Crespo, J. L., Daicho, K., Ushimaru, T., Hall, M. N. (2001). “The GATA transcription factors GLN3 and GAT1 link TOR to salt stress in *Saccharomyces cerevisiae*”. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(37), 34441–34444.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M103601200>

- David, L., Huber, W., Granovskaia, M., Toedling, J., Palm, C. J., Bofkin, L., Jones, T., Davis, R. W., ve Steinmetz, L. M. (2006). “A high-resolution map of transcription in the yeast genome”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(14), 5320–5325. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601091103>
- De Lucena, R. M., Elsztein, C., de Barros Pita, W., de Souza, R. B., de Sá Leitão Paiva Júnior, S., ve de Moraes Junior, M. A. (2015). “Transcriptomic response of *Saccharomyces cerevisiae* for its adaptation to sulphuric acid-induced stress”. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 108(5), 1147–1160. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0568-2>
- De Virgilio C. (2012). “The essence of yeast quiescence”. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 306–339. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00287.x>
- De Virgilio, C., ve Loewith, R. (2006a). “Cell growth control: little eukaryotes make big contributions”. *Oncogene*, 25(48), 6392–6415. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209884>
- De Virgilio, C., ve Loewith, R. (2006b). “The TOR signalling network from yeast to man”. *The International Journal of Biochemistry Ve Cell Biology*, 38(9), 1476–1481. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.02.013>
- Delobel, P., ve Tesnière, C. (2014). “A simple FCM method to avoid misinterpretation in *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle assessment between G0 and sub-G1”. *Plos One*, 9(1), e84645. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084645>
- Diderich, J. A., Schepper, M., van Hoek, P., Luttik, M. A., van Dijken, J. P., Pronk, J. T., Klaassen, P., Boelens, H. F., de Mattos, M. J., van Dam, K., ve Kruckeberg, A. L. (1999). “Glucose uptake kinetics and transcription of HXT genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*”, 274(22), 15350–15359. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.22.15350>
- Dong, Y., Hu, J., Fan, L., ve Chen, Q. (2017). “RNA-Seq-based transcriptomic and metabolomic analysis reveal stress responses and programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*.” *Scientific Reports*, 7, 42659–. <https://doi.org/10.1038/srep42659>
- Engel, S. R., Dietrich, F. S., Fisk, D. G., Binkley, G., Balakrishnan, R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Hitz, B. C., Karra, K., Nash, R. S., Weng, S., Wong, E. D., Lloyd, P., Skrzypek, M. S., Miyasato, S. R., Simison, M., ve Cherry, J. M. (2014). “The

- reference genome sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: then and now”. *G3* (Bethesda, Md.), 4(3), 389–398. <https://doi.org/10.1534/g3.113.008995>
- Engel, S. R., Wong, E. D., Nash, R. S., Aleksander, S., Alexander, M., Douglass, E., Karra, K., Miyasato, S. R., Simison, M., Skrzypek, M. S., Weng, S., ve Cherry, J. M. (2022). “New data and collaborations at the *Saccharomyces* Genome Database: updated reference genome, alleles, and the Alliance of Genome Resources”. *Genetics*, 220(4), iyab224. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyab224>
- Fay, J. C., McCullough, H. L., Sniegowski, P. D., ve Eisen, M. B. (2004). “Population genetic variation in gene expression is associated with phenotypic variation in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Genome Biology*, 5(4), R26. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-4-r26>
- Feldmann H., Dujon B., Porro D., Gaillardin C. ve Branduardi P., 2012. *Yeast: Molecular and Cell Biology*, Second Edition. Edited by Horst Feldmann. Wiley-VCH Verlag GmbH ve Co. KGaA. pp. 1-23
- Fingar, D. C., ve Blenis, J. (2004). “Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression”. *Oncogene*, 23(18), 3151–3171. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207542>
- Fabrizio, P., Pletcher, S.D., Minois, N., Vaupel, J.W ve Longo, V.D. (2004). “Chronological aging independent replicative life span regulation by Msn2/Msn4 and Sod2 in *Saccharomyces cerevisiae*”. *FEBS Letters*, 557(1-3), 136–142. DOI: 10.1016/s0014-5793(03)01462-5
