



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SACCHAROMYCES CEREVISIAE MAYA TÜRÜNDE *Gcn5*
TRANSKRİPSİYON KOAKTİVATÖRÜNÜN *TPS1* VE *NTH1*
EKSPRESYONLARINA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜLŞAH TOYRAN

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Tülay TURGUT GENÇ

ÇANAKKALE – 2022



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SACCHAROMYCES CEREVISIAE MAYA TÜRÜNDE *Gcn5* TRANSKRİPSİYON
KOAKTİVATÖRÜNÜN *TPS1* VE *NTH1* GEN EKSPRESYONLARINA
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜLŞAH TOYRAN

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Tülay TURGUT GENÇ

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FYL-2021-3239

ÇANAKKALE – 2022

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.

(İmza)

Gülşah TOYRAN

31/08/2022

TEŞEKKÜR

“Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen, bana laboratuvarının kapılarını açan, bilgi ve donanımıyla her zaman yardımcı olan saygıdeğer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Tülay TURGUT GENÇ’e;

Laboratuvar çalışmaları sırasında deneyimlerini benimle paylaşan, her an yardıma hazır laboratuvar arkadaşlarım ve hocam Melih GÜNAY’a;

Çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen hayatımın her evresinde bana kanat geren, hayat boyu bana maddi manevi destek olan annem Güzin TOYRAN ve babam Bayram TOYRAN’a, ailemizin en küçüğü kardeşim Eray TOYRAN’a, beni yalnız bırakmayan ailemin değerli diğer üyelerine;

Hayatıma girdiği andan itibaren bana destek olmaya ant içmiş, en zor zamanlarımı paylaştığım ve aramızdaki kilometrelere rağmen benden desteğini esirgemeyip motive eden, dostum, sırdaşım Yavuz Erbay KÜRKAYA’ya;

Günün her saati beraber olduğumuz, benim en tatlı ortağım ve ders partnerim olan, minik koruyucum, stres topum, bir tanecik tüylü dostum Zeus’a;

Bana kadınların ve okumanın değerini aşılaman, bu toprakları kurtarmak için hayatı pahasına mücadele ederken bile bir an olsun bilimin ışığından ayrı düşmeyen Cumhuriyetimizin kurucusu Ulu Önder Mustafa Kemal Atatürk’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.”

Gülşah TOYRAN
Çanakkale, Ağustos 2022

ÖZET

SACCHAROMYCES CEREVISIAE MAYA TÜRÜNDE *Gcn5* TRANSKRİPSİYON KOAKTİVATÖRÜNÜN *TPS1* ve *NTH1* GEN EKSPRESYONLARINA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Gülşah TOYRAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tülay TURGUT GENÇ

31/08/2022, 89

Saccharomyces cerevisiae maya hücrelerinde stres koşullarında hayatta kalabilmek için trehaloz ve glikojen depo edilmektedir. Trehaloz, indirgeyici olmayan kararlı bir disakkarit olarak hücrede enerji kaynağı ve stres koruyucu olarak bulunur. Olumsuz stres koşulları ortadan kalktığı anda ise trehaloz parçalanarak glikoza dönüştürülür. Trehaloz, TPS enzim kompleksi tarafından sentezlenir ve nötral trehalaz (Nth1p) enzimi ile yıkılmaktadır. *NTH1* ve *TPS1* genlerinin ekspresyonu ortam şartlarına ve stres koşullarına göre birçok basamak aracılığıyla kontrol edilir. Bu basamaklar ise Msn2/Msn4 (STRE dizileri), Gcn4 transkripsiyon faktörü ve TOR yolağında görevli transkripsiyon faktörleri gibi elemanlardır. Histon asetilasyonu çevresel değişikliklere yanıt veren ve transkripsiyonel aktivasyon ile ilişkilendirilen epigenetik modifikasyonlardan biridir. SAGA kompleksi, stres koşullarında indüklenen genlerin ekspresyonunda rol alır. Hücrede H3 histon asetilasyonu ve deubikitinasyonu aracılığıyla kromatin yapısını değiştiren transkripsiyonel ko-aktivatör kompleksi olarak bilinir. Histon asetiltransferaz aktivitesi içeren ve SAGA kompleksinin alt birimi olarak bulunan Gcn5p ise transkripsiyon ile ilişkilendirilir. Gcn5 proteininin promotora getirilmesinde stres koşullarında indüklenen Gcn4p görev almaktadır. SAGA ve alt birimlerinin trehaloz metabolizmasındaki düzenleyici etkisi tam olarak bilinmemektedir. Bu sebeple çalışmamızda azot stresinde Gcn5 proteininin *NTH1* ve *TPS1* transkripsiyonu üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlandı. Yaban tip maya suşu ve $\Delta gcn5$ mutanını kullanarak *NTH1* ve *TPS1*'in promotör aktiviteleri analiz edildi. Hücre içi biriken trehaloz

ve glikojen miktarı enzimatik olarak belirlendi. Çalışmamızın sonuçlarına göre Gcn5 proteininin *NTH1* ve *TPS1* aktivitesi üzerinde ortam şartlarına bağlı olarak pozitif ve negatif bir rol aldığı belirlendi. Gcn5p'nin normal koşullarda *NTH1* ve *TPS1*'in baskılanmasında görev aldığı tespit edildi. Stres koşullarında ise Gcn5p'nin *NTH1*'in susturulmasında rol oynarken, *TPS1*'in aktivasyonu için önemli olduğu sonucuna varıldı. Normal koşullarda Gcn5 proteininin eksikliğinde hücre içi trehaloz ve glikojen birikiminin arttığı belirlendi. Stres koşullarında hücrede trehaloz birikimi artarken glikojen birikiminin ise azaltığı tespit edildi. Bu bağlamda maya hücrelerinin sağlıklı bir stres tepkisi vermesi için Gcn5 proteinine ihtiyaç duyduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Asetilasyon, Trehaloz, *NTH1*, *TPS1*, *Gcn5*, Stres

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE EFFECT OF *Gcn5* TRANSCRIPTION COACTIVATOR ON *TPS1* AND *NTH1* GENE EXPRESSIONS IN YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Gülşah TOYRAN

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Biological Science

Advisor: Assist. Prof. Dr. Tülay TURGUT GENÇ

31/08/2022, 89

Saccharomyces cerevisiae yeast cells store trehalose and glycogen in order to survive under stress conditions. Trehalose, as a non-reducing stable disaccharide, is present in the cell as an energy source and stress protector. When negative stress conditions are eliminated, trehalose is hydrolyzed to glucose. Trehalose is synthesized by TPS enzyme complex and it is degraded by neutral trehalase (Nth1p) enzyme. Expression of *NTH1* and *TPS1* genes is controlled by many steps according to environmental and stress conditions. These steps are elements such as Msn2/Msn4 (STRE sequences), Gcn4 transcription factor and transcription factors involved in the TOR pathway. Histone acetylation is one of the epigenetic modifications that respond to environmental changes and is associated with transcriptional activation. SAGA complex is involved in the expression of genes induced under stress conditions. Therefore, it is known as the transcriptional co-activator complex, which changes the chromatin structure in the cell via acetylation. It is known in the cell as a transcriptional co-activator complex that changes the structure of chromatin through H3 histone acetylation and ubiquitination. Gcn5p, which contains histone acetyltransferase activity and is a subunit of the SAGA complex, is associated with transcription. Gcn4p induced under stress conditions is involved in bringing the Gcn5 protein to the promoter. The effect of SAGA subunits on trehalose metabolism is not fully known. The regulatory effect of SAGA and its subunits on trehalose metabolism is not fully known. For this reason, in our study, it was aimed to determine the effect of Gcn5 protein on *NTH1* and *TPS1* transcription under

nitrogen stress. The promoter activities of *NTH1* and *TPS1* were analyzed using the wild-type yeast strain and the $\Delta gcn5$ mutant. The amount of trehalose and glycogen accumulating intracellularly was determined enzymatically. According to the results of our study, it was determined that the Gcn5 protein has a positive and negative role on *NTH1* and *TPS1* activities depending on the environmental conditions. Under normal conditions, Gcn5p was found to be involved in the suppression of *NTH1* and *TPS1*. In stress conditions, it was concluded that Gcn5p was important for activation of *TPS1* while playing a role in the silencing of *NTH1*. In normal conditions, it was determined that the accumulation of intracellular trehalose and glycogen increased in the absence of Gcn5 protein. In stress conditions, it was determined that trehalose accumulation in the cell increased, while glycogen accumulation decreased. As a result, it was concluded that yeast cells need Gcn5 protein for a healthy stress response.

Keywords: Acetylation, Trehalose, *NTH1*, *TPS1*, *Gcn5*, Stress

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii

BİRİNCİ BÖLÜM GİRİŞ

1. Giriş.....	1
---------------	---

İKİNCİ BÖLÜM ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1 Ökaryotlarda Kromatin ve Nükleozom Yapısı	5
2.1.1 Kromatin Tekrar-Modelleme Faktörleri.....	7
2.1.2 Histon Asetilasyonu-Deasetilasyonu.....	10
2.1.3 SAGA kompleksi.....	11
2.1.4 GCN5 Gen Yapısı ve Transkripsiyonel Regülasyondaki Rolü.....	13
2.3 Depo Karbonhidrat Metabolizması.....	15
2.3.1 Trehaloz Metabolizması.....	15
2.3.2 Glikojen Metabolizması.....	18
2.4 PKA Sinyal Yolağı.....	19
2.5 TOR Sinyal Yolağı.....	22
2.6 GAAC Sinyal Yolağı.....	30

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL YÖNTEM

	37
3.1 Maya Suşlarının Özellikleri ve İkilenme Sürelerinin Belirlenmesi	37
3.2 Plazmitlerin Çoğaltılması ve Maya Suşlarına Transformasyonu.....	37
3.3 Maya Hücrelerinin Üreme Koşulları.....	38
3.4 Promotor Aktivitesinin Belirlenmesi.....	39
3.5 Depo Karbonhidrat Miktarının Belirlenmesi.....	40
3.6 Veri Analizi.....	40
3.7 Biyoinformatik Çalışmalar.....	41

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA BULGULARI

	42
4.1 Maya Suşlarının İkilenme Süreleri.....	42
4.2 <i>NTH1</i> ve <i>TPS1</i> Promotor Analizi.....	51
4.3 Gcn5 Proteininin <i>NTH1</i> ve <i>TPS1</i> Gen Ekspresyonuna Etkisi.....	57
4.4 Gcn5 Proteininin Stres Koşullarında <i>NTH1</i> ve <i>TPS1</i> Ekspresyonuna Etkisi.....	61
4.5 Gcn5 Proteininin Hücre İçi Trehaloz ve Glikojen Birikimine Etkisi.....	69

BEŞİNCİ BÖLÜM
SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1 Sonuç ve Öneriler.....	75
KAYNAKÇA	77
ÖZGEÇMİŞ	I

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
Δ	Delesyon
α	Alfa
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
ATP	Adenozin Trifosfat
bç	Baz çifti
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
gr	Gram
His	Histidin
HS-DNA	Herring Sperm DNA
Kbç	Kilobaz Çifti
KCl	Potasyum Klorür
kDa	Kilodalton
Leu	Lösin
M	Molar
MAT	Mating Type
Met	Metiyonin
Mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MgSO ₄	Magnezyum Sülfat
ml	Mililitre
nM	Milimolar
Na ₂ CO ₃	Sodyum Karbonat
NaH ₂ PO ₄	Sodyum Dihidrojen Fosfat
NaHPO ₄	Mono Sodyum Fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit

nmol	Nanomol
OD	Optik Densite
O/N	Over-Night
pH	Hidrojen İyonu Konsantrasyonu
PMSF	Fenilmetil Sülfonil Florür
RNA	Ribonükleik Asit
Rpm	Dakidaki Dönüş Sayısı (Revolutions per minute)
rRNA	Ribozomal RNA
SDS	Sodium Dodesil Sülfat
TYE ^{AMP}	%2,4 Trypton Yeast Extract Agar
TE	Tris-EDTA
tRNA	Transfer RNA
YE _p	Yeast Episomal Plasmid

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Nükleozomun yapısı ve histon oktomeri	6
Şekil 2	Histon oktomeri	7
Şekil 3	ATP-bağımlı kromatin-tekrar modelleme faktörlerinin mekanizmaları	8
Şekil 4	Histon asetilasyonu ve histon deasetilasyonu modeli	10
Şekil 5	SAGA kompleksi ve modülleri	12
Şekil 6	Gcn5 içeren farklı komplekslerin asetilasyon verimliliği	13
Şekil 7	Gcn5p'nin alanları	14
Şekil 8	Trehaloz disakkariti	15
Şekil 9	Trehalozun biyosentezi ve yıkımı	17
Şekil 10	cAMP/PKA sinyal yolağı ve çevresel stres yanıtının (ESR) PKA bağımlı kontrolü	21
Şekil 11	<i>S. cerevisiae</i> maya hücrelerinde TORCI ve TORCII sinyal sistemi	24
Şekil 12	<i>S. cerevisiae</i> maya hücrelerinde TORC1 aktivitesinin regülasyonu	28
Şekil 13	Farklı besin-bağımlı kinazlardan gelen sinyallerin Rim15 kinaz aracılığıyla integrasyonu	29
Şekil 14	Maya hücrelerinde genel amino asit kontrol (GAAC) yolağının modeli	33
Şekil 15	<i>GCN4</i> mRNA'nın yapısı ve translasyon için taraması	34
Şekil 16	<i>GCN4</i> -mRNA translasyonu (a) Normal üreme koşullarında (b) Stres koşullarında	34
Şekil 17	TORC1 ve GAAC sinyal yolları arasındaki regülasyon	35
Şekil 18	Yaban tip (BY4741) maya suşunun zamana karşı absorbands (OD ₆₀₀) değerlerini içeren üreme grafiğı	43
Şekil 19	Mutant (Δ <i>gcn5</i>) maya suşunun zamana karşı absorbands (OD ₆₀₀) değerlerini içeren üreme grafiğı	44
Şekil 20	Yaban tip (BY4741) maya suşunun logaritmik üreme grafiğı	45

Şekil 21	Mutant (<i>Δgcn5</i>) maya suşunun logaritmik üreme grafiği üreme grafiği	46
Şekil 22	Yaban tip (BY4741) maya suşundaki ikilenme süresi ve spesifik üreme oranı	47
Şekil 23	Mutant (<i>Δgcn5</i>) maya suşundaki ikilenme süresi ve spesifik üreme oranı	48
Şekil 24	<i>TPS1</i> promotorunun nükleozom enerji diagramı (a) ve kromatin modeli (b)	53
Şekil 25	<i>NTH1</i> promotorunun nükleozom enerji diagramı (a) ve kromatin modeli (b)	54
Şekil 26	<i>TPS1</i> promotor analizi	55
Şekil 27	<i>NTH1</i> promotor analizi	56
Şekil 28	Gcn5 proteininin <i>NTH1</i> ve <i>TPS1</i> promotor aktivasyonuna etkisi	59
Şekil 29	Normal üreme koşullarında <i>NTH1</i> ve <i>TPS1</i> transkripsiyonun aktivasyon modeli (A) Yaban tip maya hücrelerinde Gcn5p histon asetilasyonu ile TBP alımının engellenmesi (B) Mutant maya hücrelerinde Gcn5p-bağımlı asetilasyonun gerçekleşmemesi ve promotora artan TBP alımı sonucu artan transkripsiyon	61
Şekil 30	Stres koşullarında yaban tip ve <i>Δgcn5</i> maya hücrelerinde <i>TPS1</i> promotor aktivasyonu	64
Şekil 31	Stres koşullarında yaban tip ve <i>Δgcn5</i> maya hücrelerinde <i>NTH1</i> promotor aktivasyonu.	65
Şekil 32	Stres koşullarında yaban tip ve mutant maya hücrelerinde <i>TPS1</i> aktivasyonu. (A) Yaban tip maya hücrelerinde Gcn5p histon asetilasyonu ile aktive edilen transkripsiyon (B) Mutant maya hücrelerinde Gcn5p'ye bağlı asetilasyonun gerçekleşmemesi ve TBP alımının regüle edilememesi nedeniyle azalan transkripsiyon	67
Şekil 33	Stres koşullarında yaban tip ve mutant maya hücrelerinde <i>NTH1</i> aktivasyonu. A) Yaban tip maya hücrelerinde Gcn5p histon asetilasyonu ile TBP alımının engellenmesi ve HDA kompleksinin promotora alımı ile transkripsiyonun baskılanması	68

B) Mutant maya hücrelerinde Gcn5p'ye bağlı asetilasyonun gerçekleşmemesi ve HDA kompleksinin promotora alınamaması nedeniyle artan hiper aktivasyon

Şekil 34	Gcn5 proteininin trehaloz ve glikojen birikimine etkisi	70
Şekil 35	Yaban tip ve $\Delta gcn5$ maya suşlarının stres koşullarında trehaloz birikimi	73
Şekil 36	Yaban tip ve $\Delta gcn5$ maya suşlarının stres koşullarında glikojen birikimi	74



BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Ekmek yapımı, şarap üretimi, alkol damıtımı veya tedavi gibi farklı amaçlar için insanlık tarihi boyunca kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* maya türü tek hücreli bir mikroorganizmadır. *S. cerevisiae*, 1838'de Meyen tarafından tanıtılmasından bu yana en çok incelenen ve en iyi anlaşılan ökaryot olarak insanlığa hizmet etmektedir (Stewart, 2014). Fungi alemi içerisinde sınıflandırılan maya insanlar için hastalık yapıcı patojenite özelliği taşımaz ve hücreleri hızlı bir şekilde büyüme kolaylığına sahiptir. *S. cerevisiae* maya türünün genetik materyali istenilen şekilde manipüle edilebilir ve yüksek verimlilikle doğrudan değiştirilebilir. Mayalar, yapısında bulunan genlerin gelişmiş ökaryotik canlılarda da yüksek oranda benzerlik göstermesi nedeni ile biyokimya, moleküler biyoloji, hücre biyolojisi, sistem biyolojisi gibi araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca *S. cerevisiae*; proteom, transkriptom ve metabolom gibi birçok analiz çalışmaları için de öncelikle tercih edilen model organizma olarak kabul edilmiştir (Sherman, 2002; Cherry vd., 2011).

Genomu sekanslanan ilk ökaryotik mikroorganizma olan *S. cerevisiae* (S288c) büyüklüğü, 200-2000 kb arasında değişen 16 doğrusal kromozom içermektedir. Toplam genom, 12.07 Mb kromozomal DNA, 85 kb mitokondriyal DNA ve 6,3 kb epizomal plazmidlerini (2 μ) içerir. *S. cerevisiae* genomu 6604 açık okuma çerçevesi (ORF'ler) içerir, bu ORF'lerin 1786'sının işlevi bilinmemektedir ve bu genomda 428 RNA geni bulunur. Bunun 299'u tRNA, 77'si küçük nükleolar (snoRNA), 27'si rRNA, 18'i kodlamayan (nc) RNA, 6'sı ise küçük nükleer (sn) RNA ve bir telomeraz RNA olarak açıklanmıştır. Maya proteom analizlerinde insan proteinlerinin büyük çoğunluğunun maya hücrelerinde de homoloğu bulunduğu belirtilmiştir (Goffeau vd.,1996; Engel ve Cherry, 2013; Belda vd., 2019).

Trehaloz, çevresel stres koşullarında *S. cerevisiae* maya hücreleri tarafından sentezlenen önemli bir depo karbonhidrattır. 1832'de Wiggers tarafından çavdar otunda keşfedilen trehaloz, indirgenmeyen bir disakkarit olarak iki glikoz molekülünün α,α -1,1 bağı ile bağlanmasıyla oluşur. Trehalozun maya hücresindeki varlığı ise ilk defa Koch ve Tanret

tarafından keşfedilmiştir (Eleutherio vd., 2014). Maya hücrelerinde enerji kaynağı olarak kullanılan trehaloz aynı zamanda stres metaboliti olarak da görev yapar. Bu sebeple maya hücrelerinde trehaloz birikimi çevresel koşullara göre değişiklik gösterebilir. Hücrenin fizyolojik koşulları, üreme ortamı ve safhaları gibi birçok farklı etken hücre içi trehaloz miktarına etki eder. *S. cerevisiae* maya hücrelerinde trehaloz sentezi logaritmik aşamanın sonunda başlar ve üremenin yavaşlayarak durma noktasına geldiği zamana kadar devam eder. Trehalozun hücrede glikoz girişini de kontrol ettiği bilinmektedir (Eleutherio vd., 2014; Elbein, 2003). Trehaloz maya hücreleri için koruyucu bir disakkarittir. Trehaloz birikimi hücreyi oksidatif strese, ısı stresine ve kimyasallar gibi çeşitli stres faktörlerine karşı korumaktadır. Bu sayede maya stres koşullarında hücre içinde trehaloz biriktirerek proteinlerin yıkımı engellenir ve hayatta kalım sağlanmış olur (Eleutherio vd., 2014; Benaroudj vd., 2001). Mikroorganizmalarda olumsuz çevre koşullarına tepki için karbon ve enerji rezervi olarak sadece trehaloz değil glikojen de depo edilir. Glikojen, birçok glikoz molekülünün α -1,4 ve α -1,6 glikozit bağı oluşturmasıyla meydana gelen bir makromoleküldür. Maya hücrelerinin hayatta kalmasında trehaloz gibi görev olarak yedek bir karbonhidrat olarak bulunur (Silljé vd., 1999).

Trehalozun sentezi TPS (Trehaloz Fosfat Sentaz) olarak bilinen ve 4 alt ünitelerden oluşan enzim kompleksi ile gerçekleşir. TPS kompleksi Tps1p, Tps2p, Tps3p ve Tsl1p alt birimlerine sahiptir. Trehaloz biyosentezi Tps1p ve Tps2p katalitik alt birimlerinin görev almasıyla gerçekleşir (Eleutherio vd., 2014). Tps3p ve Tsl1p ise TPS kompleksinin kararlı halde bulunmasında rol alır. Trehaloz-6-fosfat sentaz (TPS) *TPS1* geni tarafından kodlanır. *TPS1* geni mutasyona uğradığında maya hücrelerinin trehaloz sentezleyemediği ve *TPS1*'in stres koşullarında aktivasyon gösterdiği belirtilmiştir (Elbein, 2003; Eleutherio vd., 2014). Trehalozun yıkımı ise trehalaz enzimi tarafından katalize edilir (Eleutherio vd., 2014). *NTH1* ve *NTH2* genleri tarafından kodlanan Nötral Trehalaz ve *ATH1* tarafından kodlanan Asit Trehalaz mayada bulunan iki farklı trehalaz enzimidir. Hücrede stres koşulları ortadan kalktığında trehaloz yıkımı nötral trehalaz Nth1p üzerinden gerçekleşir. Besin, ozmotik stres, ısı, toksik kimyasallar gibi koşulların stres oluşturduğu durumlarda ise *NTH1* ve *NTH2* genlerinin ekspresyonu artar (Eleutherio vd., 2014; Parrou vd., 2005). Stres koşullarında aktivasyonu artan *TPS1* ve *NTH1* genlerinin transkripsiyonel regülasyonunda rol alan proteinler ve transkripsiyon elemanları benzerlik göstermektedir. Her iki genin de promotor

bölgesinde STRE (Stres Response Elements) dizilerinin var olduğu ve genel stres faktörlerinin (Msn2/4p) bu dizilere bağlanarak transkripsiyonel aktivasyonu gerçekleştirdiği belirtilmiştir (Eleutherio vd., 2014).

S. cerevisiae maya türünün sıklıkla çalışılmasıyla histonların ve kromatin yapısının transkripsiyon düzenlenmesindeki önemi de araştırılmıştır. Gen ifadesinde genom bazında modifikasyonlara ve kromozomal yapıda değişikliklere sebep olan kavrama “Epigenetik Modifikasyonlar” denir. Çoğunlukla transkripsiyonda bir artışa sebep olan bu olay, histon H3 ve histon H4’lerde asetilasyon ile gerçekleşir (Benayoun vd., 2015). Kromatin yapısının düzenlenmesinde histon asetilasyonu bu sebeple önemli bir rol oynar. Histon-DNA etkileşimlerinin gevşemesi asetilasyon ile gerçekleştirilir ve transkripsiyon faktörleri tarafından DNA’ya daha kolay erişim sağlanır. Histon asetiltransferazlar, asetil gruplarını histonlara aktaran enzimlerdir. Böylece gen ekspresyonu düzenlenir (Huang vd., 2020).

S. cerevisiae maya hücreleri, çevresel şartlara ve stres koşullarına göre ani tepkiler vererek gen ekspresyonunun aktivasyonunu veya inaktivasyonunu gerçekleştirirler. Birçok mekanizmanın etkili olduğu transkripsiyon, transkripsiyonel aktivatör proteinlerinin bazı özelleşmiş promotor elemanlarına (UAS’ler-Upstream Activating Sequences) bağlanması ile aktive edilir (Natarajan vd., 2001). Ökaryotlarda transkripsiyonun başlatılması, TATA bağlanma proteinlerinin (TBP) promotora bağlanması ile başlamaktadır. SAGA, (Spt-Ada-Gcn5-Asetiltransferaz), TATA bağlanma proteininin promotora bağlanmasını kolaylaştıran ve birkaç alt birimden oluşan bir komplekstir. SAGA kompleksi, Gcn5p içerir ve hedef genlerin ekspresyonunu düzenler. *GCN5* (General Control Non-derepressible 5) geni histon asetiltransferaz enzimini kodlamakta olup, transkripsiyonla bağlantılı olduğu tanımlanan ilk enzimdir ve SAGA kompleksinin alt birimi olarak görev alır (Rodriguez-Navarro, 2009). Gcn5p ko-aktivatör komplekslerinin katalitik bileşeni olarak hücrede farklı işlevlere sahiptir (Rodriguez-Navarro, 2009).

Trehaloz disakkariti stres koşullarında hayatta kalmayı sağlayarak ve enerji deposu olarak kullanılarak hücre için önemli bir görev üstlenmektedir. Maya hücrelerinin stres karşısındaki yanıt verme şekilleri ve buna bağlı genlerinin etkileşimleri de uzun yıllardır

araştırmalara konu olmuştur. Literatürde stres başlıkları altında ayrı olarak incelenen, farklı çalışmalar yapılan SAGA/Gcn5p ve trehaloz metabolizma genlerinin bu çalışmada olası aktiviteleri ve etkileşimleri ilk defa incelendi. Dolayısıyla potansiyel olarak transkripsiyonel ko-regülatörü olduğunu düşündüğümüz Gcn5p'nin *NTH1* ve *TPS1* genlerinin transkripsiyonuna etkisinin ve hücre içinde biriken trehaloz glikojen birikiminin belirlenmesi amaçlanmıştır. Sonuç olarak trehaloz metabolizması için gerekli olan *NTH1* ve *TPS1* genlerinin transkripsiyonel regüasyonunda rol alan proteinlerden bir tanesinin daha görevi belirlenmeye çalışılmıştır.

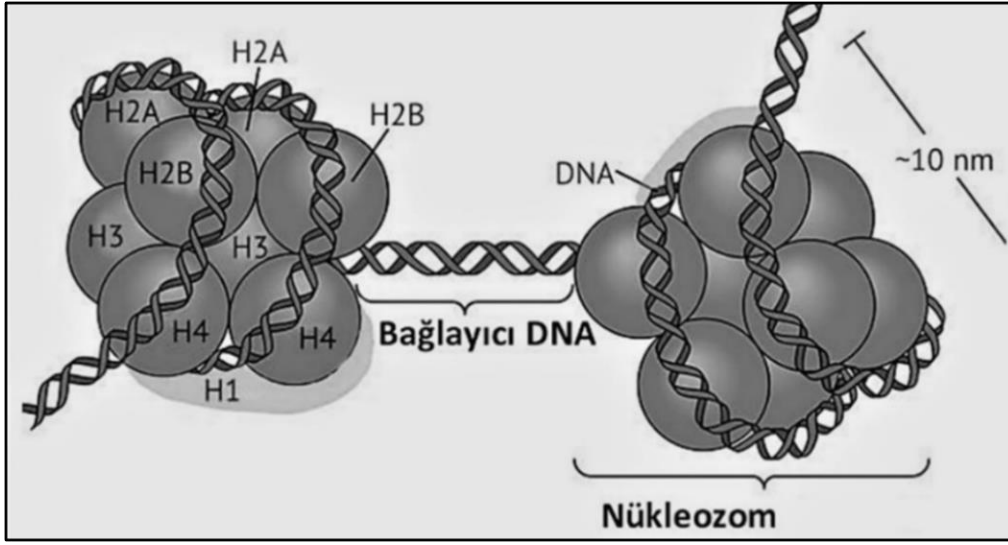


İKİNCİ BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1 Ökaryotlarda Kromatin ve Nükleozom Yapısı

Ökaryotik hücrelerde kromatin DNA'nın histon ve non-histon proteinleri ile birlikte nükleus içinde paketlenmesiyle meydana gelir. Transkripsiyon sırasında gerekli faktörlerin ve regülatör proteinlerin bağlanabilmesi için DNA molekülünün bu proteinlerden ayrılarak açılması gereklidir (Pérez-Martin, 1999; Lomvardas ve Thanos, 2002). Nükleozomlar kromatinin temel alt birimini oluşturmaktadır. Her bir nükleozom, histon oktameri olarak bilinen, sekiz histon proteininin etrafına sarılmış DNA zincirinden oluşmaktadır. Histon oktameri her birinden iki kopya olan H2A, H2B, H3 ve H4 histon proteinlerinden meydana gelir ve oktamerik çekirdek olarak adlandırılır. Oktamerik çekirdek 147 baz çifti içeren DNA molekülü ile sarılmıştır. Oktamerik çekirdekleri bir arada tutan bağlayıcı (linker) DNA'ya bağlanan linker histon H1 proteini ise nükleozomların katlanmasını kolaylaştırır ve sarılmış olan bu yapıyı stabilize eder (Şekil 1). Nükleus içindeki her bir histon proteini, hidrofobik merkezi çekirdek yapısına (central core domain) ve DNA'nın dışına doğru uzayan esnek ve yüklü bir kuyruk yapısına (amino-terminal tail domain) sahiptir. Merkezi histon yapısı nükleozom içindeki histonların birbirleriyle ve DNA ile etkileşimlerinde görev almaktadır (Luger vd., 1997; Pérez-Martin, 1999). Histon kuyrukları pozitif yüklü olup post-translasyonel modifikasyonların gerçekleşebilmesi için önemli hedef protein bölgelerini oluşturur (Şekil 2). Tersine çevrilebilir bu modifikasyonlar sayesinde histonların yükleri, konformasyonları, DNA ile veya diğer proteinlerle etkileşimleri değişir (Pérez-Martin, 1999).



Şekil 1. Nükleozomun yapısı ve histon oktameri.

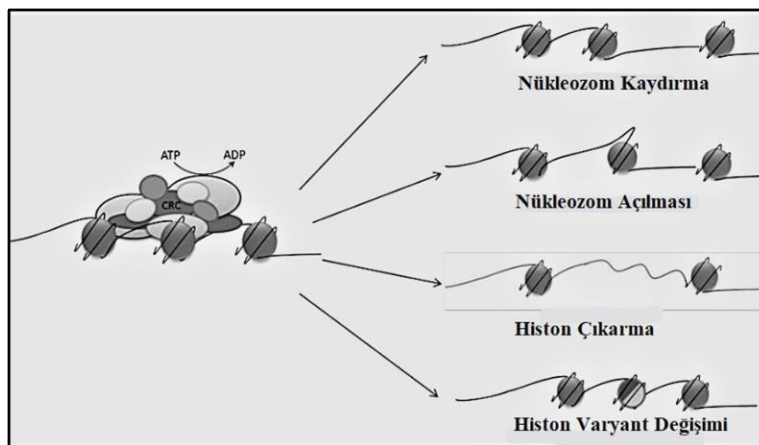
Lu vd., 2018'den modifiye edilmiştir.

Ökaryotik hücrelerde gen ekspresyonu özellikle transkripsiyonun başlama aşamasında (transcription initiation step) sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Transkripsiyon faktörlerinin ve RNA polimeraz enziminin bağlanmasına promotor bölgesinde yer alan histon proteinleri fiziksel bariyer oluşturmaktadır (Wu, 2000). Histon proteinleri DNA ile etkileşimini etkileyen farklı translasyon sonrası modifikasyonlara (post-translational modifications, PTM) uğramaktadır. Bazı modifikasyonlar histon-DNA etkileşimini bozarak nükleozomların gevşemesine ve açık kromatin konformasyonuna (ökromatin) dönüşüme neden olur. Böylece transkripsiyon kompleksinin DNA'ya bağlanarak ilgili genlerin transkripsiyonunun aktivasyonu (gene activation) gerçekleşir. Buna karşılık, histon-DNA etkileşimlerini güçlendiren modifikasyonlar, heterokromatin adı verilen sıkı paketlenmiş bir kromatin oluşturmasına neden olur. Bu durumda transkripsiyon kompleksinin DNA'ya erişimi engellendiğinden ilgili genlerin transkripsiyonu gerçekleşmez ve genler susturulur (gene silencing). Kromatin tekrar-modelleme kompleksleri aracılığıyla histon modifikasyonları ve gen ekspresyonu regüle edilmektedir (Pérez-Martín, 1999; Wu, 2000).

ve iyi anlaşılan histon modifikasyonlarıdır (Wu, 2000; Sadakierska-Chudy ve Filip, 2014). Yüklü histon kuyruklarının farklı mekanizmalarla modifiye edilmesi transkripsiyon için gerekli olduğu gibi mitozu, DNA tamirini ve kromatin oluşumunu da regüle etmektedir (Wu, 2000).

DNA'nın transkripsiyon için erişilebilir pozisyona getirilmesinde ATP-bağımlı kromatin-tekrar modelleme faktörleri rol alır. ATP hidrolizinden elde edilen enerjinin kullanılmasıyla nükleozom pozisyonlarının kaydırılması (sliding), histon-DNA etkileşiminin bozulması (unwrapping), histonların çıkarılması/eklenmesi (histone eviction) veya histonların histon varyantları ile değiştirilmesi (exchange of histone variants) gerçekleştirilir (Şekil 3) (Zhong vd., 2013).

SWI/SNF kompleksi ilk olarak *S. cerevisiae* maya hücrelerinde sukroz metabolizmasında görevli olan *SUC2* gen ekspresyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda tanımlanmıştır (Neigeborn ve Carlson, 1984). SWI/SNF kompleksi Arp modülü, katalitik modül, Snf5/Swi3 modülü ve Swi modülü olmak üzere 4 temel alt ünite modülünden oluşur (Dutta vd., 2017). SWI/SNF kompleksi histon oktomerlerini kaydırarak veya çıkartıp-ekleyerek birçok genin transkripsiyonunu düzenlemektedir (Smith vd., 2003).



Şekil 3. ATP-bağımlı kromatin-tekrar modelleme faktörlerinin mekanizmaları.

Zhong vd., 2013'den modifiye edilmiştir.

ISWI (Imitation SWItch) kromatin tekrar-modelleme faktörü ATPaz aktivitesi aracılığıyla nükleozom konumlandırılmasını değiştirerek kromatin yapısını yeniden organize ederek transkripsiyonun baskılanmasına neden olur. Mayada Isw1 ve Isw2 olarak iki ISWI ATPaz bulunur. Bu iki varyantın farklı kombinasyonları dört farklı ISWI kompleksinin oluşmasını sağlar (Tyagi vd., 2016). ISWI kromatin-tekrar modelleme ailesi ökaryotlar arasında yüksek oranda korunmuştur.

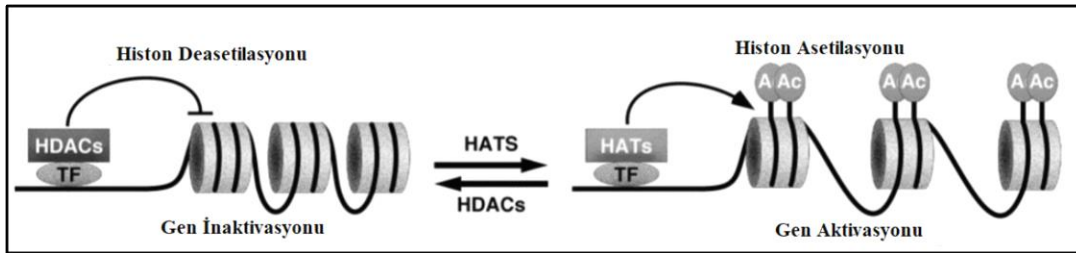
INO80 (INOsitol requiring 80) kromatin tekrar-modelleme ailesi ilk olarak *S. cerevisiae*'de keşfedilmiştir ve inositole duyarlı genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinden sorumludur. *Drosophila* ve insanda *INO80* proteininin homologları bulunmaktadır. *S. cerevisiae*'da *INO80* ve *SWR1* şeklinde bulunan iki kompleks *INO80* altfamilyasında yer alır. *INO80* kompleksi 16 alt birimden oluşurken *SWR1* kompleksi 14 alt birim içermektedir. Bu iki kompleks diğer kromatin tekrar modelleme faktörlerinden farklı olarak DNA onarımında yer alan bakteriyel RuvB helikazıyla ilişkili RvB proteini içeren ATPaz'lara sahiptir (Bao ve Shen, 2011). *INO80* ve *SWR1* kromatin-tekrar modelleme kompleksleri histon H2A varyantları olan H2A.X ve H2A.Z'ye bağlanırlar. Böylece nükleozomlarla etkileşime girerek nükleozomları kaydırır veya histon varyantları ile histonları değiştirerek kromatinleri tekrar şekillendirir (Bao ve Shen, 2011).

Drosophila ve insanda korunmuş olan bir diğer kromatin tekrar-modelleme kompleksi ise CHD (Chromatin Helicase DNA-binding) ailesidir (Woodage vd., 1997). CHD kompleksi, karboksil ucunda (C-terminal) A-T açısından zengin DNA bölgelerine bağlanan bir DNA bağlanma alanı içerirken, amino ucunda ise (N-terminal) metillenmiş lizinleri (H3K4me) bağlayan tandem kromodomain alanı içerir. Bazı CHD kromatin-tekrar modelleme kompleksleri transkripsiyonu organize etmek için nükleozomları kaydırır veya çıkarır (Clapier ve Cairns, 2009; Tyagi vd., 2016).

2.2. Histon Asetilasyonu-Deasetilasyonu

Histon asetilasyonu, nükleozomların açılmasına ve transkripsiyonun aktivasyonuna sebep olduğu için asetilasyon miktarının artması transkripsiyonel aktivasyonla doğru orantılıdır. Histon deasetilasyonu ise nükleozomların sıkıca paketlenmesine neden olduğundan transkripsiyonu baskılar.

Histon asetilasyonu ve deasetilasyonunda yer alan enzimler, metabolik enzimlerin düzenleyicileridir ve protein asetilasyonu/deasetilasyonu dengesinin korunmasında rol alır. Kromozomal yapıları düzenleyerek gen ekspresyonunun gerçekleştirilmesinde rol oynayan bu enzimler Histon Asetiltransferazlar (HAT) ve Histon Deasetilazlardır (HDAC). Bu nedenle asetilasyonda görevli Histon Asetiltransferaz enzimleri pozitif transkripsiyonel regülatörler olarak bilinirken, deasetilasyonda görevli Histon Deasetilaz enzimleri negatif regülatörler olarak bilinmektedir (Şekil 4). Hücre içindeki asetil-CoA ve NAD⁺ metabolitlerinin seviyesi histon asetiltransferazların ve deasetilazların aktivitesini düzenlemektedir (Davie, 1998; Struhl, 1998; Shen vd., 2015).



Şekil 4. Histon asetilasyonu ve histon deasetilasyonu modeli.

Backs, 2005 'ten modifiye edilmiştir.