- Gauci, V. J., Beckhouse, A. G., Lyons, V., Beh, E. J., Rogers, P. J., Dawes, I. W., ve Higgins, V. J. (2009). “Zinc starvation induces a stress response in *Saccharomyces cerevisiae* that is mediated by the Msn2p and Msn4p transcriptional activators”. *FEMS Yeast Research*, 9(8), 1187–1195. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00557.x>
- Ge, S. X., Jung, D., ve Yao, R. (2020). ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 36(8), 2628–2629. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz931>
- 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., ve Oliver, S. G. (1996). “Life with 6000 genes”. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5287), 546–567. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>

- Grada, A., ve Weinbrecht, K. (2013). “Next-generation sequencing: methodology and application”. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(8), e11. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.248>
- Greatrix, B. W., ve van Vuuren, H. J. (2006). “Expression of the *HXT13*, *HXT15* and *HXT17* genes in *Saccharomyces cerevisiae* and stabilization of the *HXT1* gene transcript by sugar-induced osmotic stress”. *Current Genetics*, 49(4), 205–217. <https://doi.org/10.1007/s00294-005-0046-x>
- Grunstein, M., ve Gasser, S. M. (2013). “Epigenetics in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*, 5(7), a017491. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017491>
- Hacısalihoğlu, B., Holyavkin, C., Topaloğlu, A., Kısakesen, H. İ., ve Çakar, Z. P. (2019). “Genomic and transcriptomic analysis of a coniferyl aldehyde-resistant *Saccharomyces cerevisiae* strain obtained by evolutionary engineering”. *FEMS Yeast Research*, 19(3), foz021. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz021>
- Heitman, J., Movva, N. R., ve Hall, M. N. (1991). “Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast”. *Science (New York, N.Y.)*, 253(5022), 905–909. <https://doi.org/10.1126/science.1715094>
- Helliwell, S. B., Howald, I., Barbet, N., ve Hall, M. N. (1998). “*TOR2* is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Genetics*, 148(1), 99–112. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1459785/>
- Helliwell, S. B., Wagner, P., Kunz, J., Deuter-Reinhard, M., Henriquez, R., ve Hall, M. N. (1994). “*TOR1* and *TOR2* are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast”. *Molecular Biology of The Cell*, 5(1), 105–118. <https://doi.org/10.1091/mbc.5.1.105>
- Henriques, R., Bögre, L., Horváth, B., ve Magyar, Z. (2014). “Balancing act: matching growth with environment by the *TOR* signalling pathway.” *Journal of Experimental Botany*, 65(10), 2691–2701. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru049>
- Herman P. K. (2002). “Stationary phase in yeast”. *Current Opinion In Microbiology*, 5(6), 602–607. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(02\)00377-6](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(02)00377-6)
- Herrero, P., Galíndez, J., Ruiz, N., Martínez-Campa, C., ve Moreno, F. (1995). “Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *HXK1*, *HXK2* and

- GLK1* genes”. *Yeast (Chichester, England)*, 11(2), 137–144.
<https://doi.org/10.1002/yea.320110205>
- Ihaka R. ve Gentleman R. (1996) “R: a language for data analysis and graphics”. *J Comp Graph Stat* 5:299–314
- Inoki, K., Ouyang, H., Li, Y., Guan, K.L. (2005). “Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control”. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(1), 79–100. DOI: 10.1128/MMBR.69.1.79-100.2005
- Inoue, Y., ve Nomura, W. (2018). “TOR Signaling in Budding Yeast”. *The Yeast Role in Medical Applications*. doi:10.5772/intechopen.70784
- Jacinto, E., ve Hall, M. N. (2003). “Tor signalling in bugs, brain and brawn”. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(2), 117–126. <https://doi.org/10.1038/nrm1018>
- Kaeberlein, M., Powers, R. W., 3rd, Steffen, K. K., Westman, E. A., Hu, D., Dang, N., Kerr, E. O., Kirkland, K. T., Fields, S., ve Kennedy, B. K. (2005). “Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients”. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5751), 1193–1196. <https://doi.org/10.1126/science.1115535>
- Kaldis P. (1999). “The cdk-activating kinaz (CAK) from yeast to mammals”. *Cellular And Molecular Life Sciences: CMLS*, 55(2), 284–296.
<https://doi.org/10.1007/s000180050290>
- Keren, H., Lev-Maor, G., ve Ast, G. (2010). “Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function”. *Nature Reviews. Genetics*, 11(5), 345–355. <https://doi.org/10.1038/nrg2776>
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., ve Salzberg, S. L. (2013). “TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions”. *Genome Biology*, 14(4), R36.
<https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-4-r36>
- King, R. W., Deshaies, R. J., Peters, J.-M. ve Kirschner, M. W. (1996). “How proteolysis drives the cell cycle”. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5293), 1652–1659.
<https://doi.org/10.1126/science.274.5293.1652>
- 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(4), 336-349.
 DOI: 10.1101/gad.2011311
- Ko, H. A., ve Moore, S. A. (1990). “Kinetic characterization of a prestart cell division control step in yeast. Implications for the mechanism of alpha-factor-induced division

- arrest”. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(35), 21652–21663.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2254321/>
- Kõivomägi, M., Valk, E., Venta, R., Iofik, A., Lepiku, M., Balog, E. R., Rubin, S. M., Morgan, D. O., ve Loog, M. (2011). “Cascades of multisite phosphorylation control Sic1 destruction at the onset of S phase”. *Nature*, 480(7375), 128–131.
<https://doi.org/10.1038/nature10560>
- Kos-Braun, I. C., Jung, I., ve Koš, M. (2017). “*Tor1* and *CK2* kinases control a switch between alternative ribosome biogenesis pathways in a growth-dependent manner”. *PLoS biology*, 15(3), e2000245. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000245>
- Kukurba, K. R., ve Montgomery, S. B. (2015). “RNA Sequencing and Analysis”. *Cold Spring Harbor protocols*, 2015(11), 951–969.
<https://doi.org/10.1101/pdb.top084970>
- Kunz, J., Henriquez, R., Schneider, U., Deuter-Reinhard, M., Movva, N. R., ve Hall, M. N. (1993). “Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression”. *Cell*, 73(3), 585–596.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90144-f](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90144-f)
- Kvitek, D. J., Will, J. L., ve Gasch, A. P. (2008). “Variations in stress sensitivity and genomic expression in diverse *Saccharomyces cerevisiae* isolates”. *Plos Genetics*, 4(10), e1000223. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000223>
- Laporte, D., Gouleme, L., Jimenez, L., Khemiri, I., ve Sagot, I. (2018). “Mitochondria reorganization upon proliferation arrest predicts individual yeast cell fate”. *Elife*, 7, e35685. <https://doi.org/10.7554/eLife.35685>
- Lengronne, A., ve Schwob, E. (2002). “The yeast *CDK* inhibitor Sic1 prevents genomic instability by promoting replication origin licensing in late G(1)”. *Molecular Cell*, 9(5), 1067–1078. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00513-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00513-0)
- Li, H., Tsang, C. K., Watkins, M., Bertram, P. G., ve Zheng, X. F. (2006). “Nutrient regulates *Tor1* nuclear localization and association with rDNA promoter”. *Nature*, 442(7106), 1058–1061. <https://doi.org/10.1038/nature05020>
- Lister, R., O'Malley, R. C., Tonti-Filippini, J., Gregory, B. D., Berry, C. C., Millar, A. H., ve Ecker, J. R. (2008). “Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*”. *Cell*, 133(3), 523–536.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.029>