Asetilasyon-deasetilasyon döngüsü ile transkripsiyon faktörlerinin ilgili genlerin promotor bölgelerine erişimi kontrol edilerek epigenetik bir regülasyon gerçekleştirilir (Huang vd., 2020). Histon asetiltransferazlar asetil grubunu H3 ve H4 histonlarına transfer ederek histon asetilasyonunu gerçekleştirirken histon deasetilazlar histonlar üzerindeki asetil gruplarını uzaklaştırarak histonların tekrar sıkı bir şekilde paketlenmesini sağlar. Histon

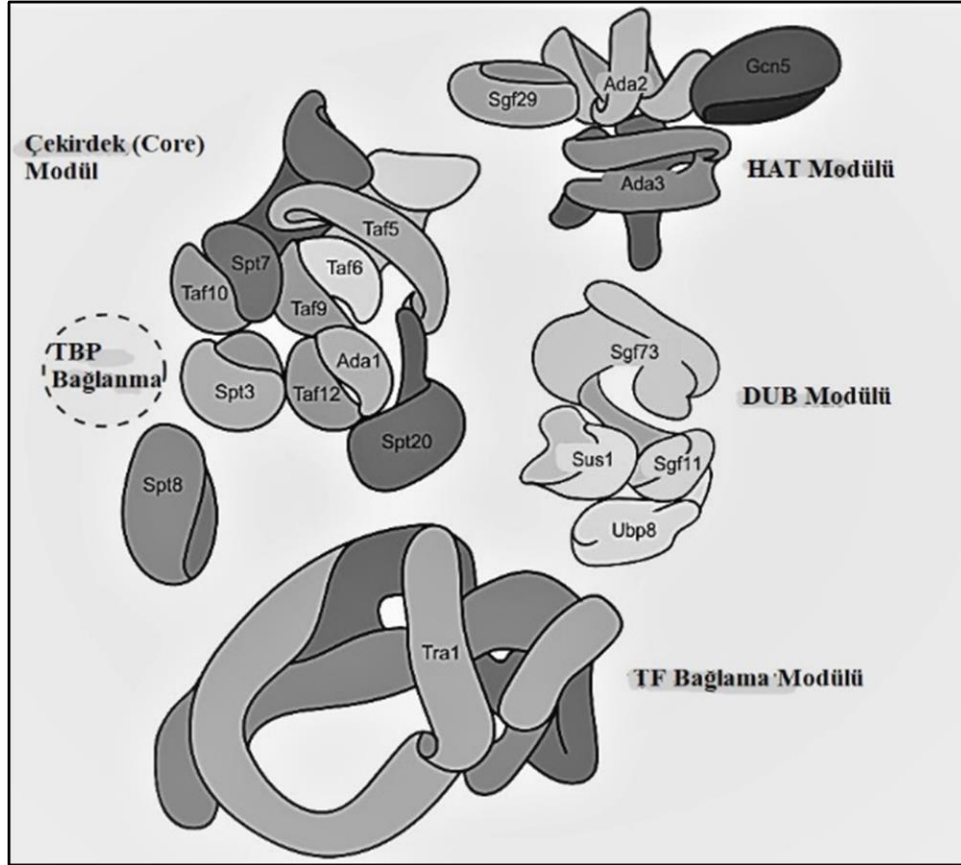
asetiltransferaz enzimi asetil CoA metabolitini substrat olarak kullanarak asetil grubunu (-COCH₃) histonların amino ucundaki lizin amino asitine transfer eder. Asetilasyon sonrası lizinin pozitif yükü nötralize edildiği için DNA ile histon arasındaki etkileşim zayıflar ve nükleozomlar mobilize olur. Histon asetiltransferazlar A tipi ve B tipi olmak üzere iki ayrı sınıfa ayrılır. B tipi asetiltransferazlar yüksek oranda korunmuş olup kromatindeki bağlı histonların yerine sitoplazmada serbest bulunan histonları asetilleme yeteneğine sahiptir (Dutnall vd., 1998; Parthun, 2007; Shen vd., 2015). A tipi asetiltransferazlar çeşitli olup GNAT (*GCN5* related N-acetyltransferases), MYST (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60) ve CBP (CREB-binding protein)/p300 (adenoviral E1A-associated protein of 300 kDa) ailelerine ayrılırlar. A tipi asetiltransferazlar nükleusta kromatin yapısında bulunan histonların asetilasyonunda görev alırlar. Ayrıca A tipi asetiltransferazlar SAGA gibi büyük multiprotein komplekslerinde bulunurlar (Yang ve Seto, 2007).

2.2.1. SAGA Kompleksi

Transkripsiyonel koaktivatör olan SAGA (Spt-Ada-Gcn5 asetiltransferaz) mayalardan yüksek ökaryotik organizmalara kadar korunmuş bir protein kompleksidir. H3 histon asetilasyonu ve deubikitinasyonu olmak üzere iki farklı enzim aktivitesine sahiptir. Bu sayede histonları değiştirerek gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alır (Cheon vd., 2020). SAGA kompleksi hücre dışı çevresel streslere karşı oluşturulabilecek yanıtta görev almaktadır. *S. cerevisiae* maya hücrelerinde genlerin yaklaşık %10'nunun transkripsiyonu SAGA kompleksi ile kontrol edilmektedir. Bu genler genellikle DNA hasarı, ısı, metabolik açlık gibi stres koşulları sırasında aktive olmak için özelleşmiş yukarı regüle edilen genlerdir (Cheon vd., 2020).

S. cerevisiae maya türünde keşfedilen SAGA kompleksi dört fonksiyonel modül içerir (Şekil 5). Bu modüller 19 alt üniteden meydana gelerek SAGA kompleksini oluşturur. İlk modül HAT modülü olup Gcn5p, Ada2p, Ada3p ve Sgf29 proteinlerinden, Temel yapısal modül Taf5p, Taf6p, Taf9p, Taf10p, Taf12p, Ada1p, Spt7p, Spt20p, Spt3p ve Spt8 proteinlerinden, DUB modülü Ubp8p, Sgf73p, Sus1p ve Sgf11 proteinlerinden ve

Transkripsiyon faktörü bağlama modülü Tra1 proteininden oluşmaktadır (Koutelou vd. 2010; Helmlinger vd., 2017).



Şekil 5. SAGA kompleksi ve modülleri.
Cheon vd., 2020'den modifiye edilmiştir.

SAGA koaktivatör kompleksi diğer kromatin modelleyici komplekslerde olduğu gibi indüklenebilir genlerin promotor bölgelerini hedef alarak transkripsiyonu aktive eder. Bu aktivasyon için SAGA kompleksinin hedef genlere yönlendirilmesi Gcn4 gibi transkripsiyonel aktivatörlerin yardımıyla gerçekleşir (Utley vd., 1998; Natarajan vd., 2001). Transkripsiyonel aktivatörlerin yardımıyla hedef genlere yönlendirilen SAGA kompleksi Gcn5 protein aktivitesiyle histon asetilasyonunu Ubp8 protein aktivitesiyle histon deubikitinasyonunu gerçekleştirir (Rodriguez-Navarro, 2009).

2.2.2. GCN5 Gen Yapısı ve Transkripsiyonel Regülasyondaki Rolü

Maya hücrelerinde 7. kromozom üzerinde yer alan *GCN5* (General Control Non-derepressible 5) geni 1320 bç uzunluğunda olup 439 amino asitten oluşan 51065.8 Da ağırlığına sahiptir ve histon asetiltransferaz enzimini kodlamaktadır (Wong vd., 2013). SAGA kompleksinin HAT modülü içinde yer alan Gcn5 proteininin enzimatik aktivitesi için Ada2p ve Ada3p ile fiziksel olarak etkileşime girmesi gereklidir (Armor vd., 2013). Gcn5-Ada2/3 etkileşimi serbest histonların asetilasyonu için yeterli iken DNA-bağlı nükleozomların asetilasyonu için yeterli değildir (Şekil 6). Gcn5-Ada2/3 interaksiyonuna Sgf29 proteininin eklenmesiyle nükleozomal histonların asetilasyonu için gerekli HAT modülü tamamlanır ve asetilasyon aktivitesi artar (Grant vd., 1997; Balasubramanian vd., 2001).

	Gcn5	Ada2/Gcn5	Ada2/Ada3/Gcn5	Ada2/Ada3/Gcn5/Sgf29	SAGA
Histonların Asetilasyon Verimliliği	+	+++	+++	+++	+++
Nükleozomların Asetilasyon Verimliliği	-	+	+++	+++	+++

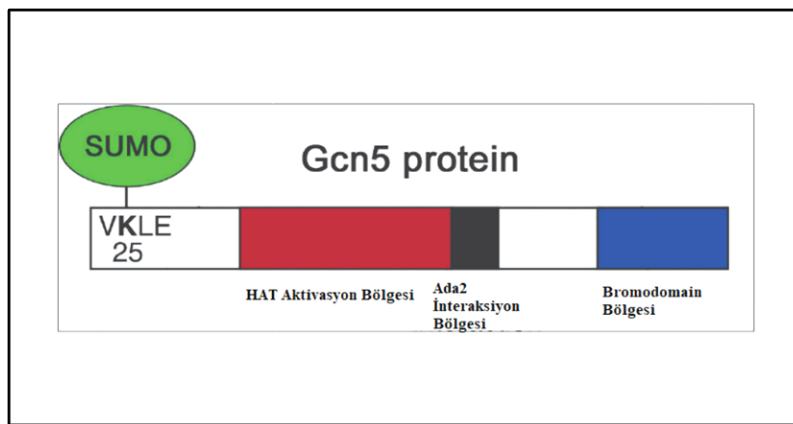
Şekil 6. Gcn5 içeren farklı komplekslerin asetilasyon verimliliği.

Espinola Lopez ve Tan, 2020'den modifiye edilmiştir.

Gcn5 proteini sumoylasyon bölgesi, korunmuş HAT aktivitesine sahip aktivasyon bölgesi, Ada2p interaksiyon bölgesi ve bromodomain olmak üzere 4 önemli bölge içermektedir. Gcn5 proteininin 1. ve 95. aminoasitleri arasındaki bölge daha önce kodlanmayan bölge olarak tanımlanmasına rağmen bu bölgenin sumoylasyon bölgesi olduğu ve transkripsiyonel regülasyonda baskılayıcı rolü olabileceği *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiştir (Sterner vd., 2006) (Şekil 7). Ada2 interaksiyon alanı Ada2p ile etkileşime girerek nükleozomal histonların hedeflenmesinde ve asetilasyonunda rol alır. Karboksil ucunda yer alan bromodomain bölgesi SAGA kompleksinin hedef genlere bağlanması ve

asetilasyon işlemi için gerekli olup bu spesifik bağlanma yalnızca asetil CoA varlığında ve uygun transkripsiyonel aktivatörlerin yönlendirmesi ile gerçekleşir (Li ve Shogren-Knaak, 2009). H3 histonunun amino ucunda yer alan 14. lizin amino asitinin ve H4 histonunun amino ucunda yer alan 18. ve 16. lizin amino asitlerinin asetilasyonu Gcn5 proteininin HAT aktivasyon bölgesi aracılığıyla gerçekleşir (Kuo vd., 1996). HAT aktivasyon bölgesi üzerinde bulunan iki ortogonal oluktan birine asetil CoA substratı diğerine lizin aminoasidi bağlanır. Gcn5 proteininin HAT aktivasyon bölgesi içinde bulunan iki oluğun kesişim kısmında ise kritik öneme sahip glutamat amino asiti yer alır (Tanner vd., 1999; Wagner vd., 1999). Glutamat amino asiti lizin içeren peptitdeki ϵ -aminin deprotonasyonuna neden olur. Bu durum ilk olukta yer alan asetil CoA molekülüne nükleofilik saldırının olmasını tetikleyerek asetil grubunun asetil CoA molekülünden lizin amino asitine geçmesini sağlar.

Gcn5 proteini aracılı asetilasyon seviyesinin artması transkripsiyon aktivasyonunda artışına neden olmaktadır. Gcn5 proteininin ilgili genin promotörüne getirilmesinin ve H3 histon hiperasetilasyonunun Gcn4 ile sağlandığı bilinmektedir (Kuo vd., 2000). Gcn4 proteininin transkripsiyon aktivasyonunda rol alması ise amino asit açlığı ve stres koşullarında indüklenen genlerin promotöründe yer alan TGA(C/G)TCA konsensus sekansına bağlanarak gerçekleşmektedir (Oliphant vd., 1989). Promotör bölgesinde Gcn4 bağlanma elementi içeren genlerin SAGA aracılı histon asetilasyonu ile epigenetik olarak düzenlenme ihtimalinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Kuo vd., 2000).



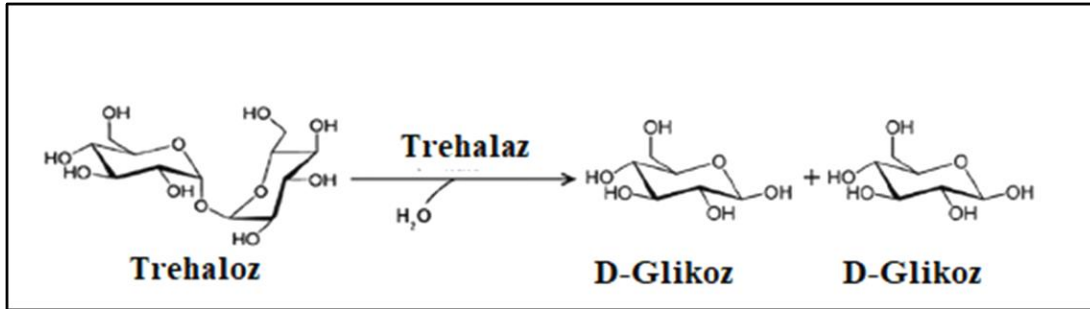
Şekil 7. Gcn5 proteininin yapısı.

Sterner vd., 2006'dan modifiye edilmiştir.

2.3. Depo karbonhidrat Metabolizması

2.3.1 Trehaloz Metabolizması

Hücreleri olumsuz çevre koşullarına karşı koruyan ve enerji kaynağı olarak kullanılan trehaloz molekülü iki glikoz monomerinin α,α -1,1 glikozidik bağı ile oluşan bir disakkarittir (Şekil 8). Bakteriler, mantarlar, bitkiler, omurgasızlar ve memeliler gibi birçok organizmada trehaloz bulunmaktadır. Trehaloz, hücrenin bütünlüğünü çevresel şartlara ve besin kısıtlamalarına karşı korur. Mayada trehaloz, yüksek sıcaklık, oksidatif stres, ozmotik stres, besin veya alkol stresi sebebiyle proteinlerin konformasyonlarının bozulmasını engeller ve denatüre proteinlerin agregasyonunu baskılamaktadır. Isı şoku proteinlerinin (Heat shock proteins, Hsp), diğer proteinlerin nativ konformasyonlarının korunmasında görev aldığı bilirse de trehalozun hücre zarını ve doğal proteinleri stabilize ederek stres koruyucu etki gösterdiği daha önce yapılan çalışmalarla belirtilmiştir (Eleutherio vd., 2014). Olumsuz ortam koşulları ortadan kalktığında trehalozun hızlıca yıkılması ve enerji kaynağı olarak kullanılması gerekir. Aksi takdirde trehaloz tarafından gerçekleştirilen protein stabilizasyonu sonraki aktivasyonu bloke ederek hücresel proteinlere zarar vermektedir (Argüelles, 2000).



Şekil 8. Trehaloz disakkariti.

Maicas vd., 2016’dan modifiye edilmiştir.

Hücre içinde trehaloz molekülünün miktarı belirli bir seviyede tutulmaktadır. Bu nedenle trehalozun sentezinde ve yıkımında görevli proteinler ve ilgili genler sıkı bir şekilde regülasyona uğramaktadır. Trehalozun sentezinden sorumlu TPS (Trehaloz Fosfat Sentaz)

enzim kompleksi Tps1p, Tps2p, Tps3p ve Tsl1p olmak üzere 4 alt üniteden oluşmaktadır. Trehaloz sentezi iki enzimatik basamakta gerçekleşmekte olup ilk basamakta *TPS1* geni tarafından kodlanan trehaloz fosfat sentaz enzimi UDP-Glikoz ve Glikoz-6-fosfatı substrat olarak kullanarak trehaloz-6-fosfat molekülünü sentezler. Sonraki basamakta ise *TPS2* geni tarafından kodlanan trehaloz-6-fosfat fosfataz enzimi trehaloz-6-fosfat molekülünü defosforile ederek trehalozu oluşturur (Şekil 9) (Eleutherio vd., 2014). *TPS1* gen mutasyonu taşıyan maya hücreleri trehaloz sentezleyememektedir (Elbein vd., 2003; Eleutherio vd., 2014).

Sistemik adı YBR126C olan *TPS1* (Trehalose-6-Phosphate Synthase) geni *S. cerevisiae*'da 2. kromozom üzerinde bulunmaktadır. 1485 bp uzunluğunda nükleotit dizisine sahip olan *TPS1*, 495 aminoasitten oluşmaktadır ve 56 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. Trehaloz-6-fosfat sentaz (Tps1p), maya hücrelerinde trehalozun biyosentezi ve strese direnç için anahtar enzimdir. Trehaloz-6-fosfat molekülü heksokinaz aktivitesini inhibe ederek maya hücrelerinde glikolize giren glikoz seviyesini düzenler (Hohmann vd., 1996). Ancak $\Delta tps1$ maya hücrelerinin üreme ortamına amino asitlerin eklenmesi sonrasında mutant maya hücrelerinin glikozda çoğalabildikleri gözlenmiştir. Bu durum maya hücrelerinde karbon sinyal sistemi ile azot metabolizması arasında çapraz bir regülasyonun olduğunu göstermektedir (Foster vd., 2003). Tps1 proteini heksokinaz (Hxk2p) aracılığıyla heksoz taşıyıcı proteinleri (hexose transportes, HXT) etkiler ve inhibe eder (Elbein vd., 2003).

Trehalozun sentezi ve hidrolizi, trehaloz metabolizması için önemlidir ayrıca glikolizin kontrollü bir şekilde gerçekleşmesinde de rol oynar (Elbein vd., 2003). Stres koşulları ortadan kalktığında trehaloz disakkariti Trehalaz enzimi (EC 3.3.1.28) ile iki glikoz monomerlerine parçalanır. Maya hücrelerinde *NTH1* ve *NTH2* genleri tarafından kodlanan Nötral Trehalaz ve *ATH1* tarafından kodlanan Asit Trehalaz olmak üzere iki farklı trehalaz enzimi bulunmaktadır. Asit trehalazlar (Ath1p) vakuol ve periplazmik alanda lokalize olurlar ve pH değeri 4.5 olduğunda optimum aktivite göstermektedir. Nötral trehalazlar (Nth1p ve Nth2p) ise sitoplazmada bulunurlar ve optimum pH değerleri 7.0 olduğu için nötral trehalaz olarak adlandırılmıştır (Parrou vd., 2005). Periplazmik alanda bulunan asit trehalaz dışarıdan alınan trehalozun parçalanmasını sağlarken, vakuolde bulunan asit trehalazın fonksiyonu

hakkında yeteri kadar bilgi bulunmamaktadır (Jules vd., 2004; Parrou vd., 2005; Eleutherio vd., 2014). Hücre içi trehaloz yıkımı nötral trehalaz Nth1p üzerinden gerçekleşir ve besin, ısı, toksik kimyasallar gibi stres koşulları *NTH1* ve *NTH2* genlerinin ekspresyonunu indükler (Eleutherio vd., 2014).



Şekil 9. Trehalozun biyosentezi ve yıkımı.

Argüelles, 2000'den modifiye edilmiştir.

Sistematik adı YDR001C olan *NTH1* (Neutral TreHalase) geni *S. cerevisiae*'da 4. kromozom üzerinde bulunmaktadır. 2079 bp uzunluğunda nükleotid dizisine sahip olan ve intron içermeyen *NTH1*, 693 amino asitten oluşmaktadır ve 79,6 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. Nth1p enziminin aktivasyonu için Ca^{2+} veya Mn^{2+} kofaktörleri gerekirken inhibisyonu için Mg^{2+} kofaktörü gerekir. Nth1p fosfoprotein yapısındadır, cAMP'ye bağlı Protein Kinaz A (PKA) tarafından fosforlanarak aktive edilir ve defosforilasyon yolu ile inaktive edilir. Böylece Nth1 proteininin enzimatik aktivitesi fosforilasyon ve defosforilasyon ile sıkı bir şekilde kontrol edilmiş olur. Durağan fazdaki maya hücrelerinin bulunduğu üreme ortamına glikoz eklendiğinde nötral trehalaz enzimi aktive olur trehaloz yıkılır. *NTH1* mutasyonu taşıyan bir maya suşunun trehalozu hidroliz edemediği ve stres ortadan kalktığında ise hücrenin iyileşmesinde kusurlar olduğu rapor edilmiştir (Eleutherio vd., 2014).

TPS1 ve *NTH1* genlerinin stres koşullarında transkripsiyonu artmaktadır. *TPS1* ve *NTH1* promotorunda bulunan STRE elementleri genel stres faktörlerinin bağlanması ve stres yanıtı olarak gerçekleşen transkripsiyon için önemlidir. Trehaloz sentezi için gerekli olan genlerin ekspresyonu besin açlığı, ısı ve ozmotik stres tarafından uyarılır. *NTH1* ekspresyonu ise ısı şoku, oksidatif ajanlar, toksik kimyasallar ve ortamdaki glikozun tükenmesi ile indüklenir (Winderickx vd., 1996; Eleutherio vd., 2014).

2.3.2. Glikojen Metabolizması

Maya hücreleri tarafından hücre içinde biriktirilen trehaloz kadar önemli olan bir diğer karbonhidrat da glikojendir. Glikojen molekülü oldukça dallanmış yapıda olup düz zincir içinde glikoz moleküllerinin α -1,4-glikozidik bağı ile ve dallanma noktalarında α -1,6-glikozidik bağı ile bağlanan yüksek moleküler kütleli bir polisakkarittir. Maya hücrelerinde düz zincirler 11-12 glikoz birimi içermekte olup yaklaşık 10^7 - 10^8 moleküler ağırlığındadır. Uzun dönem besin açlığında yüksek glikojen miktarının hayatta kalmak için önemli olduğu bilinmektedir (Eleutherio vd., 2014).

Glikojen sentezi glikojenin (EC 2.4.1.186), glikojen sentaz (EC 2.4.1.11) ve dallanma enziminin (EC 2.4.1.18) aktiviteleri sonucu meydana gelmektedir. Glikojenin (*GLG1* ve *GLG2*) kendi kendine glikozillenen bir başlatıcı protein iken glikojen sentaz (*GSY1* ve *GSY2*) ise glikojen sentezini katalizler. Glikoz kaynağı olarak kullanılmak üzere UDPG (UDP-Glikoz) üretilmesi bu sentezin ilk adımıdır. Hem glikojen hem de glikojen sentaz UDP-Glikoz kullanır (Cheng vd., 1995; Eleutherio vd., 2014). UTP ve glikoz-1-fosfattan UDPG pirofosforilaz sentezlenir. Bu olay UDPG pirofosforilaz enzimi (EC 2.7.7.9) tarafından katalize edilen bir reaksiyondur. UDPG molekülü N-glikozilasyonu, galaktozun karbon kaynağı olarak kullanımı, trehaloz üretimi ve hücre duvarında bulunan β -glukan sentezi için gereklidir (Eleutherio vd., 2014). Bu nedenle *UGP1* geninin regülasyonu ve Ugp1 proteininin aktivitesi maya hücreleri için oldukça önemlidir (Wilson vd., 2010). Glikojen sentaz tarafından katalize edilen doğrusal α -1,4 glikozidik bağlarının oluşumu ve glikojen dallanma enzimi (*GLC3*) tarafından gerçekleştirilen α -1,6 glikozidik bağları yoluyla zincirin dallanması glikojeni oluşturur.

Glikojenin degradasyonu ise iki farklı şekilde gerçekleşir. Birincisi *GPH1* tarafından kodlanan glikojen fosforilaz (EC 2.4.1.1) enzimi ile glikojenin glikoz monomerlerine parçalanmasıdır. Bu reaksiyon sonucunda α -1,4 glikozidik bağlı zincirlerin indirgen olmayan uçlarından glikoz-1-fosfat formunda glikoz serbest kalır. *GPH1* geninin ekspresyonu hücreler durağan faza yaklaştıkça indüklenir ve cAMP bağımlı PKA yolu tarafından düzenlenir. Diğer degradasyon yolu ise *SGAI* geninin kodladığı vakuolar glukoamilaz (EC 3.2.1.3) tarafından glikojenin yıkımıdır. Bu reaksiyon sonucunda ise glikojenden fosforlanmamış serbest glikoz oluşur (Wilson vd., 2010).

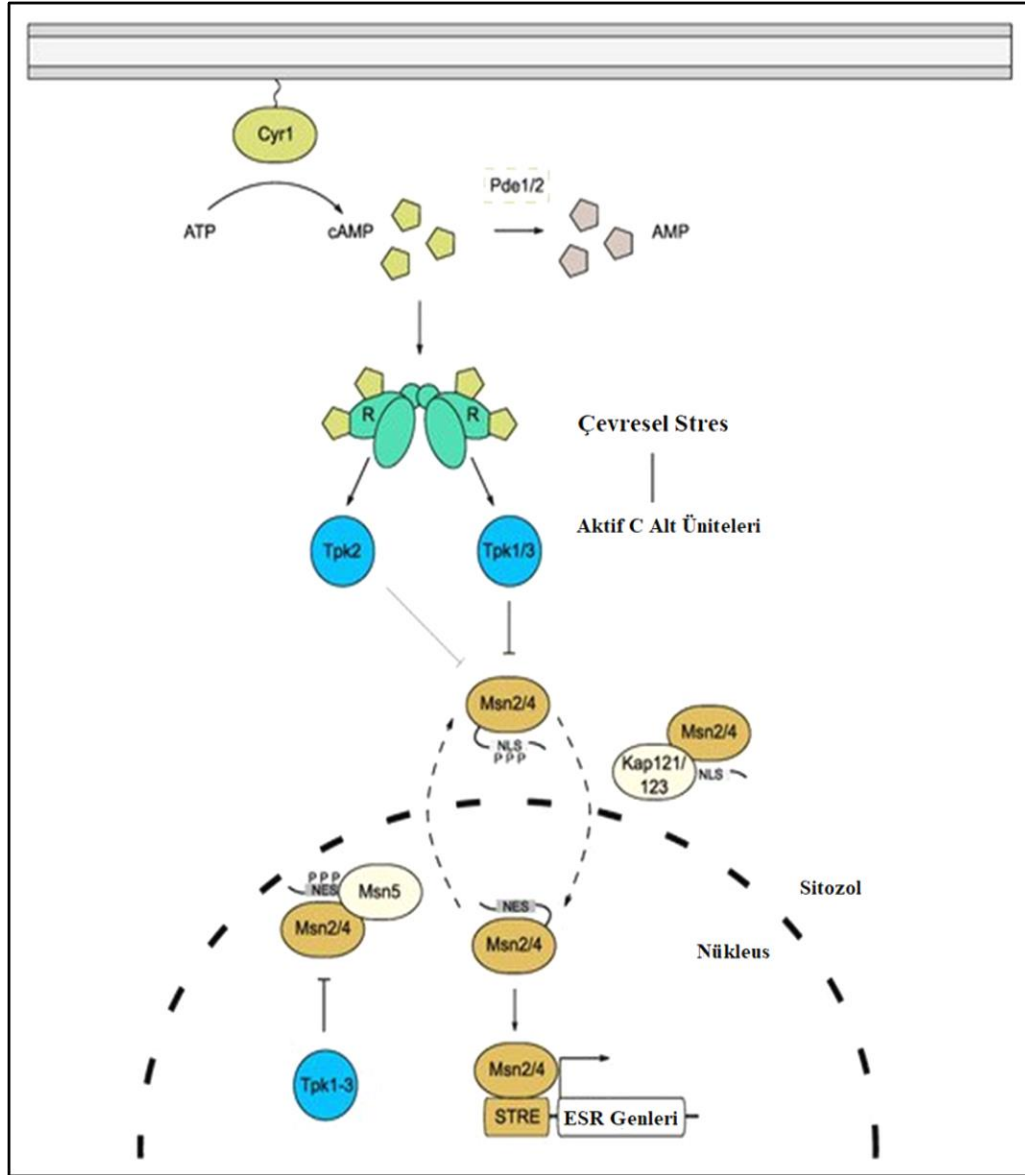
Glikojen metabolizmasında görevli enzimlerin aktivitesi sıkı bir şekilde düzenlenir. Bu enzimleri kodlayan genlerin ekspresyonu hücreler durağan fazına yaklaştıkça cAMP-PKA yolağı aracılığıyla aktive edilir. PKA yolağının aktivasyonu glikojen birikiminin azalmasına, baskılanması ise glikojenin yüksek oranda birikmesine neden olur. PKA yolağı *GSY1*, *GSY2*, *GLG1*, *GLG2*, *GPH1*, *GLC3* ve *GDB1* genlerinin transkripsiyonunu kontrol eder (Eleutherio vd., 2014). *GSY2* ekspresyonu ısı stresinde, azot ve glikoz açlığında, artmaktadır (Parrou vd., 1999).

2.4. PKA Sinyal Yolağı

Protein kinaz A yolağı maya hücrelerinde büyümede, metabolik olaylarda ve stres-yanıt mekanizmasında önemli rolü olan sinyal yollarından biridir. PKA enzimi iki katalitik alt üniteden (C-subunit) ve iki düzenleyici alt üniteden (R-subunit) oluşan tetramerik yapıda (R_2C_2 complex) bir enzim kompleksidir. Katalitik alt ünite birbirleri ile izoform olan *TPK1*, *TPK2* ve *TPK3* (Takashi's Protein Kinase) genleri tarafından kodlanan Tpk1-3 proteininden ve düzenleyici alt ünite *BCY1* (Bypass of Cyclic-AMP requirement) geni tarafından kodlanan Bcy1 proteininden meydana gelir (Şekil 10). *S. cerevisiae* maya hücrelerinin canlılığı için PKA aktivitesi elzem olduğundan en az bir katalitik izoform olması gerekmektedir. Tpk izoformlarının aktivitesi çok yönlüdür ve hücre sel büyüme, karbonhidrat metabolizması, hücre döngüsü ve strese genel tepki dahil olmak üzere birçok gelişimsel ve adaptif süreci kontrol eder (Eleutherio vd., 2014; Creamer vd., 2022). Katalitik ve düzenleyici alt üniteler bir arada olduğunda PKA kompleksi inaktif (inactive R_2C_2

complex) durumdadır. Düzenleyici alt ünitelerin (Bcy1p) her birinde bulunan siklik nükleotid bağlanma bölgesine (cyclic nucleotide binding (CNB) domains) birer cAMP molekülü bağlandığında allosterik regülasyon gerçekleşir ve katalitik birim kompleksten ayrılarak aktif hale gelir (Creamer vd., 2022). Aktif PKA hedef proteinleri fosforlayarak aktivitelerini düzenler.

PKA yolağının en önemli hedef proteinleri çevresel strese yanıtta (Environmental Stress Response, ESR) rol alan proteinlerdir. ESR-yanıt genlerinin (ESR-response genes) transkripsiyonunu uyaran birçok faktörün aktivitesi, PKA aracılı fosforilasyon ile düzenlenir. ESR tarafından indüklenen genlerin büyük bir kısmının promotor bölgesinde çinko-parmak DNA-bağlanma motifine sahip transkripsiyon faktörlerinin bağlanabilmesi için stres yanıt elemanı (STress Response Element, STRE) bağlanma bölgesi bulunmaktadır. *MSN2* (Multicopy suppressor of SNF1 mutation 2) ve *MSN4* (Multicopy suppressor of SNF1 mutation 4) genleri tarafından kodlanan Msn2 ve Msn4 proteinleri çinko-parmak DNA-bağlanma motifine sahip genel stres transkripsiyon faktörleri olup STRE elementlerine (5'–CCCCT–3') bağlanmaktadır (Görner vd., 1998; Conrad vd., 2014). *TPS1*, *NTH1*, *GSY2* ve *GPH1* genlerinin promotorunda Msn2/Msn4 transkripsiyon faktörlerinin bağlanması için gerekli STRE elementleri bulunmaktadır (Francoise ve Parrou, 2001; Sunnarborg vd., 2001).



Şekil 10. cAMP/PKA sinyal yolağı ve çevresel stres yanıtının (ESR) PKA bağımlı kontrolü. Creamer vd., 2022'den modifiye edilmiştir.

Msn2/4 proteinlerinin çekirdek ile sitoplazma arasındaki yer değişimi PKA ve karyoferine-bağımlı bir şekilde gerçekleşir (Görner vd., 1998; Durchschlag vd., 2004). Normal büyüme koşullarında veya PKA aktivitesi yüksek olduğunda, Msn2/4 proteinlerinin nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) içeren bölgesinin PKA tarafından fosforlanması Msn2/4 proteinlerinin sitoplazmada kalmasına neden olur (Jacquet vd., 2003). Msn2 proteinine Kap121 (syn.Pse1p; Protein Secretion Enhancer) ve Kap123 (KARYOPHERIN 123) proteinlerinin bağlanması Msn2p'nin nükleusa geçişini engelleyerek sitoplazmada kalmasını sağlar (Garmendia-Torres vd., 2007). Stres koşullarında veya PKA aktivitesi

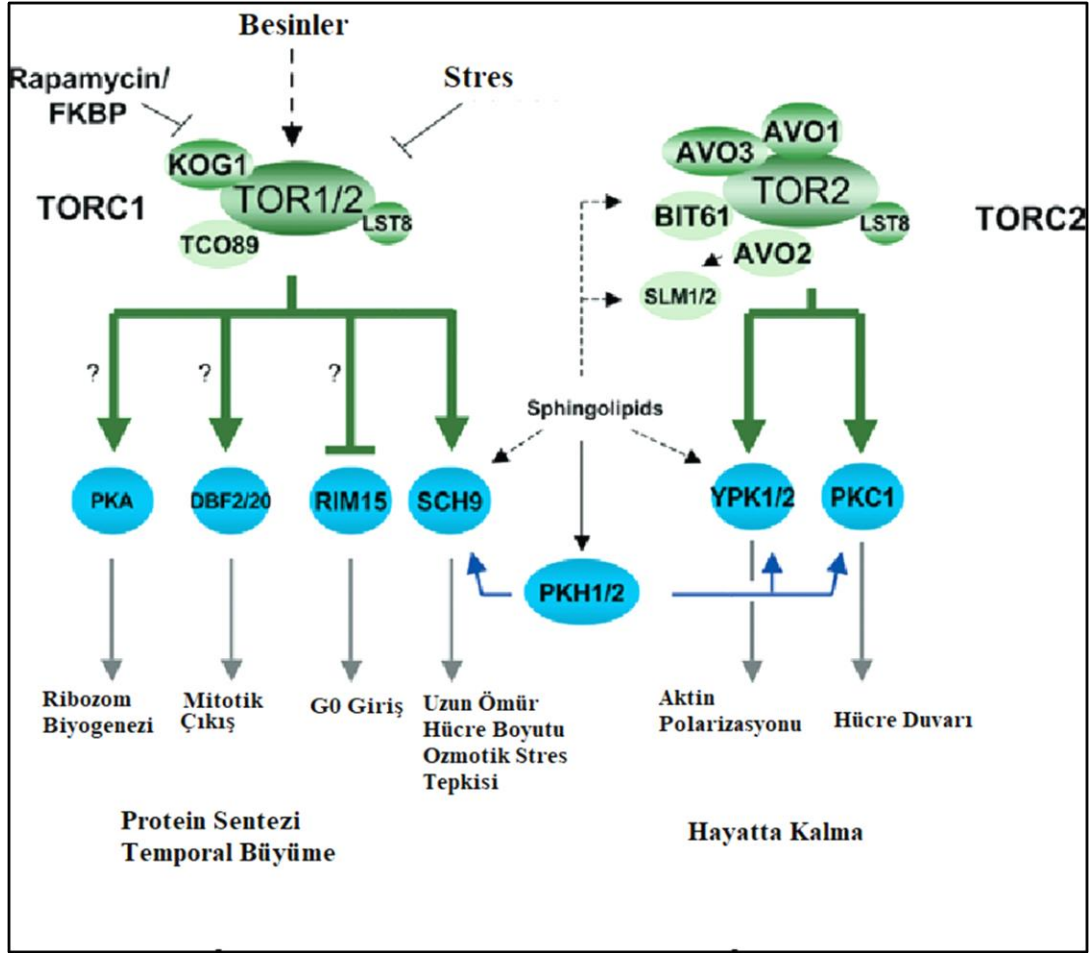
azaldığında ise, Msn2/4 fosfatazlar tarafından defosforile edilerek nükleusa geçer ve orada nükleer import faktörlerine bağlanarak nükleusta birikmeye başlar (Jacquet vd., 2003). Nükleer import faktörü olan Msn5 proteininin Msn2p'nin nükleer eksport dizisi (Nuclear Export Sequence, NES) içeren bölgesine bağlanması Msn2p'nin nükleustan sitoplazmaya geçişini engeller (Pfanzagl vd., 2018) (Şekil 10). Msn2p-NES bölgesinin nükleer PKA tarafından fosforlanması Msn5p'nin Msn2p'ye bağlanmasını tetiklediği gibi stres süresince Msn2p'nin nükleusta kalmasını ve STRE dizilerine bağlanmasını sağlar (Jacquet vd., 2003; Durchschlag vd., 2004). Tpk proteinlerinin sitoplazmik ve nükleer bölgelerdeki dağılımının Msn2/4p ile birlikte düzenlendiğine ilişkin veri bulunmamakla beraber, Tpk1 ve Tpk3 proteinlerinin Msn2p'nin baskılanmasında Tpk2 proteininin ise Msn2p'nin kısmi aktivasyonunda görev alması her bir Tpk izoformunun NLS'ye karşı NES'i fosforile etmek için spesifik olduğunu göstermektedir (Sadeh vd., 2011).

PKA enzimi direk olarak Msn2 ve Msn4 proteinlerini fosforlayarak Msn2/4p aktivitesini kontrol ettiği gibi farklı proteinleri (kinazları, fosfatazları ve diğer düzenleyici proteinleri) fosforlayarak da Msn2/4p aktivitesini kontrol etmektedir. *RIM15* (Regulator of IME2) geni tarafından kodlanan Rim15p Ser/Thr kinaz olup Msn2/4p aktivitesini kontrol etmektedir. Rim15 aktivitesi PKA ve TOR sinyal yolları üzerinden kontrol edilmektedir (Wanke vd., 2008; Zhang vd., 2018).

2.5. TOR Sinyal Yolağı

PKA ve TOR (Target Of Rapamycin) sinyal yolları besin ve stres sinyallerine yanıt verilmesinde ve hücrel büyümenin kontrolünde görev alan yüksek oranda korunmuş iki sinyal yoludur. Mayada Tor1 ve Tor2 proteinlerinin biyokimyasal saflaştırılması sonucunda TORC1 ve TORC2 olmak üzere iki farklı TOR protein kompleksinin varlığı belirlenmiştir (Loewith vd., 2002). TORC1 kompleksinin yapısında *TOR1* geni tarafından kodlanan Tor1p veya *TOR2* tarafından kodlanan Tor2p bulunurken TORCII kompleksinin yapısında yalnızca Tor2p bulunur. Ayrıca TORC1 kompleksi *KOG1* (Kontroller Of Growth) tarafından kodlanan Kog1p, *TCO89* (Tor Complex One 89) tarafından kodlanan Tco89p ve *LST8* (Lethal with Sec Thirteen 8) tarafından kodlanan Lst8p içerir. Benzer şekilde TORCII

kompleksi Tor2 ve Lst8 proteinlerine ilave olarak *AVO1-3* (Adheres VOraciously (to TOR2) tarafından kodlanan Avo1p, Avo2p ve Avo3p içerir (Loewith vd., 2002, Reinke vd., 2004) (Şekil 11). Tor1 ve Tor2 proteinleri TORC komplekslerinin katalitik aktiviteye sahip alt birimlerini oluşturan ser/thr protein kinazlardır. TORCI kompleksi hücre büyümesi ile ilgili protein/lipid sentezi ve ribozom biyogenezi gibi anabolik prosesleri kontrol ettiği gibi protein degradasyonu ve otofaji gibi katabolik proseslerin kontrolünde de görev alır. TORCII kompleksi ise aktin hücre iskeletinin organizasyonunu, endositozu, sfingolipid biyosentezini ve stresle ilişkili transkripsiyonu kontrol eder. TORCI kompleksi Sch9p ve Tap42p fosforilasyonu yoluyla sinyal oluştururken TORCII kompleksi Ypk1/2p ve Slm1/2p fosforilasyonu ile sinyal oluşturur. Sch9p ve Ypk1/2p AGC (Protein kinase A, Protein kinase G ve Protein kinase C) kinaz ailesinin üyesi olan ser/thr protein kinazlardır. TORCI kompleksi rapamisin ile inhibe edilirken TORCII kompleksi rapamisine duyarsızdır. Bu nedenle TORCI kompleksinin yer aldığı sinyal sistemi TOR sinyal sistemi olarak kullanılır (Loewith vd., 2002; Zhang vd., 2018).



Şekil 11. *S. cerevisiae* maya hücrelerinde TORCI ve TORCII sinyal sistemi
Jacinto ve Lorberg, 2008'den modifiye edilmiştir.