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D.,

- Opplinger, W., Jenoe, P., ve Hall, M. N. (2002). “Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control”. *Molecular Cell*, 10 (3), 457–468. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00636-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00636-6)
- Loewith, R., ve Hall, M. N. (2011). “Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control”. *Genetics*, 189(4), 1177–1201. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133363>
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., ve Shafee, T. (2017). “Transcriptomics technologies”. *Plos Computational Biology*, 13(5), e1005457. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005457>
- Luo, W., Friedman, M. S., Shedden, K., Hankenson, K. D., ve Woolf, P. J. (2009). “GAGE: generally applicable gene set enrichment for pathway analysis”. *BMC Bioinformatics*, 10, 161. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-161>
- Marioni, J. C., Mason, C. E., Mane, S. M., Stephens, M., ve Gilad, Y. (2008). “RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays”. *Genome Research*, 18(9), 1509–1517. <https://doi.org/10.1101/gr.079558.108>
- Sarkar Martín, R., Portantier, M., Chica, N., Nyquist-Andersen, M., Mata, J., ve Lopez-Aviles, S. (2017). “A PP2A-B55-Mediated Crosstalk between TORC1 and TORC2 Regulates the Differentiation Response in Fission Yeast”. *Current biology:CB*, 27(2), 175–188. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.037>
- Medvedik, O., Lamming, D. W., Kim, K. D., ve Sinclair, D. A. (2007). “MSN2 and MSN4 link calorie restriction and TOR to sirtuin-mediated lifespan extension in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Plos Biology*, 5(10), e261. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050261>
- Mendenhall, M. D., ve Hodge, A. E. (1998). “Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”. *Microbiology And Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62(4), 1191–1243. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.4.1191-1243.1998>
- Merriman, B., Ion Torrent RveD Team, ve Rothberg, J. M. (2012). “Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing”. *Electrophoresis*, 33(23), 3397–3417. <https://doi.org/10.1002/elps.201200424>
- Modeling the Budding Yeast Cell Cycle, (2022, 3 Kasım). Erişim adresi http://mpf.biol.vt.edu/research/budding_yeast_model/pp/intro2.php.

- Moore S. A. (1988). “Kinetic evidence for a critical rate of protein synthesis in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell cycle”. *The Journal of Biological Chemistry*, 263 (20), 9674–9681. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3290211/>
- Moreno-Torres, M., Jaquenoud, M., Péli-Gulli, M. P., Nicastro, R., ve De Virgilio, C. (2017). “TORC1 coordinates the conversion of Sic1 from a target to an inhibitor of cyclin-CDK-Cks1”. *Cell Discovery*, 3, 17012. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2017.12>
- Morgan D (2007) The cell cycle: principles of control. New Science Press, London
- Chen, K.C., Calzone, L., Csikasz-Nagy, A., Cross, F.R., Novak, B. and Tyson, J.J. (2004). Integrative analysis of cell cycle control in budding yeast. *Mol. Biol. Cell* 15:3841-3862.
- Müller, H., Lesur, A., Dittmar, G., Gentzel, M., ve Kettner, K. (2022). “Proteomic consequences of TDA1 deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*: Protein kinase Tda1 is essential for Hxk1 and Hxk2 serine 15 phosphorylation”. *Scientific Reports*, 12(1), 18084. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21414-x>
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M., ve Snyder, M. (2008). “The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing”. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5881), 1344–1349. <https://doi.org/10.1126/science.1158441>
- Nash, P., Tang, X., Orlicky, S., Chen, Q., Gertler, F. B., Mendenhall, M. D., Sicheri, F., Pawson, T., ve Tyers, M. (2001). “Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication”. *Nature*, 414(6863), 514–521. <https://doi.org/10.1038/35107009>
- Oh, S., Suganuma, T., Gogol, M. M., ve Workman, J. L. (2018). “Histone H3 threonine 11 phosphorylation by Sch9 and CK2 regulates chronological lifespan by controlling the nutritional stress response”. *Elife*, 7, e36157. <https://doi.org/10.7554/eLife.36157>
- Oh, S., Lee, J., Swanson, S. K., Florens, L., Washburn, M. P., ve Workman, J. L. (2020). “Yeast Nuak1 phosphorylates histone H3 threonine 11 in low glucose stress by the cooperation of AMPK and CK2 signaling”. *Elife*, 9, e64588. <https://doi.org/10.7554/eLife.64588>
- Oshlack, A., Robinson, M. D., ve Young, M. D. (2010), “From RNA-seq reads to differential expression results”. *Genome Biology*, 11(12), 220. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-12-220>

- Ozsolak, F., ve Milos, P. M. (2011). “RNA sequencing: advances, challenges and opportunities”. *Nature Reviews. Genetics*, 12(2), 87–98. <https://doi.org/10.1038/nrg2934>
- Palomba, E., Tirelli, V., de Alteriis, E., Parascandola, P., Landi, C., Mazzoleni, S., ve Sanchez, M. (2021). “A cytofluorimetric analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* population cultured in a fed-batch bioreactor”. *Plos One*, 16(6), e0248382. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248382>
- Park, E. H., ve Kim, M. D. (2015). “Genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae* genes regulated by vanillin”. *Journal of Microbiology And Biotechnology*, 25(1), 50–56. <https://doi.org/10.4014/jmb.1409.09064>
- Pedruzzi, I., Dubouloz, F., Cameroni, E., Wanke, V., Roosen, J., Winderickx, J., ve De Virgilio, C. (2003). “TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G0”. *Molecular Cell*, 12(6), 1607–1613. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00485-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00485-4)
- Pérez-Hidalgo, L., ve Moreno, S. (2017). “Coupling TOR to the Cell Cycle by the Greatwall-Endosulfine-PP2A-B55 Pathway”. *Biomolecules*, 7(3), 59. <https://doi.org/10.3390/biom7030059>
- Perez, M., Luyten, K., Michel, R., Riou, C., ve Blondin, B. (2005). “Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* hexose carrier expression during wine fermentation: both low- and high-affinity Hxt transporters are expressed”. *FEMS Yeast Research*, 5(4-5), 351–361. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.005>
- Perry, J., ve Kleckner, N. (2003). “The ATRs, ATMs, and TORs are giant HEAT repeat proteins”. *Cell*, 112(2), 151–155. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00033-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00033-3)
- Peter, M., ve Herskowitz, I. (1994). “Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1”. *Science*, 265(5176), 1228–1231. <https://doi.org/10.1126/science.8066461>
- Ponting C. P. (2008). “The functional repertoires of metazoan genomes”. *Nature Reviews. Genetics*, 9(9), 689–698. <https://doi.org/10.1038/nrg2413>
- Posas, F., Chambers, J. R., Heyman, J. A., Hoeffler, J. P., de Nadal, E., ve Ariño, J. (2000). “The transcriptional response of yeast to saline stress”. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(23), 17249–17255. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910016199>
- Powers, R. W., Kaeberlein, M., Caldwell, S. D., Kennedy, B. K., ve Fields, S. (2006). “Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling”.