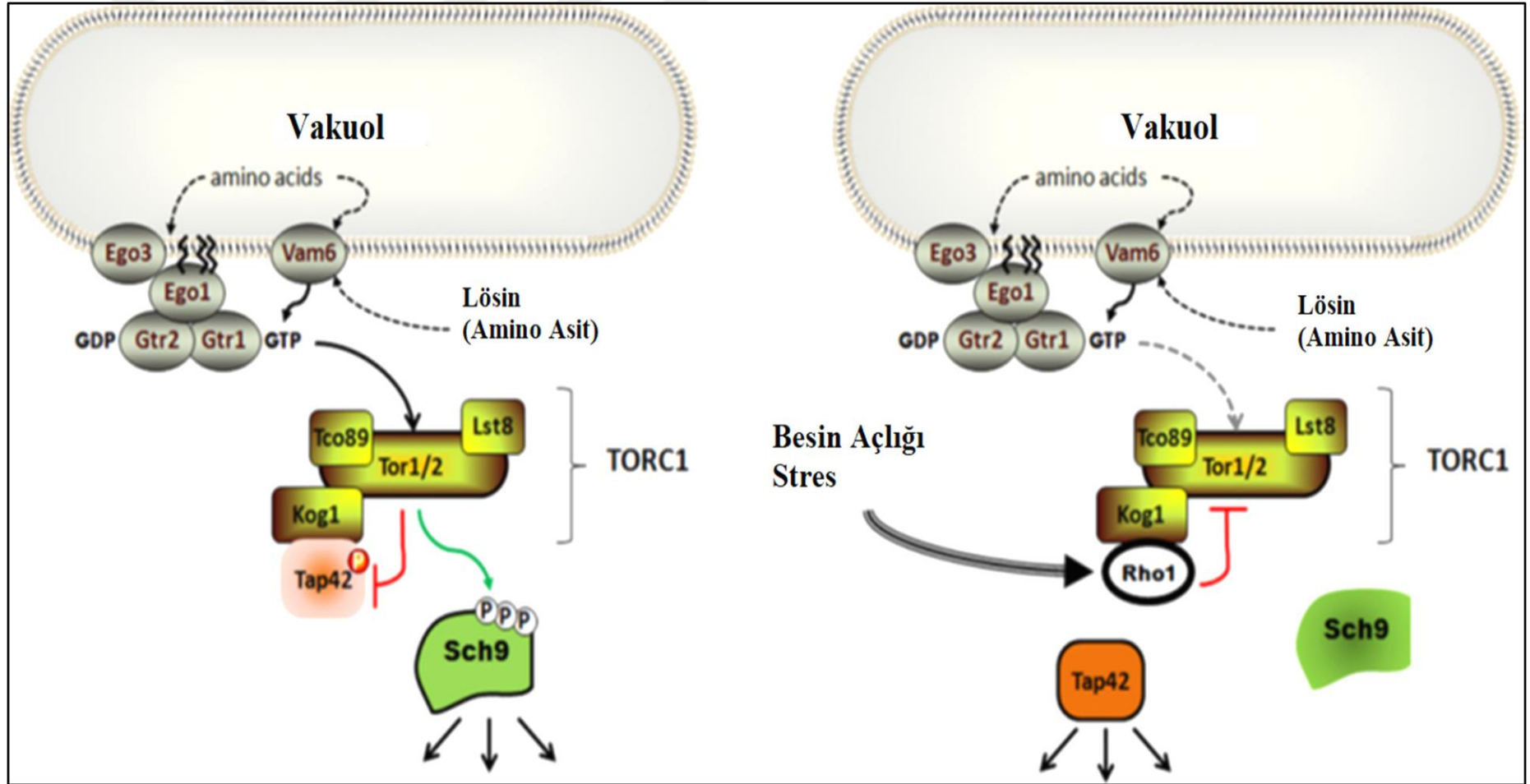
TOR yolu, yalnızca besin streslerine verilen yanıtta değil, aynı zamanda ısı şoku, DNA hasarı yanıtları ve ozmotik stres gibi farklı streslerde de yoğun bir şekilde yer alır. *S. cerevisiae* maya türleri zengin azot kaynağı olarak glutamin, asparajin, ticari Bactopeptone karışımları ve amonyum sülfat gibi azot içeren bileşikleri öncelikli tercih etmektedir. Prolin, ornitin, γ -aminobutirat, allantoin ve üre gibi azot kaynakları ise mayalar tarafından tercih edilmeyen zayıf azot kaynaklarıdır (Magasanik ve Kaiser, 2002). Kuvvetli azot kaynağında TOR iz yolu aktif iken rapamisin varlığında veya zayıf azot kaynağında bu sinyal yolu baskılanır.

Besin bolluğunda ve zararlı streslerin olmadığı koşullarda, TORC1 kompleksi aktiftir. Amino asit varlığı, Gtr1-GTP'ye bağlı bir aktivasyon mekanizması ile Ego1, Ego3, Gtr1 ve Gtr2 proteinlerinden oluşan EGO kompleksi aracılığıyla TORC1 kompleksine iletilir (Binda vd., 2009). Aktif TORC1 kompleksindeki katalitik aktiviteye sahip Tor1/2 proteinleri Sch9 ve Tap42 proteinlerini fosforlayarak Sch9 proteininin aktive olmasını Tap42 proteininin ise inaktif olmasını sağlar (Şekil 12) (Urban vd., 2007). Tap42 proteini, *S. cerevisiae* maya türünde Protein fosfataz 2A-benzeri fosfataz (PP2A-like Phosphatase) olan PP2A^{Sit4} fosfatazın düzenleyici alt ünitesi olup, PP2A^{Sit4} bağlandığında fosfatazı inaktif hale getirir (Luke vd., 1996). PP2A^{Sit4} katalitik aktiviteye sahip Sit4 proteininin Sap155, Sap185 veya Sap190 proteinlerinden birisi ile kompleks oluşturması ile oluşan bir enzim kompleksi olup PP2A^{Sit4} aktivitesi Tap42 ile kontrol edilir (Luke vd., 1996). Tor1/2 tarafından fosforlanan Tap42 proteini TORC1 kompleksinin Kog1 alt ünitesine bağlı kaldığından PP2A^{Sit4} aktivitesini düzenleyemez. Tor1/2 tarafından fosforlanarak aktive edilen Sch9 proteini Maf1, Dot6, Tod6 ve Stb3 gibi çeşitli transkripsiyonel represörleri fosforlayarak aktivitelerini baskılayarak ribozom biyogenezi için gerekli bileşenlerin maksimum ekspresyonuna neden olur (Lee vd., 2009; Huber vd., 2011). Sch9 proteini ayrıca ubiquitin-konjuge edici enzim (ubiquitin-conjugating enzyme) olan Cdc34 proteinini fosforile ederek hücre döngüsünün ilerlemesini uyarmaktadır (Cocklin ve Goebel, 2011). Ayrıca TORC1 aktivitesi çeşitli stres-cevap programlarını aynı anda bastırmaktadır. Aktif Sch9 proteini daha önce Thr¹⁰⁷⁵ amino asitinden fosforlanmış olan Rim15 kinazı (Rim15-P^{thr}) Ser¹⁰⁶¹ amino asitinden de fosforlayarak (Rim15-P^{ThrP^{Ser}}) nükleusa geçişini engeller. TORC1 aktivitesi ayrıca daha önce fosforlanan Rim15 kinazdan (Rim15-P^{thr}) fosfatın alınmasında görevli fosfatazı bloke ederek Rim15 kinazın aktivitesini kontrol etmektedir (Pedruzzi vd., 2003; Wanke vd., 2008). Rim15 kinazın Sch9 kinaz tarafından fosforlanması Bmh2 proteininin Rim15 kinaza bağlanmasını ve Rim15 kinazın sitoplazmada kalmasını sağlar. Daha önce nükleusa geçmiş olan Rim15 proteinlerinin inaktivasyonu ve nükleus dışına çıkartılması ise nükleer fosfata duyarlı Pho85 sikline bağımlı kinaz (nuclear phosphate-responsive Pho85 cyclin-dependent kinase) ve siklin ortağı Pho80p yardımıyla gerçekleşir. Pho85- Pho80p kompleksi Rim15 proteinini Thr¹⁰⁷⁵ amino asitinden fosforile eder ve Rim15 proteininin Msn5 reseptör protein yardımıyla nükleus dışına çıkarılmasını sağlar (Wanke vd., 2005). Sitoplazmik Rim15 kinaz nükleusta bulunan Msn2p ve Msn4p'yi aktive edemediğinden stres-cevap genlerinin transkripsiyonu gerçekleşmez (Şekil 13).

Rapamisin veya kafein varlığında, besin açlığında (örneğin azot açlığında), zararlı stres koşullarında TORCI kompleksi inaktiftir. GTPaz proteini olan Rho1 proteini Kog1 proteinine bağlanabilmek için Tap42p ile rekabet eder. Rho1 proteini Kog1 proteinine bağlandığında serbest kalan Tap42 proteini PP2A^{Sit4} fosfataza bağlanarak fosfatazın aktifleşmesini sağlar. Ayrıca Rho1 proteini Tor1/2 aktivitesini bastırıldığından Sch9 kinaz defosforile edilerek inaktif olur (Şekil 12). Protein fosfatazlar tarafından defosforile edilen Rim15 kinaz nükleusa geçerek Msn2/4 proteinlerini fosforlayarak aktifleştirir (Cameroni vd., 2004). Nükleer aktif Msn2/4 transkripsiyon faktörleri STRE içeren genlere bağlanarak transkripsiyon aktivasyonunu sağlar (Şekil 13) (Zhang vd., 2018; Dawes ve Perrone, 2020).

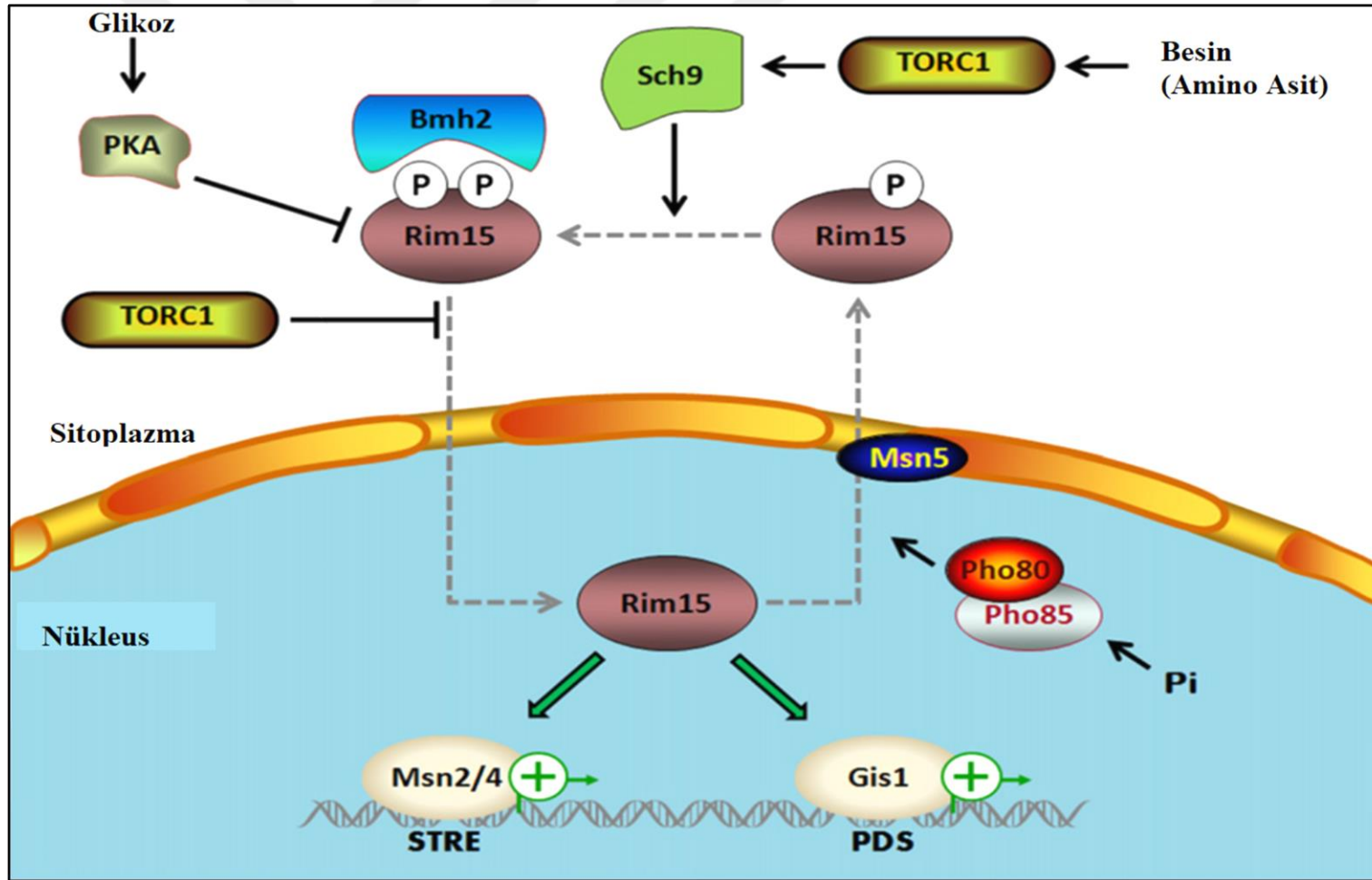
Rim15 kinaz hücre döngüsünün G1 fazında durması ve G0 fazına geçiş, trehaloz ve glikojen metabolizması, Gis1 ve Msn2/4 transkripsiyon faktörleri bağımlı transkripsiyonun kontrolü olmak üzere birçok farklı hücrel prosenin kontrolünde kilit olarak görev yapan bir enzimdir (Pedruzzi vd., 2000, 2003; Cameroni vd., 2004). Rim15 kinaz aktivitesi TOR yolağı da dahil olmak üzere şu ana kadar bilinen 4 farklı sinyal yolağı ile kontrol edilmektedir. PKA sinyal yolağı bu yollardan bir tanesi olup Rim15 kinazı Sch9 kinazın dışında başka beş bölgeden fosforlayarak (PKA phosphorylation sites) inaktifleştirir (Pedruzzi vd., 2003). PKA sinyal yolağı da Tor sinyal yolağında olduğu gibi Rim15 kinazın nükleer ve sitoplazmik lokalizasyonunu kontrol ederek Rim15p aktivitesini kontrol eder. TOR ve PKA sinyal yolları Msn2/4 aktivitesini Rim15-bağımlı kontrol ettiği gibi, Msn2/4 nükleer ve sitoplazmik lokalizasyonunu fosforilasyon-defosforilasyon mekanizmasıyla Rim15-bağımsız olarak da kontrol etmektedir.

TOR aktivitesinin azaltılması mayada yaşam süresini uzatmaktadır. Genel olarak hücrel translasyonu azaltmak, yaşam süresini uzatmanın korunan bir mekanizmasıdır. Translasyonun temel elemanlarından olan ribozomal proteinler ve bu proteinleri kodlayan genler TOR sinyal yolağının hedef proteinleri ve genleri arasındadır. TORC1 kompleksinin hedeflerinden birisi de protein sentezi ve hücre büyümesinin kontrolünde görevli olan ve GAAC sinyal yolağında yer alan Gcn2 protein kinazdır (Cherkasova ve Hinnebusch 2003; Staschke vd., 2010).



Şekil 12. *S. cerevisiae* maya hücrelerinde TORC1 aktivitesinin regülasyonu.

Swinnen vd., 2014'ten modifiye edilmiştir.



Şekil 13. Farklı besin-bağımlı kinazlardan gelen sinyallerin Rim15 kinaz aracılığıyla integrasyonu.

Swinen vd., 2014'ten modifiye edilmiştir.

2.6. GAAC Sinyal Yolağı

Ökaryotik hücrelerde korunmuş olan Genel Amino Asit Kontrol (GAAC, General Amino Acid Control) sinyal yolu amino asitlerin bulunabilirliğine göre translasyon başlamasını koordine ederek hücrelerin amino asit açlığına adapte olmasını sağlayan düzenleyici bir yoldur (Hinnebusch, 2005). Serbest amino asit seviyesinin düşmesiyle oluşan yüksüz tRNA (uncharged tRNA) birikimi GAAC sinyal yolu tarafından amino asit yokluğu olarak algılanır. Amino asit açlığı oluşan hücrelerde yüksüz tRNA molekülleri, *GCN2* (General Control Non-derepressible 2) geni tarafından kodlanan Gcn2 protein kinaza bağlanarak enzimi aktifleştirir (Narasimhan vd., 2004). Aktif Gcn2 protein kinaz, translasyonun başlaması için gerekli olan eIF2 (Eukaryotic Initiation Factor 2 α) faktörünün alfa alt ünitesini fosforlayarak inhibe eder ve mRNA translasyonunu baskılar. Ancak bu durum, Gcn4 transkripsiyon faktörüne ait mRNA'ların translasyonunun gerçekleşmesine neden olur (Hinnebusch 2005). *GCN4* geni tarafından kodlanan Gcn4 proteini amino asit transportunda ve amino asit metabolizmasında görevli proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu aktive ederek hücrelerin amino asit açlığına adaptasyonunu sağlar (Natarajan vd., 2001; Hinnebusch, 2005; Staschke vd., 2010).

Ökaryotik başlatma faktörü 2 (eIF2) α , β ve γ olmak üzere üç alt üniteden oluşur. eIF2 proteininin β alt ünitesinde GDP/GTP bağlanması gerçekleşir. eIF2 proteinine GTP'nin bağlanması ile eIF2 β -GTP ikili kompleks ve bu komplekse metionil başlatıcı tRNA ($\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$) bağlanarak üçlü kompleks (TC, Ternary complex) (eIF2 β +GTP+ $\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$) oluşur. Üçlü kompleks (TC) 40S ribozomal protein ile birleşerek 43S-ön başlatma kompleksini (pre-initiation complex) oluşturur. 43S-ön başlatma kompleksi AUG başlatma kodonunu bulmak için mRNA'nın 5' ucundan başlayarak tarama yapar. AUG kodonu bulunduğunda 48S kompleks oluşumu için eIF5 tarafından GTP GDP'ye hidroliz edilir. Translasyon 48S kompleksin 60S ribozomal alt üniteyi getirmesiyle başlar. Bu arada bir sonraki translasyon için eIF2 β -GDP guanin-nükleotid değişim faktörü (eIF2B) tarafından eIF2 β -GTP ikili kompleksine çevrilir. Hücredeki eIF2 β -GTP ve IF2 β -GDP miktarları GAAC sinyal yolağının uyarılması için önemlidir. eIF2 β -GTP miktarındaki

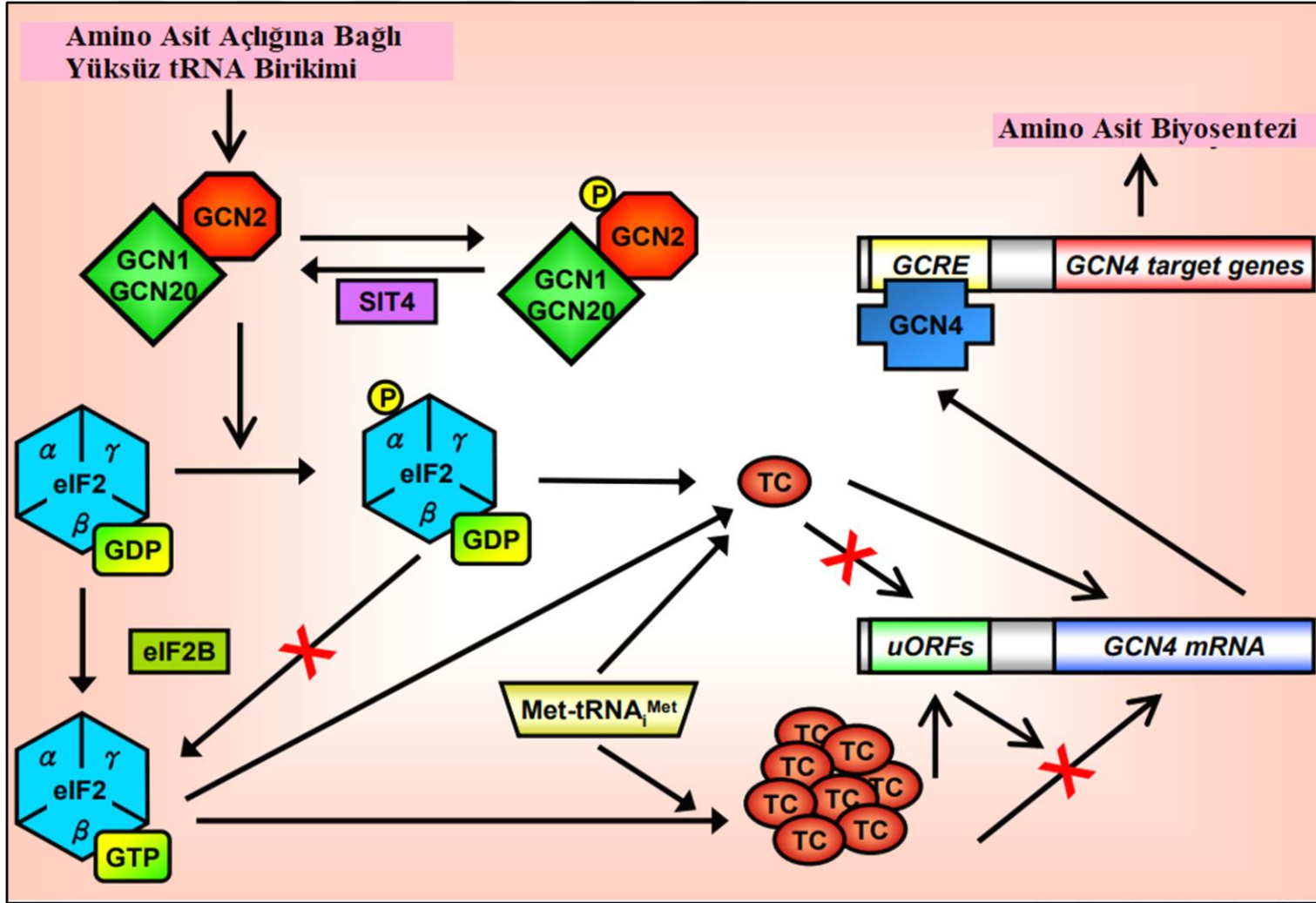
azalma GAAC sisteminin aktivasyonuna ve bu yolağın ana düzenleyicisi olan *GCN4* gen ekspresyonunun artmasına neden olur (Staschke vd., 2010; Zhang vd., 2018).