- Genes Ve Development*, 20(2), 174–184. <https://doi.org/10.1101/gad.1381406>
- Powers, T., ve Walter, P. (1999). “Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Molecular Biology of The Cell*, 10(4), 987–1000. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.4.987>
- Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., Bertoni, A., Swerdlow, H. P., ve Gu, Y. (2012). “A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers”. *BMC Genomics*, 13, 341. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-341>
- Rapamisin (Sirolimus) Kimyasal Yapısı (2022, 21 Haziran). Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sirolimus>
- Reinke, A., Anderson, S., McCaffery, J. M., Yates, J., 3rd, Aronova, S., Chu, S., Fairclough, S., Iverson, C., Wedaman, K. P., ve Powers, T. (2004). “TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*”. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 14752–14762. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313062200>
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J. M., ve Hohmann, S. (2000). “The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes”. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8290–8300. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8290>
- Rintala, E., Wiebe, M. G., Tamminen, A., Ruohonen, L., ve Penttilä, M. (2008). “Transcription of hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* is affected by change in oxygen provision”. *BMC Microbiology*, 8, 53. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-53>
- Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, ve Smyth GK.(2015). “limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies”. *Nucleic Acids Research*, 43(7):e47–, 2015. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., ve Smyth, G. K. (2010). “edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data”. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Rodriguez, A., De La Cera, T., Herrero, P., ve Moreno, F. (2001). “The hexokinase 2 protein regulates the expression of the *GLK1*, *HXK1* and *HXK2* genes of *Saccharomyces*

- cerevisiae*". *The Biochemical Journal*, 355(Pt 3), 625–631. <https://doi.org/10.1042/bj3550625>
- Rohde, J. R., Bastidas, R., Puria, R., ve Cardenas, M. E. (2008). "Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*". *Current Opinion In Microbiology*, 11(2), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.013>
- Roy, A., Kim, Y. B., Cho, K. H., ve Kim, J. H. (2014). "Glucose starvation-induced turnover of the yeast glucose transporter Hxt1". *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1840(9), 2878–2885. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.05.004>
- Rudloff U, Bhanot U, Gerald W, Klimstra DS, Jarnagin WR, Brennan MF, Allen PJ. Biobanking of human pancreas cancer tissue: Impact of ex-vivo procurement times on RNA quality. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:2229–2236.
- Runner, V. M., ve Brewster, J. L. (2003). "A genetic screen for yeast genes induced by sustained osmotic stress". *Yeast (Chichester, England)*, 20(10), 913–920. <https://doi.org/10.1002/yea.1019>
- Sabatini, D. M., Pierchala, B. A., Barrow, R. K., Schell, M. J., ve Snyder, S. H. (1995). "The rapamycin and FKBP12 target (RAFT) displays phosphatidylinositol 4-kinase activity". *Journal of Biological Chemistry*, 270(36), 20875–20878. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.36.20875>
- Sabers, C. J., Martin, M. M., Brunn, G. J., Williams, J. M., Dumont, F. J., Wiederrecht, G., ve Abraham, R. T. (1995). "Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells". *The Journal of Biological Chemistry*, 270(2), 815–822. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.2.815>
- Santos, J., Fernanda Leitão-Correia, F., Sousa, M. J., Leão, C. (2016). "Dietary restriction and nutrient balance in aging". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–10.
- Sardu, A., Treu, L., ve Campanaro, S. (2014). "Transcriptome structure variability in *Saccharomyces cerevisiae* strains determined with a newly developed assembly software". *BMC Genomics*, 15(1), 1045. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1045>
- Sarkar, S., Dalgaard, J. Z., Millar, J. B., ve Arumugam, P. (2014). "The Rim15-endosulfine-PP2A^{Cdc55} signalling module regulates entry into gametogenesis and quiescence via distinct mechanisms in budding yeast". *Plos Genetics*, 10(6), e1004456. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004456>
- Schmelzle, T., ve Hall, M. N. (2000). "TOR, a central controller of cell growth". *Cell*, 103(2), 253–262. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00117-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00117-3)

- Schwob, E., Böhm, T., Mendenhall, M. D., ve Nasmyth, K. (1994). “The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*”. *Cell*, 79(2), 233–244. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90193-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90193-7)
- Sehgal S. N. (2003). “Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action”. *Transplantation proceedings*, 35(3 Suppl), 7S–14S. [https://doi.org/10.1016/s0041-1345\(03\)00211-2](https://doi.org/10.1016/s0041-1345(03)00211-2)
- Sehgal, S. N., Baker, H., ve Vézina, C. (1975). “Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization”. *The Journal of Antibiotics*, 28(10), 727–732. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.28.727>
- Sheaff, R. J., ve Roberts, J. M. (1996). “End of the line: proteolytic degradation of cyclin-dependent kinase inhibitors”. *Chemistry Ve Biology*, 3(11), 869–873. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(96\)90174-x](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(96)90174-x)
- Scherens, B., Feller, A., Vierendeels, F., Messenguy, F., ve Dubois, E. (2006). “Identification of direct and indirect targets of the Gln3 and Gat1 activators by transcriptional profiling in response to nitrogen availability in the short and long term”. *FEMS Yeast Research*, 6(5), 777–791. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00060.x>
- Smirnikhina, S. A., Zaynitdinova, M. I., Sergeeva, V. A., ve Lavrov, A. V. (2022). “Improving Homology-Directed Repair in Genome Editing Experiments by Influencing the Cell Cycle.” *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 5992. <https://doi.org/10.3390/ijms23115992>
- Solomon, M. J., ve Kaldis, P. (1998). “Regulation of CDKs by phosphorylation. Results and problems in cell differentiation.” in: M. Pagano (ed.). *Cell Cycle Control. Results and Problems in Cell Differentiation*. (pp. 79–109). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69686-5_4
- Sun, S., ve Gresham, D. (2021). “Cellular quiescence in budding yeast”. *Yeast (Chichester, England)*, 38(1), 12–29. <https://doi.org/10.1002/yea.3545>
- Swinnen, E., Ghillebert, R., Wilms, T., ve Winderickx, J. (2014). “Molecular mechanisms linking the evolutionary conserved TORC1-Sch9 nutrient signalling branch to lifespan regulation in *Saccharomyces cerevisiae*”. *FEMS Yeast Research*, 14(1), 17–32. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12097>
- Szopinska, A., Degand, H., Hochstenbach, J. F., Nader, J., ve Morsomme, P. (2011). “Rapid response of the yeast plasma membrane proteome to salt stress. *Molecular ve*

- Cellular Proteomics:MCP*, 10(11), M111.009589.
<https://doi.org/10.1074/mcp.M111.009589>
- Talarek, N., Cameroni, E., Jaquenoud, M., Luo, X., Bontron, S., Lippman, S., Devgan, G., Snyder, M., Broach, J. R., ve De Virgilio, C. (2010). “Initiation of the TORC1-regulated G0 program requires Igo1/2, which license specific mRNAs to evade degradation via the 5'-3' mRNA decay pathway”. *Molecular Cell*, 38(3), 345–355. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.02.039>
- Talarek, N., Gueydon, E., ve Schwob, E. (2017). “Homeostatic control of START through negative feedback between Cln3-Cdk1 and Rim15/Greatwall kinase in budding yeast”. *Elife*, 6, e26233. <https://doi.org/10.7554/eLife.26233>
- Tekarslan-Sahin, S. H., Alkim, C., ve Sezgin, T. (2018). “Physiological and transcriptomic analysis of a salt-resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutant obtained by evolutionary engineering”. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 18(1), 55–65. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2017.2250>
- Thompson KL, Pine PS, Rosenzweig BA, Turpaz Y, Retief J. Characterization of the effect of sample quality on high density oligonucleotide microarray data using progressively degraded rat liver RNA. *BMC Biotechnol.* 2007;7:57.
- Tibbetts, R.S., ve Abraham, R.T. (2000). “PI3K-related kinases: roles in cell-cycle regulation and DNA damage responses. In Signaling Networks and Cell Cycle Control”: *The Molecular Basis of Cancer and Other Diseases*, Volume 5, J.S. Gutkind, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 267–301.