GCN1 (General Control Nonderepressible 1) geni tarafından kodlanan Gcn1p ile *GCN20* (General Control Nonderepressible 20) geni tarafından kodlanan Gcn20p bir araya gelerek Gcn1/Gcn20 kompleksini oluşturur. Gcn2 proteininin Gcn1/Gcn20 kompleksi ile etkileşimi yüksüz tRNA moleküllerinin Gcn2 proteinine bağlanmasını kolaylaştırır. Amino asit açlığından dolayı biriken yüksüz tRNA molekülleri Gcn2 proteininin histidil-tRNA sentetaz (HisRS) ile ilgili yapısına (histidyl-tRNA synthetase (HisRS) related domain) bağlanarak Gcn2 proteinindeki yanyana yerleşik kinaz alanını (juxtaposed kinase domain) aktive eder. Aktif Gcn2 protein kinaz IF2 proteinini α altbiriminden fosforladığında eIF2 β alt biriminde GDP'nin GTP'ye dönüşümünü yavaşlar ve TC oluşumu için gerekli olan eIF2 β -GTP miktarı azalır (Şekil 14) (Li ve Lam, 2008). Bu durum protein translasyonunun global inhibisyonuna ve transkriptomun yeniden programlanmasına yol açar. İlginç olarak eIF2 proteininin Gcn2p tarafından fosforlanarak inaktivasyonu sonucu eIF2 β -GTP miktarının azalması, kısa uORF (upstream open reading frames) içeren özel 5'UTR yapısına sahip *GCN4*-mRNA'ların translasyonlarını tetikler (Şekil 14) (Hinnebusch 2005; Altmann ve Linder, 2010).

Maya hücrelerinde Gcn4 transkripsiyon faktörü için kodlu mRNA moleküllerinin 5'UTR bölgesinde dört adet uORF bulunmaktadır. Besin açlığının bulunmadığı normal üreme koşullarında TC kompleks (eIF2 β +GTP+Met-tRNA_i^{Met}) miktarı yüksek olduğundan, ribozomlar *GCN4*-mRNA molekülünün 5'UTR kısmında bulunan ilk uORF'a (uORF1) bağlanır (Şekil 15) (Altmann ve Linder, 2010; Shen vd., 2019). Bir sonraki TC kompleksin uORF1'e bağlanabilmesi için uORF1'in translasyonunu hızlıca gerçekleştirerek diğer uORF'ların (uORF2 ve uORF3) translasyonunu yaparak uORF4'ün translasyonunu başlatır. Bu sırada ribozom bu dört uORF'un translasyonu için uğraştığından ve fazla zaman harcadığından *GCN4*-ORF'un translasyonuna başlayamadan 40S ve 60S alt üniteler birbirinden ayrılarak mRNA'dan kopar (Şekil 16a). Böylece normal üreme koşullarında *GCN4*-mRNA translasyonu gerçekleşmez (Hinnebusch 2005; Shen vd., 2019). Stres koşullarında veya amino asit açlığında ise Gcn2 protein kinaz tarafından IF2 α fosforilasyonu

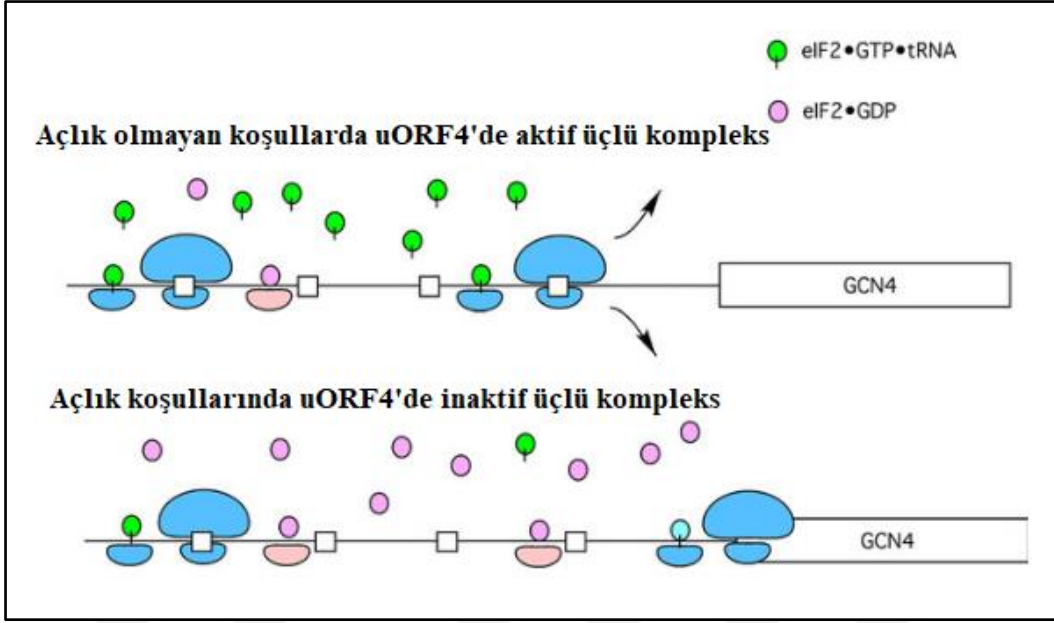
ile TC kompleks ($eIF2\beta+GTP+Met-tRNA_i^{Met}$) miktarı azalmaya $eIF2\beta+GDP$ miktarı artmaya başlar (Şekil 15). TC kompleks miktarı düşük olduğundan, var olan TC kompleksler uORF'ların translasyonunu bypass yapar ve ilk TC kompleks *GCN4*-ORF'un AUG start kodonu ile eşleşerek translasyona başlar. Böylece stres koşullarında *GCN4*-mRNA translasyonu artar (Şekil 16b).

TOR ve GAAC sinyal yolları besin açlığında koordineli bir şekilde Gcn4 proteinin aktivitesini Gcn2p üzerinden kontrol etmektedir (Şekil 17). Zayıf azot kaynağında veya amino asit açlığında TORCI kompleks inaktif olduğundan Tap43/sit4 fosfataz aktif hale geçer ve Gcn2 proteinini defosforile (S577) ederek aktif hale geçirir. Paralel olarak amino asit açlığı ile oluşan yüksüz tRNA'lar Gcn2 proteinine bağlanarak aktifleştirir. Aktif Gcn2 kinaz $eIF2\alpha$ fosforile ederek translasyon seviyesini düşürken *GCN4*-mRNA translasyonunu artırır. Sentezlenen Gcn4 proteinleri nükleusa geçerek ilgili genlerin transkripsiyonunu artırır (Şekil 17) (González ve Hall, 2017; Mohler vd., 2017).

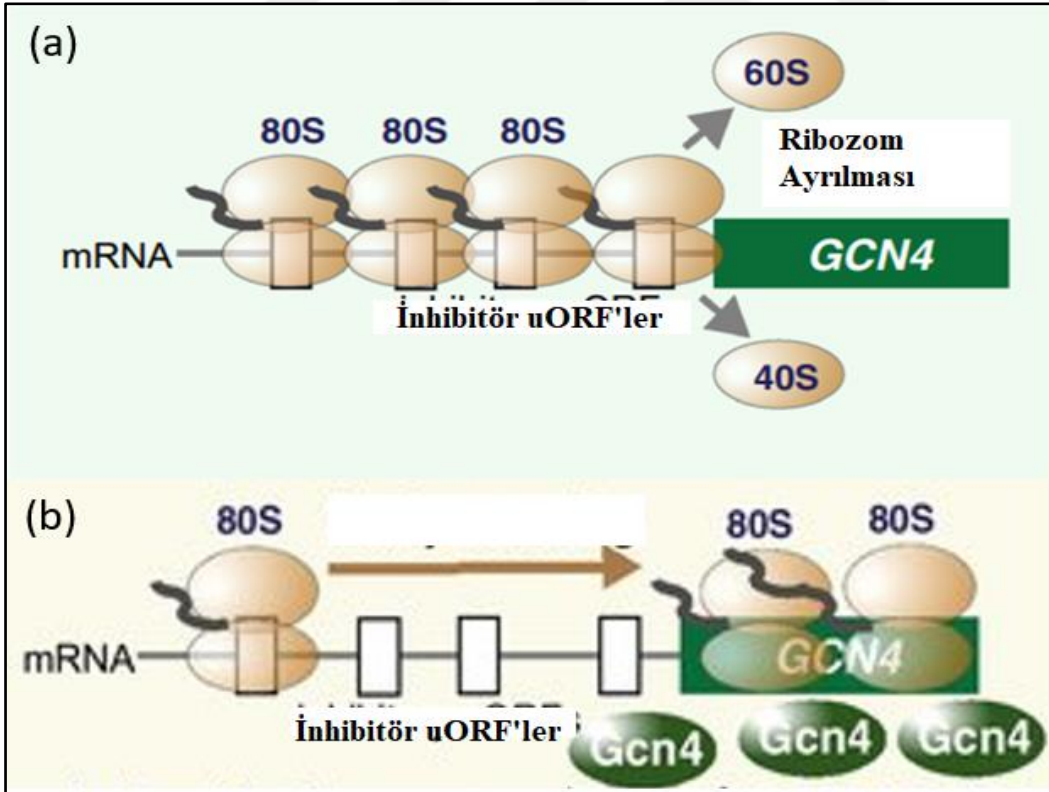


Şekil 14. Maya hücrelerinde genel amino asit kontrol (GAAC) yolağının modeli.

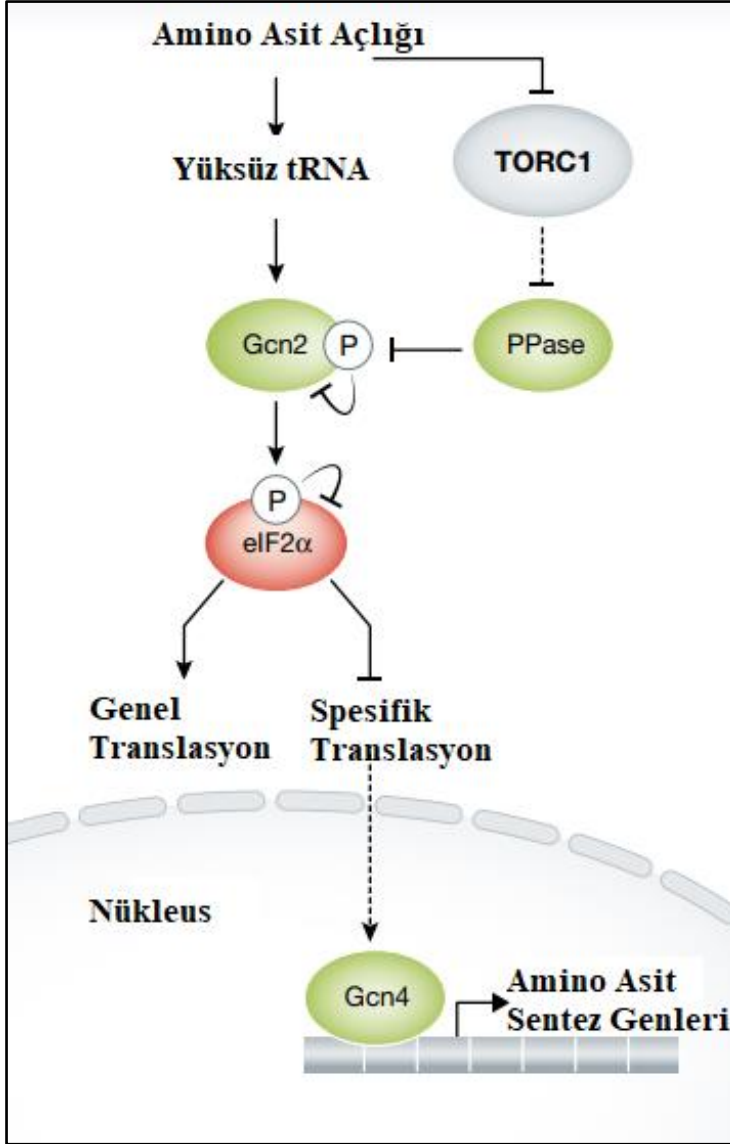
Li ve Lam, 2008'den modifiye edilmiştir.



Şekil 15. *GCN4* mRNA'nın yapısı ve translasyon için taraması.
Altmann ve Linder, 2010'dan modifiye edilmiştir.



Şekil 16. *GCN4*-mRNA translasyonu (a) Normal üreme koşullarında (b) Stres koşullarında.
Shen vd., 2019'dan modifiye edilmiştir.



Şekil 17. TORC1 ve GAAC sinyal yolları arasındaki regülasyon. *González ve Hall, 2017*'den modifiye edilmiştir.

Besin açlığı koşullarında Gcn4 transkripsiyon faktörü bağlanma dizilerinin işgal ettiği 546 genomik bölge belirlenmiştir. Gcn4 bağlanma dizilerinin %30'unu temsil eden bu bölgelerin %40'ı ise promotorda bulunmaktadır (Staschke vd., 2010; Rawal vd., 2018; Zhang vd., 2018). Gcn4 proteininin ilgili genlerdeki bağlanma bölgesi 5'-RRTGACT-3' dizisi ve ardından kısa bir timidin dizisi içermektedir (Arndt ve Fink, 1986). Gcn4 proteini DNA üzerindeki bu dizilere bağlanarak transkripsiyonu düzenlemektedir. Zayıf Gcn4 bağlanma dizisi içeren bölgelerde ise DNA'nın nükleozomlardan arındırılması ile transkripsiyonun seviyesi artmaktadır (Rawal vd., 2018). Bu nedenle Gcn4p-bağımlı

transkripsiyonların aktivasyonunda nükleozom mobilizasyonu yapabilecek SAGA kompleksi gibi komplekslerin önemli rolü bulunmaktadır.

Bilgisayar tabanlı biyoinformatik araştırmalar ile Gcn4 bağlanma bölgesinin, amino asit biyosentezi ile doğrudan bağlantılı olmayan çok sayıda genin promotorunda da bulunduğu belirlenmiştir (Natarajan vd., 2001). Azot açlığında *NTH1* ve *TPS1* genlerinin ekspresyonunun arttığı, histidin açlığının bu genlerin ekspresyonunu yaban tip maya hücrelerinde yaklaşık 3 kat *Δgcn4* mutant maya hücrelerinde ise 1,5 kat artırdığı belirlenmiştir (Natarajan vd., 2001). Ayrıca *NTH1* ve *TPS1* promotorunda Gcn4 bağlanma dizilerinin bulunması bu genlerin Gcn4-bağımlı regülasyona uğradıklarını göstermektedir (Eleutherio vd., 2014). SAGA kompleksinin katalitik alt ünitesi olan Gcn5 proteininin Gcn4p-bağımlı transkripsiyon için gerekli olduğu daha önce gösterilmiştir (Georgakopoulos ve Thireos, 1992). Bu nedenle çalışmamızda azot açlığı ile oluşturulan stres koşullarında, HAT aktivitesine sahip Gcn5 proteininin *NTH1* ve *TPS1* genlerinin ekspresyonuna etkisi belirlendi. Ayrıca Gcn5 proteininin yokluğunda maya hücrelerinin biriktirdiği trehaloz ve glikojen seviyeleri enzimatik olarak belirlendi.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Maya Suşlarının Özellikleri ve İkilenme Sürelerinin Belirlenmesi

Araştırmada kullanılacak *S. cerevisiae* maya suşları, BY4741 yaban tip maya suşu (MATa; *ura3Δ0*; *leu2Δ0*; *his3Δ1*; *met15Δ0*) ve Y07285 mutant maya suşudur (MATa; *ura3Δ0*; *leu2Δ0*; *his3Δ1*; *met15Δ0*; YGR252w::kanMX4). *S. cerevisiae* maya suşları EUROSCARF (European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis) maya koleksiyonundan satın alınmıştır. Genomu tamamen sekanslanan, haploid ve standart maya suşu olarak kullanılan BY4741 suşu gen mutasyonu içermemektedir. BY4741 ile izogenik olan Y07285 maya suşu *GCN5* gen mutasyonu taşımaktadır.

Yaban tip (BY4741) ve *Δgcn5* mutant (Y07285) *S. cerevisiae* maya suşlarının ikilenme süreleri ve spesifik üreme oranları YNBD-HLMU (%0,16 Yeast Nitrogen Base + %0,5 Amonyum sülfat + %2 Dekstroz + %0,2 Histidin + %0,3 Lösin + %0,2 Metiyonin + %0,2 Urasil) üreme ortamında belirlendi. Maya suşları sıvı YNBD-HLMU üreme ortamında 30 °C sıcaklıkta ve 120 rpm çalkalama ile 15 gün inkübe edildi. İnkübasyonun ilk 48 saatinde 2 saatte bir sonraki günlerde ise 6 saate bir kültürlerden örnekler alınarak spektrofotometrede OD₆₀₀ değerleri belirlendi. Elde edilen ölçüm değerleri kullanılarak maya suşlarına ait üreme eğrileri (Growth curve) zamana karşı OD₆₀₀ değerinde bulunan hücre sayısı olarak oluşturuldu. Yaban tip ve *Δgcn5* maya suşlarının üreme eğrileri üzerinden ikilenme süreleri (Doubling Time, Dt) ve spesifik üreme oranları (Specific Growth Rate, μ) hesaplandı.

3.2. Plazmitlerin Çoğaltılması ve Maya Suşlarına Transformasyonu

Çalışmada *NTH1*-, *TPS1*- ve *SUC2*-LacZ gen füzyonunu barındıran plazmitler kullanıldı. *NTH1*- ve *TPS1*-LacZ gen füzyonu içeren plazmitler Profesör Jean Marie François'den (Institut National Des Sciences Appliquées, Toulouse, Fransa) temin edildi. *SUC2*-LacZ gen füzyonunu plazmit stres koşullarından etkilenmediği için kontrol plazmiti

olarak kullanıldı (Türkel vd., 2003). *TPS1-LacZ* gen füzyonunu içeren plazmit *TPS1* geninin 1000 bç uzunluğundaki promotor bölgesini ve *NTH1-LacZ* gen füzyonunu içeren plazmit *NTH1* geninin 770 bç uzunluğundaki promotor bölgesini içerir ve bu bölgelerin genlerin ekspresyonu için gerekli olan tüm kontrol dizilerini içerdiği bilinmektedir (Parrou vd., 1997).

Plazmitlerin çoğaltılmasında *Escherichia coli* MACH3 bakteri hücreleri kullanıldı. *NTH1*-, *TPS1*- ve *SUC2-LacZ* gen füzyonunu içeren plazmitlerin bakteri hücrelerine aktarımı $MgCl_2$ - $CaCl_2$ yöntemiyle gerçekleştirildi (Ausubel vd., 1993). Transformant bakteri hücrelerinin seleksiyonu için Ampisilin (%33 mg/ml) içeren TYE^{amp} (%2,4 Trypton Yeast Extract Agar) besi yeri kullanıldı. Üreme gösteren bakteri kolonileri ampisilin içeren NB (%2,5 Nutrient Broth) üreme ortamında çoğaltıldıktan sonra plazmid saflaştırma kiti (GeneJet Plasmid Kit #K0502) kullanılarak saflaştırıldı ve -20 °C’de saklandı.

NTH1-, *TPS1*- ve *SUC2-LacZ* gen füzyonunu içeren plazmitlerin BY4741 ve *Δgcn5* *S. cerevisiae* maya suşlarına transformasyonu lityum asetat polietilen glikol (LiOAc + PEG) metodu ile Herring Sperm DNA (5 µl HS-DNA) taşıyıcı DNA kullanılarak yapıldı (Rose vd., 1990). Transformant maya suşları urasil içermeyen YNBD-HLM üreme ortamına ekimi yapılarak seleksiyonu gerçekleştirildi. Üreme gösteren maya kolonileri seçilerek taze YNBD-HLM katı besiyerine aktarıldı ve maya hücrelerinin beta-galaktozidaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi için +4 °C’de muhafaza edildi.