- Tomita, H., Vawter, M. P., Walsh, D. M., Evans, S. J., Choudary, P. V., Li, J., Overman, K. M., Atz, M. E., Myers, R. M., Jones, E. G., Watson, S. J., Akil, H., ve Bunney, W. E., Jr (2004). “Effect of agonal and postmortem factors on gene expression profile: quality control in microarray analyses of postmortem human brain”. *Biological Psychiatry*, 55(4), 346–352. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2003.10.013>
- Tyers, M., Tokiwa, G., ve Futcher, B. (1993). “Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins”. *The EMBO Journal*, 12(5), 1955–1968. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05845.x>
- Valcourt, J. R., Lemons, J. M., Haley, E. M., Kojima, M., Demuren, O. O., ve Collier, H. A. (2012). “Staying alive: metabolic adaptations to quiescence”. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 11(9), 1680–1696. <https://doi.org/10.4161/cc.19879>

- Vega, M., Riera, A., Fernández-Cid, A., Herrero, P., ve Moreno, F. (2016). “Hexokinase 2 Is an Intracellular Glucose Sensor of Yeast Cells That Maintains the Structure and Activity of Mig1 Protein Repressor Complex”. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(14), 7267–7285. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.711408>
- Verma, R., Annan, R. S., Huddleston, M. J., Carr, S. A., Reynard, G., ve Deshaies, R. J. (1997). “Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase”. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5337), 455–460. <https://doi.org/10.1126/science.278.5337.455>
- Wang, Z., Gerstein, M., ve Snyder, M. (2009). “RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics.” *Nature Reviews. Genetics*, 10(1), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
- Wanke, V., Pedruzzi, I., Cameroni, E., Dubouloz, F., ve De Virgilio, C. (2005). “Regulation of G0 entry by the Pho80-Pho85 cyclin-CDK complex”. *The EMBO journal*, 24(24), 4271–4278. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600889>
- Ward, P. S., ve Thompson, C. B. (2012). “Signaling in control of cell growth and metabolism.” *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*, 4(7), a006783. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006783>
- Wedaman, K. P., Reinke, A., Anderson, S., Yates, J., 3rd, McCaffery, J. M., ve Powers, T. (2003). “Tor kinases are in distinct membrane-associated protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Molecular Biology of The Cell*, 14(3), 1204–1220. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-09-0609>
- Wei, M., Fabrizio, P., Madia, F., Hu, J., Ge, H., Li, L. M., ve Longo, V. D. (2009). “Tor1/Sch9-regulated carbon source substitution is as effective as calorie restriction in life span extension”. *Plos Genetics*, 5(5), e1000467. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000467>
- Werner-Washburne, M., Braun, E. L., Crawford, M. E., ve Peck, V. M. (1996). “Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Molecular Microbiology*, 19(6), 1159–1166. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02461.x>
- Wittenberg, C., Sugimoto, K., ve Reed, S. I. (1990). “G1-specific cyclins of *S. cerevisiae*: cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34CDC28 protein kinase”. *Cell*, 62(2), 225–237. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90361-h](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90361-h)
- Wullschleger, S., Loewith, R., Oppliger, W., ve Hall, M. N. (2005). “Molecular organization

- of target of rapamycin complex 2". *The Journal of Biological Chemistry*, 280(35), 30697–30704. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505553200>
- Wullschleger, S., Loewith, R., ve Hall, M. N. (2006). "TOR signaling in growth and metabolism". *Cell*, 124(3), 471–484. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.016>
- Yu, G., Wang, L. G., Han, Y., ve He, Q. Y. (2012). "ClusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters". *Omics: A Journal of Integrative Biology*, 16(5), 284–287. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>
- Yvert, G., Brem, R. B., Whittle, J., Akey, J. M., Foss, E., Smith, E. N., Mackelprang, R., ve Kruglyak, L. (2003). "Trans-acting regulatory variation in *Saccharomyces cerevisiae* and the role of transcription factors". *Nature Genetics*, 35 (1), 57–64. <https://doi.org/10.1038/ng1222>
- Zinzalla, V., Graziola, M., Mastriani, A., Vanoni, M., ve Alberghina, L. (2007). "Rapamycin-mediated G1 arrest involves regulation of the Cdk inhibitor Sic1 in *Saccharomyces cerevisiae*". *Molecular Microbiology*, 63(5), 1482–1494. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05599.x>