3.3. Maya Hücrelerinin Üreme Koşulları

Transformant maya hücreleri urasil içermeyen YNBD-HLM sıvı üreme ortamında O/N kültürü oluşturularak 120 rpm sabit çalkalama ile 30 °C’de inkübasyona bırakıldı. Maya hücreleri gecelik hücre kültürlerinden OD₆₀₀ değeri yaklaşık 0,3 olacak şekilde YNBD-HLM sıvı taze kültürlerle aktarıldı. Tekrar aynı koşullarda logaritmik aşamaya kadar (OD₆₀₀ değeri 0,7 olana kadar) üretildi. Bu aşamada beta-galaktozidaz enzim aktivitesini belirlemek için (5 ml) ve depo karbonhidrat (trehaloz ve glikojen) miktarını belirlemek için (20 ml)

hücre kültürlerinden örnekler alındı. Kalan hücre kültürleri 3 kısma ayrılarak birinci kısım (untreated) aynı koşullarda 4 saat inkübe edildi. İkinci ve üçüncü kısımdaki hücreler soğuk steril distile su ile yıkandıktan sonra ikinci kısımdaki hücreler amonyum sülfat yerine % 0,1 prolin eklenen YND-HLMP sıvı kültürüne üçüncü gruptaki hücreler ise % 0,5 amonyum sülfat içeren YNBD-HLM sıvı kültürüne aktarılarak sabit çalkalama ve sıcaklıkta 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücre kültürlerinden beta-galaktozidaz enzim aktivitesini ve depo karbonhidrat miktarını belirlemek için örnekler alındı. Deneyler her maya suşu için en az üç tekrar olacak şekilde ve üçlü setler olarak yapıldı.

3.4. Promotor Aktivitesinin Belirlenmesi

Transformant maya hücrelerinin *NTH1*, *TPS1* ve *SUC2* promotor aktiviteleri toplanan hücre kültürlerinde β -galaktozidaz enzim aktivitesi belirlenerek ölçüldü. Farklı üreme koşullarında çoğaltılan hücre kültürlerinden alınan örnekler (5 ml) çökütürülerek soğuk steril distile su ile yıkandıktan sonra hücre pelleti üzerine 200 μ l Breaking Buffer (100 mM Tris (pH 8,0) + % 20 Gliserol + 4 mM PMSF + 1 mM DTT) eklenerek karıştırıldı ve üzerine 20 μ l Kloroform ve 20 μ l % 0,1 SDS eklenerek hücre lizatı oluşturuldu. Daha sonra 970 μ l Z-Buffer (40 mM NaH_2PO_4 + 60 mM NaHPO_4 + 1 mM MgSO_4 + 10 mM KCl) içeren cam tüplere hücre lizatından 30 μ l ilave edilerek 30 °C'deki ısıtıcı blokta 2 dakika bekletildi. Daha sonra cam tüplere 200 μ l ONPG (% 0,4 Orto Nitro Phenyl Galactoside) ilave edilerek reaksiyonun başlama zamanı kaydedildi. Tüpteki ren sarı renk almaya başladığı anda 500 μ l 1 M Na_2CO_3 çözeltisi ilave edilerek reaksiyon durduruldu ve zaman kaydedildi. Reaksiyon sonucu oluşan sarı rengin yoğunluğu spektrofotometrede OD_{420} değerinde belirlendi. Hücre lizatı içerisindeki toplam protein miktarını Lowry yöntemiyle belirlendi (Lowry vd., 1951). Öncelikle 180 μ l dH_2O içeren cam tüplere 20 μ l hücre lizatı ilave edildi. Daha sonra üzerine 1 ml C-Buffer (9,8ml A-Buffer (% 2 Na_2CO_3 + % 0,4 NaOH) + 100 μ l % 1,56 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 100 μ l (% 2 $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Karışım üzerine 100 μ l Folin Ciocalteu's Phenol Reagent eklenerek vortekslendikten sonra tekrar oda sıcaklığında 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda reaksiyon sonucu oluşan mavi rengin yoğunluğu spektrofotometrede OD_{750} değerinde belirlendi. Elde

edilen sonuçlara göre β -galaktozidaz aktivitesi dakikada 1 mg proteinde hidroliz edilen nmol ONPG (nmol ONPG/dk/mg protein) olarak hesaplandı. (Ausubel vd., 1993).

3.5. Depo Karbonhidrat Miktarının Belirlenmesi

S. cerevisiae maya hücrelerinde biriktirilen trehaloz ve glikojen miktarı daha önce kullanılan enzimatik yöntemle belirlendi (Parrou ve François, 1997). Farklı koşullarda çoğaltılan hücre kültürlerinden alınan örnekler (20 ml) çökütürülerek soğuk steril distile su ile yıkandıktan sonra hücre pelleti hassas terazide tartılarak hücrelerin yaş ağırlığı belirlendi. Hücre pelleti üzerine 250 μ l 0,25 M Na_2CO_3 ilave edilerek 100°C'de 2 saat kaynatılarak protein inaktivasyonu yapıldı. Daha sonra hücreleri içeren tüplere 150 μ l 1 M Asetik asit ve 600 μ l 0,2 M NaOAc ilave edilerek karıştırıldıktan sonra karışım eşit miktarda olacak şekilde iki ayrı tüpe geçirildi. Maya hücrelerinin biriktirdiği trehaloz miktarını belirlemek için birinci tüpteki karışım üzerine 3mU trehalaz enzimi (Sigma, 8778) eklendi ve 37 °C'de 18 saat inkübe edildi. Maya hücrelerinin biriktirdiği glikojen miktarını belirlemek için ikinci tüpteki karışım üzerine 100 mg α -amiloglikozidaz enzimi (Sigma, A-7420) eklendi ve 57 °C'de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda trehalaz ve α -amiloglikozidaz aktivitesi sonucu açığa çıkan glikoz miktarı GOD (Glikoz Oksidaz Peroksidaz) metoduyla Glucose (Glu) Colorimetric Assay Kiti (GOD-POD Method) kullanılarak belirlendi. GOD enzimi içeren cam tüplere maksimum 200 μ l'ye kadar olacak şekilde örnek ilave edilerek 37 °C'de 15 dk inkübe edildi. Oluşan kırmızı-pembe rengin yoğunluğu spektrofotometrede OD₅₄₆ değerinde belirlendi. Hücrelerin içerdiği trehaloz ve glikojen miktarı ölçülen glikoz miktarının maya yaş ağırlığı üzerinden normalize edilmesiyle hesaplandı ve miligram hücrede biriktirilen mikrogram glikoz (μ g glikoz/mg yaş ağırlığı) olarak belirlendi.

3.6. Veri Analizi

Deneyle her maya suşu için en az üç tekrarlı olmak üzere üçlü setler olarak yapıldı. Veri analizi için Graph Pad Prism 9 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, ABD) programında

two-tailed student's t-test parametresi kullanılarak ortalama \pm standart sapması (SS) hesaplandı ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.7. Biyoinformatik Çalışmalar

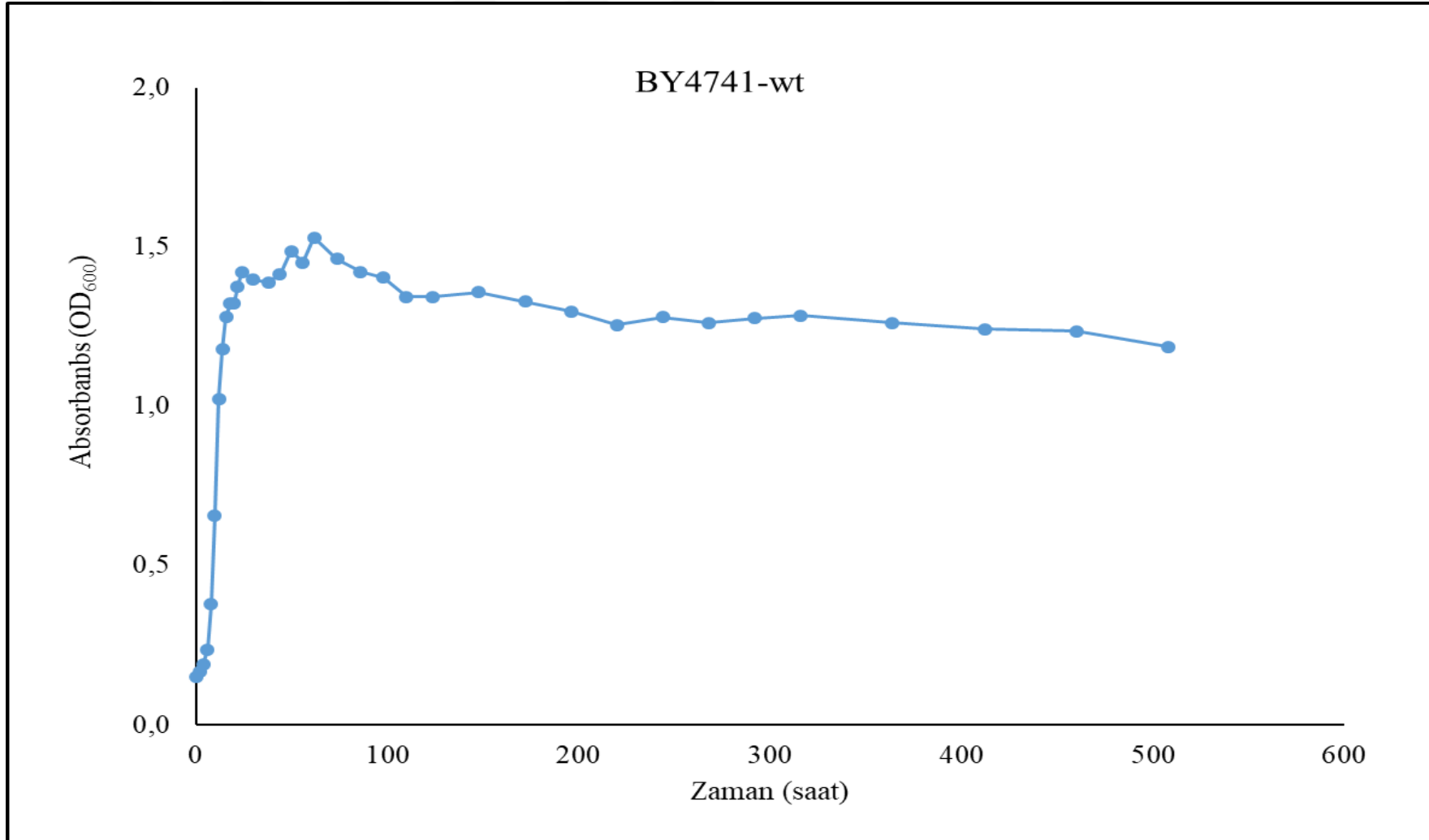
Saccharomyces Genom Veritabanı (SGD), *S. cerevisiae* için kapsamlı bilgilerin yanı sıra bu verileri araştırmak için arama ve analiz araçları içerir. Ayrıca daha yüksek organizmalarda dizi ve gen ürünleri arasındaki fonksiyonel ilişkilerin keşfedilmesini sağlar. Bu veritabanı kullanılarak *NTH1* ve *TPS1* genlerinin lokalize olduğu kromozomlar belirlendi. YEASTRACT (Yeast Search for Transcriptional Regulators And Consensus Tracking) veritabanı özel olarak tasarlanmış ve maya hakkında bilgilere erişilebilen bir platformdur. Mayadaki transkripsiyon faktörlerinin ve hedef genlerin etkileşimlerinin ücretsiz olarak ulaşılabileceği bir ağ olarak hizmet verir. Bu veritabanı kullanılarak Gcn4p transkripsiyon faktörünün bağlanma dizileri incelendi. EPDNew veri tabanı literatüre göre yayınlanan ökaryotik promotorların bir koleksiyonu olarak hizmet verir ve deneysel olarak doğrulanmış bu promotorların veri tabanlarına erişim sağlar. EPDNew veritabanı kullanılarak *NTH1* ve *TPS1* genlerinin promotor dizileri elde edildi. JASPAR CORE veritabanı kullanılarak Gcn4 transkripsiyon faktörünün olası DNA bağlanma bölgesi bulundu. Bu veritabanı ökaryotlar için deneysel olarak tasarlanmış transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerinin yayınlandığı bir platformdur. EPDNew veritabanından alınan *NTH1* ve *TPS1* promotör dizileri kullanılarak nükleozom enerji diagramı ve nükleozomların promotor üzerinde olası yerleri ve nükleozom modelleri oluşturuldu. Interactive Chromatin Modeling Web Veri tabanı (ICM), DNA dizilerinin varsayılan kromatin şablonlarına katlamayı sağlayan bir araçtır. Araştırmacıların nükleozom stabiliteelerini hızla değerlendirmesine ve nükleozom enerji seviyesi diyagramı elde etmesini sağlar. SCPD (The Promoter Database of *Saccharomyces cerevisiae*) veritabanı kullanılarak elde edilen bağlanma dizilerinin *NTH1* ve *TPS1* genlerinin promotorunda yer alıp almadığı analiz edildi.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

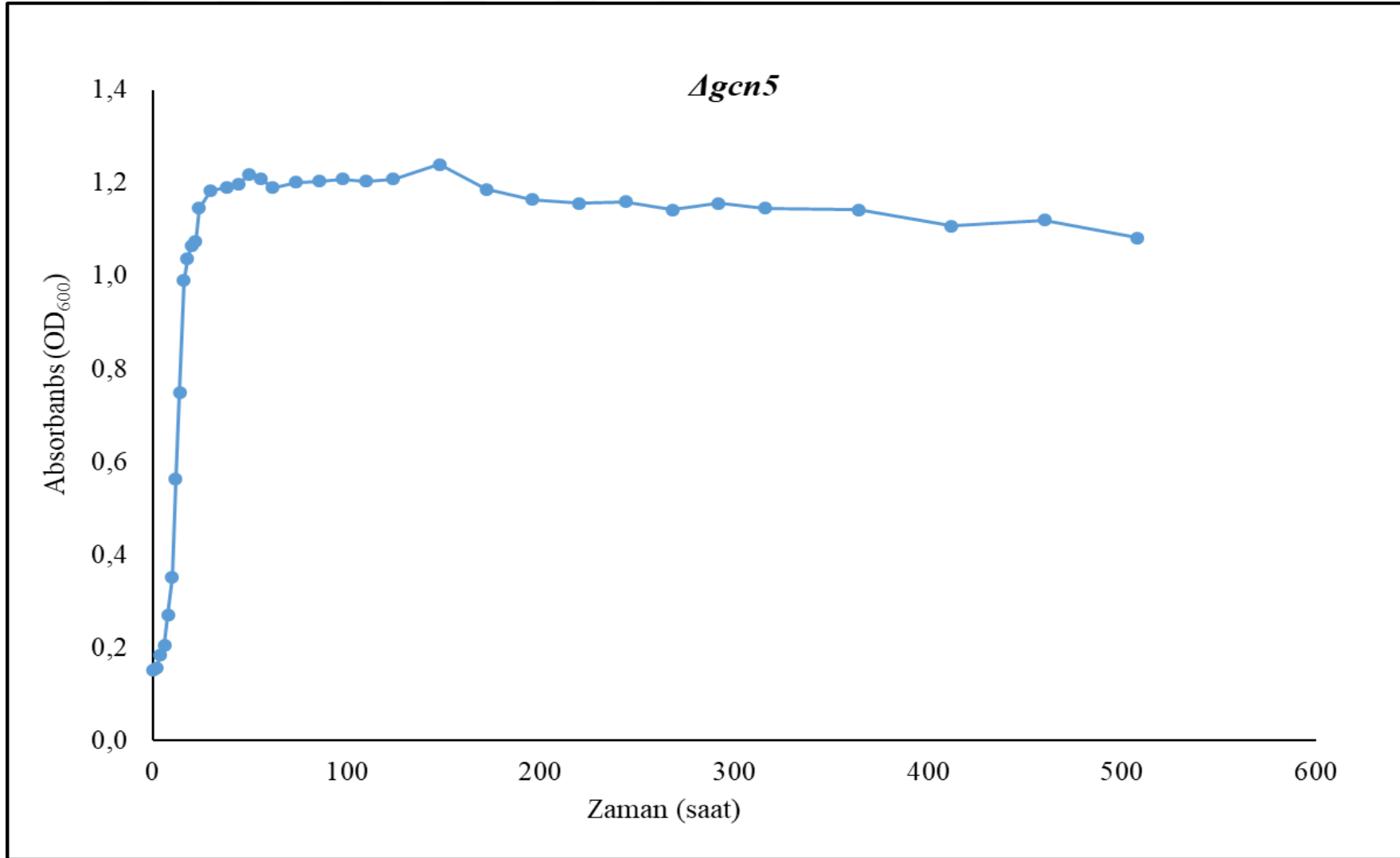
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Maya Suşlarının İkilenme Süreleri

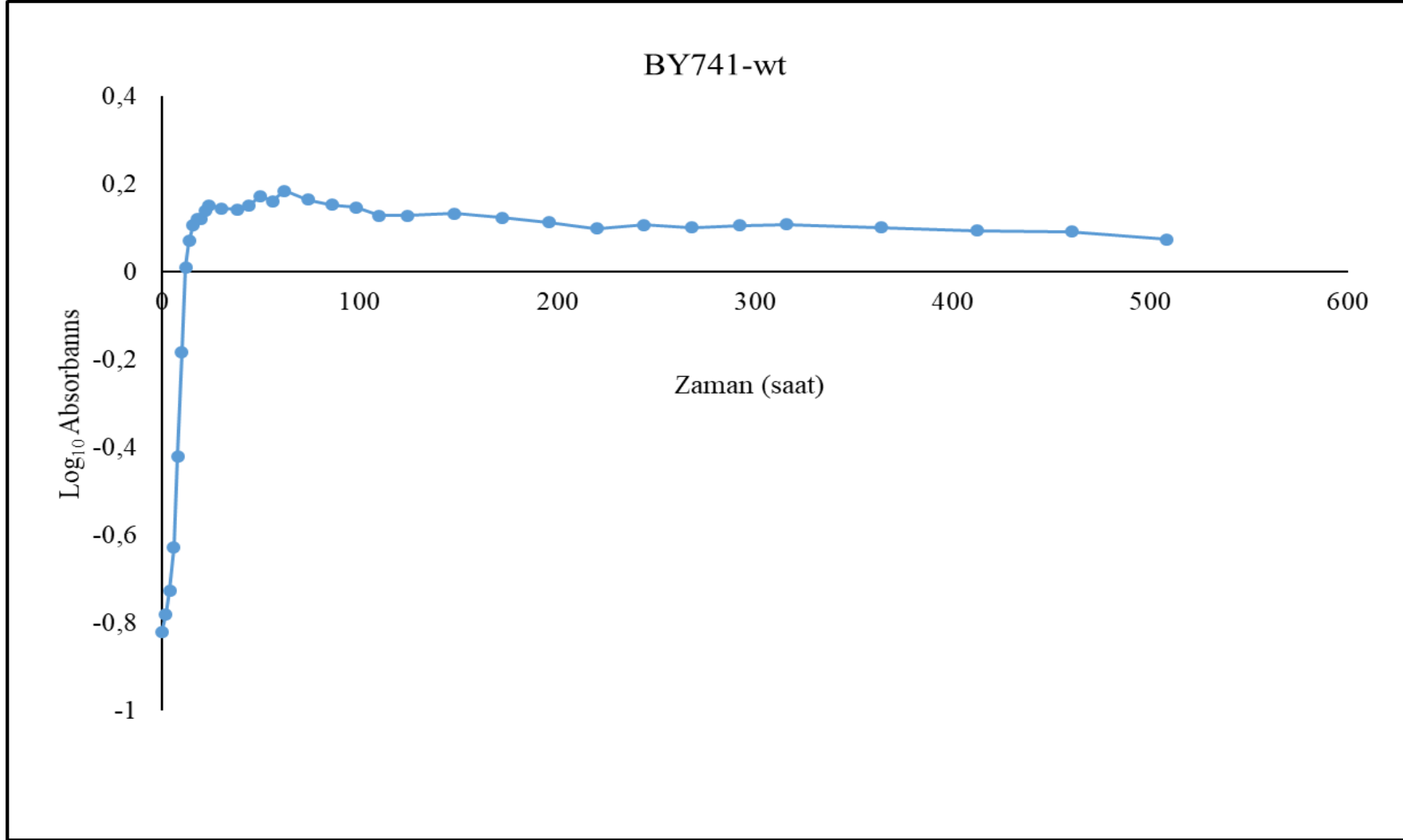
Araştırmada kullanılan yaban tip (wt) ve mutant (*Δgcn5*) maya suşlarının ikilenme süresini (doubling time/dt) ve spesifik üreme oranını (specific growth rate/ μ) hesaplayabilmek için maya suşları minimal besi ortamında (YNBD-HLMU) 30°C’de 120 rpm/dk çalkalama ile üretildi. Bu süre boyunca maya kültürlerinden ilk 2 gün boyunca 2 saatte bir daha sonraki günlerde ise 6 saatte bir örnek alınarak OD₆₀₀ absorbans değerleri belirlendi. Elde edilen ölçümler kullanılarak zamana karşı absorbans (OD₆₀₀) değerlerini içeren üreme grafiği çizildi ve yaban tip maya hücreleri için Şekil 18’de mutant maya hücreleri için Şekil 19’da verildi. Yaban tip ve mutant maya suşlarının absorbans değerine karşılık gelen Log₁₀ değerleri hesaplandı ve tekrar zamana karşı Log₁₀ değerlerini içeren grafiği çizildi. Yaban tip maya suşunun logaritmik üreme grafiği Şekil 20’de, *Δgcn5* maya suşunun logaritmik üreme grafiği ise Şekil 21’de verildi. Maya suşlarının logaritmik üreme grafiğinde logaritmik olarak çoğalma gösteren veri aralığındaki absorbans değerlerine karşılık gelen hücre sayısı standart üreme grafiği kullanılarak hesaplandı ve zamana karşı Ln hücre sayısının grafiği çizildi. Logaritmik aşamadaki Ln hücre sayısını gösteren grafik yaban tip maya suşu için Şekil 22’de ve *Δgcn5* maya suşu için Şekil 23’de verildi. Ln hücre sayısını gösteren grafik kullanılarak maya suşlarının ikilenme süreleri ve spesifik üreme oranları hesaplandı. İkilenme süresi hücre miktarının iki katına ulaşması için geçen süreyi (t) ve spesifik büyüme oranı (μ) ise birim zaman içinde hücre miktarının toplam hücre miktarına göre artışını tanımlamaktadır. Yaban tip maya hücrelerinin ikilenme süresi 1,6476±0,24 (1 saat 41 dakika±14 dakika) ve spesifik üreme oranı 0,4207 olarak belirlendi. *Δgcn5* maya hücrelerinin ikilenme süresi 2,02971±0,35 (2 saat 2 dakika±21 dakika) ve spesifik üreme oranı 0,3415 olarak hesaplandı. Yaban tip maya hücrelerinin hücre döngüsünü yaklaşık olarak 1,5-2 saatte ve mutant maya hücrelerinin bir hücre döngüsünü yaklaşık 2-2,5 saatte tamamladığı tespit edildi. Bu nedenle çalışmamızda azot açlığı uygulaması her iki maya suşunun en az bir hücre döngüsünü tamamlayabilmesini sağlaması açısından 4 saat olarak uygulandı.



Şekil 18. Yaban tip (BY4741) maya suşunun zamana karşı absorbans (OD₆₀₀) değerlerini içeren üreme grafiği.



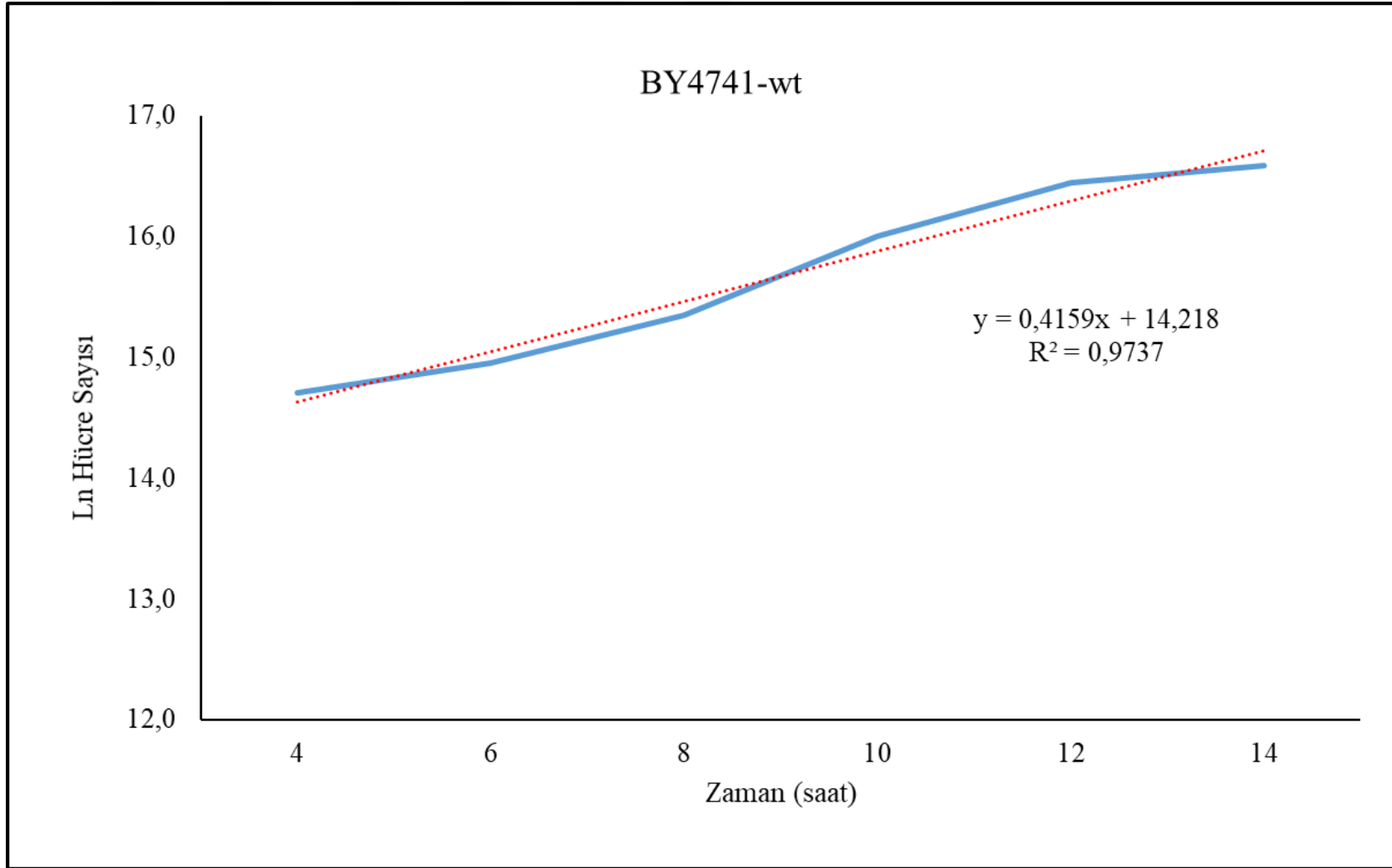
Şekil 19. Mutant (*Δgcn5*) maya suşunun zamana karşı absorbans (OD₆₀₀) değerlerini içeren üreme grafiği.



Şekil 20. Yaban tip (BY4741) maya suşunun logaritmik üreme grafiği üreme grafiği.



Şekil 21. Mutant ($\Delta gcn5$) maya suşunun logaritmik üreme grafiği.



Şekil 22. Yaban tip (BY4741) maya suşundaki ikilenme süresi ve spesifik üreme oranı.



Şekil 23. Mutant (*Δgcn5*) maya suşundaki ikilenme süresi ve spesifik üreme oranı.

4.2. *NTH1* ve *TPS1* Promotor Analizi

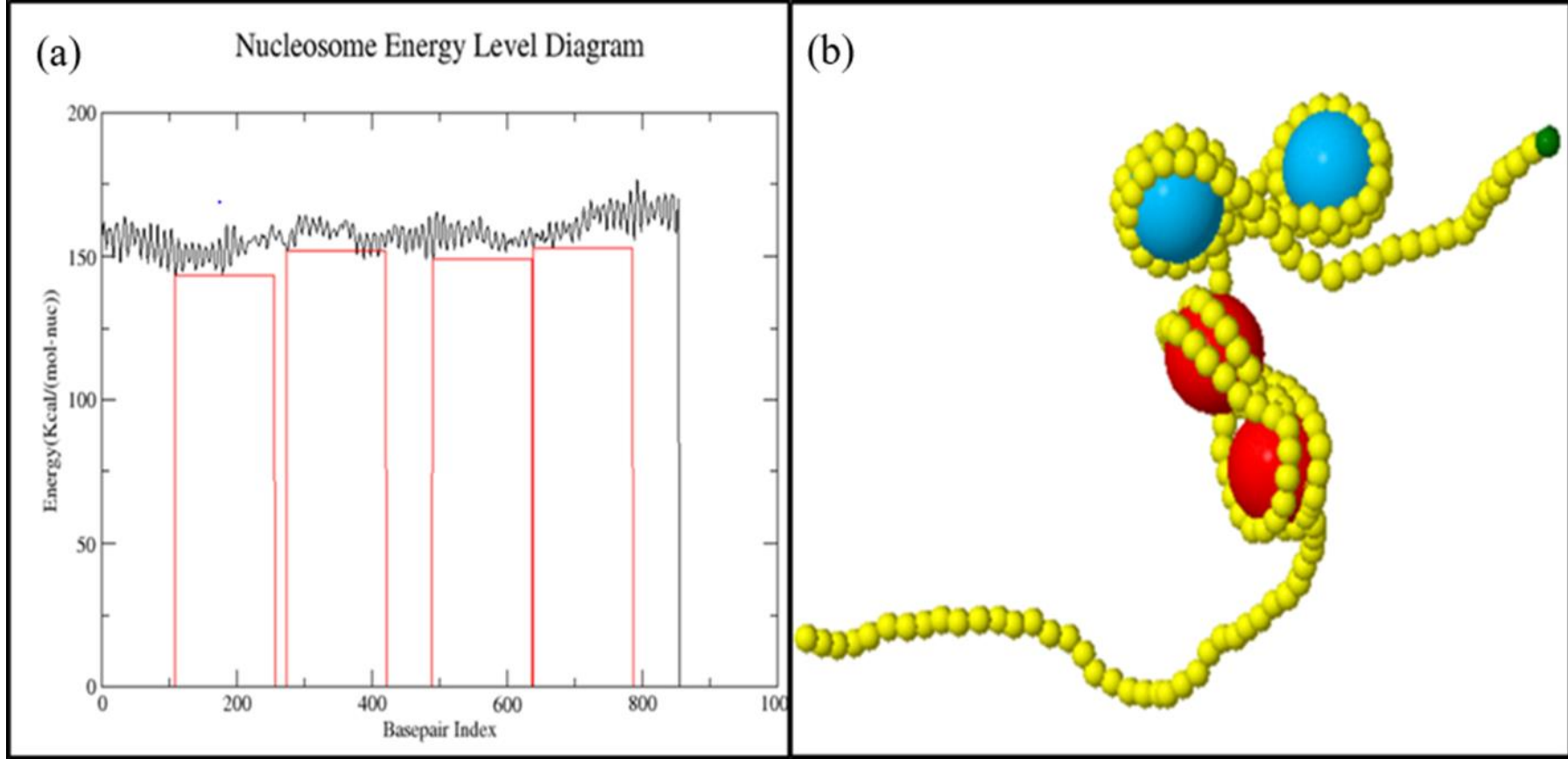
Çalışmamızda *TPS1* ve *NTH1* promotorundaki olası nükleozomların pozisyonları ve Gcn4-bağlanma elementlerinin yerleri biyoinformatik yöntemler kullanılarak belirlendi. Bu amaçla *TPS1* ve *NTH1* promotoruna ait DNA bölgesi (1000 bç) SGD veri tabanından alındı.

Theoretical Molecular Biology Lab web sayfasında ücretsiz olarak kullanıma sunulan Interactive Chromatin Modeling (ICM) programı (<https://dna.engr.latech.edu/icm-du/index.php>) kullanılarak *TPS1* ve *NTH1* promotor bölgelerine ait nükleozom enerji diagramları oluşturuldu ve olası nükleozomların pozisyonları belirlendi. *TPS1* promotor bölgesinin nükleozom enerji diagramı ve kromatin modeli Şekil 24'te verildi. *NTH1* promotor bölgesinin nükleozom enerji diagramı ve kromatin modeli Şekil 25'de verildi. ICM programındaki FootPrints tool kullanılarak *TPS1* promotorunda 109-255 bç arasında, 274-420 bç arasında, 490-636 bç arasında ve 639-785 bç arasında lokalize olan 4 nükleozom bölgesi bulundu. *NTH1* promotorunda da 143-289 bç arasında, 318-464 bç arasında, 617-763 bç arasında ve 827-973 bç arasında lokalize olan 4 nükleozom bölgesi bulundu.

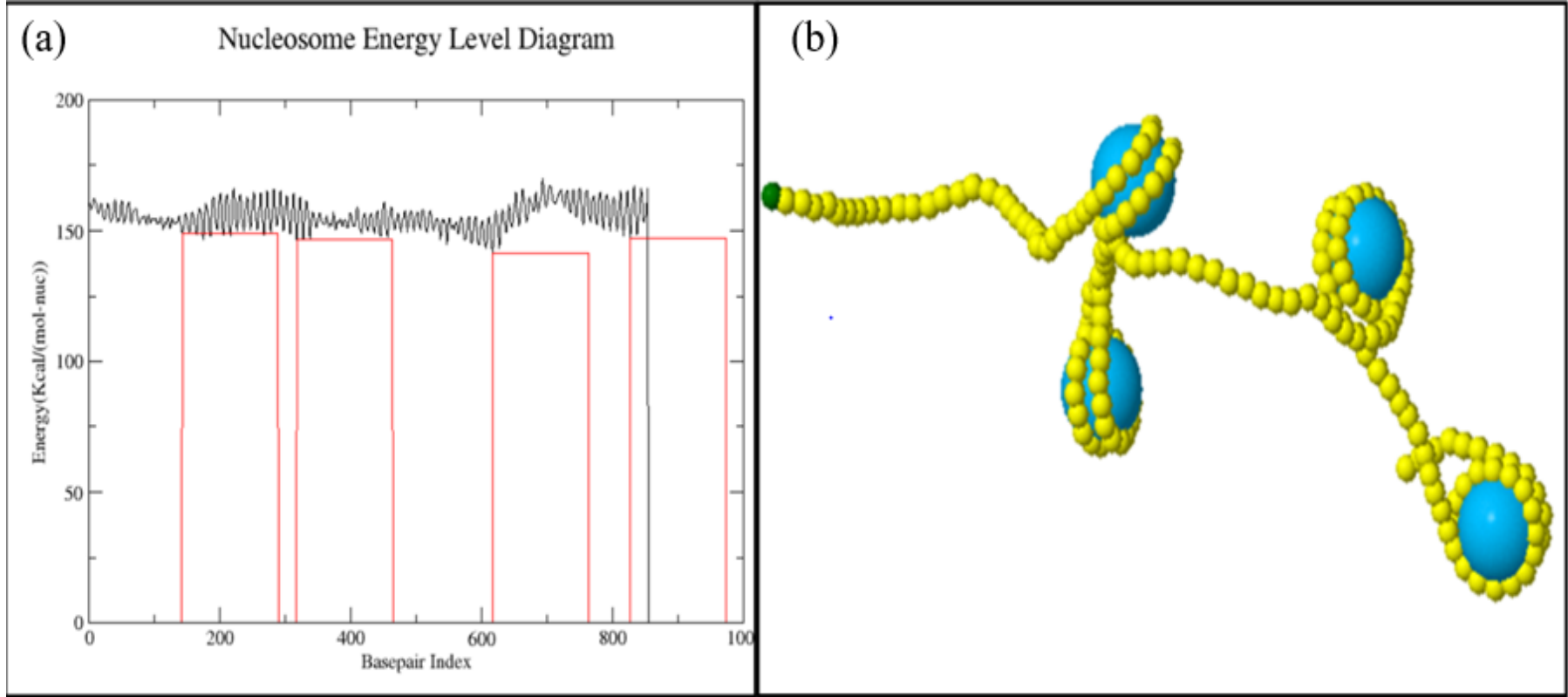
Daha önce gerçekleştirilen bir çalışmada *TPS1* ve *NTH1* promotorunun 700 bç promotor bölgesi kullanılarak yapılan *in silico* analizde *TPS1* promotorunda 3 tane ve *NTH1* promotorunda 1 tane Gcn4-bağlanma elementleri belirlenmiştir (Eleutherio vd., 2014). JASPAR CORE, YEASTRACT, SCPD (The Promoter Database of *Saccharomyces cerevisiae*), EPDNew (Eukaryotic Promoter Database), SnapGene ve diğer veri tabanlarındaki algoritmalar kullanılarak transkripsiyon faktörlerinin motifleri ve promotor üzerinde korunmuş bağlanma dizilerinin yerleri belirlenebilir. Çalışmamızda da bu veri tabanları kullanılarak *S. cerevisiae* maya hücreleri için Gcn4p transkripsiyon faktörünün korunmuş bağlanma dizisi (A/G)TGA(G/C)TCA(T/C) olarak ve Msn2/4 transkripsiyon faktörünün korunmuş bağlanma dizisi (A/G)GGGG olarak belirlendi. Yine bu veri tabanlarındaki algoritmalar ile *TPS1* ve *NTH1* promotor (1000 bç) bölgeleri kullanılarak yapılan *in silico* analizde Gcn4p ve Msn2/4p bağlanma elementlerinin yerleri belirlendi. *TPS1* promotor bölgesinde 3 tane (Şekil 24) ve *NTH1* promotor bölgesinde 1 tane (Şekil 25) Gcn4 transkripsiyon faktörünün bağlanma dizisi belirlendi. *TPS1* promotor bölgesinde

bulunan Gcn4-bağlanma elementlerinden iki tanesinin ve *NTH1* promotor bölgesinde bulunan Gcn4-bağlanma elementinin (+1) nükleozom tarafından kapatıldığı belirlendi. *TPS1* promotor bölgesinde 6 tane (Şekil 26) ve *NTH1* promotor bölgesinde 3 tane (Şekil 27) Msn2/4p bağlanma elementi tespit edildi. *TPS1* promotor bölgesinde Msn2/4p bağlanma elementlerinin nükleozomlar tarafından kapatılmadığı ve açıkta kaldığı gözlenirken *NTH1* promotor bölgesinde bulunan Msn2/4p bağlanma elementlerinin (+1 ve +2) nükleozomlar tarafından kapatıldığı gözlemlendi. Ayrıca her iki promotor bölgesinde de TATA kutusunun (+1) nükleozom tarafından kapatıldığı belirlendi.





Şekil 24. *TP51* promotorunun nükleozom enerji diagramı (a) ve kromatin modeli (b). Mavi renkli yapılar nükleozomları, kırmızı renkli yapılar yakın temas gösteren nükleozomları, sarı renkli yapılar 5 nükleotid içeren DNA dizisini ve yeşil renkli yapı transkripsiyon başlama noktasındaki 5 nükleotidi göstermektedir.



Şekil 25. *NTH1* promotorunun nükleozom enerji diagramı (a) ve kromatin modeli (b). Mavi renkli yapılar nükleozomları, sarı renkli yapılar 5 nükleotid içeren DNA dizisini ve yeşil renkli yapı transkripsiyon başlama noktasındaki 5 nükleotidi göstermektedir.

CCCAAAGATT CTTGATGAAT TTTACGATAG AGCCAGAGAC GATGCCGACG AAGATGAAGA	60
AGATCCCGAC ACAAGAAGCT CCGGTAAGAA GAAGGACGCC AGCCAAGAAG AATCTCTAAT	120
CTAAGAGGAC GGTTGCTGAA GAAAAAGGCT TTTTTTATTT TGTCCGTTTT TTTTTTGTA	180
AACCCAAAGA TCTGAATCTA AAGCTTTTTT AAACGTATAT AGATGTCTAC ATGTGTGTTT	240
TTGTTTTTTTT ACGTACGTAT ACCCACCTAT ATATGCATAA TCCGTAATTG AAAAAAAAAA	300
AAGAAAAAGA TCAAGGAACA CATCACCTG GGCACATCAA GCGTGAGGAA TGCCGTCCAA	360
CTGGTGGAGA CGCTTGATT GCTCTTTTTG TTCTGGGTCC AACCCGGTCT CGAAGAACAT	420
CAGCACCACG CCCGCAACGA CAAAGAACAT TGCAATACAC TTGCATATGT GAGCATAGTC	480
GAGCGGTCCG TTCTGTGGTT GATGCTGTTG TTCTTCTTC TGTTTGTCAG GGGTGATAGC	540
CATACTTCG TGCTCTTGTT GCGATTGTTT TGTTCCATCT GCACCAGAAC AAAGAACAAA	600
AGAACAAGGA ACAAAGTCCA AGCACGTCAG CGCTGTTTAT AAGGGGATTG ACGAGGGATC	660
GGCCCTAGAG TGCCAGCGCG CCAGGGAGAG GGAGC CCCCT GGGCCCTCAT CCGCAGGCTG	720
ATAGGGGTCA CCCCGCTGGG CAGGTCAGGG CAGGGGCTCT CAGGGGGGCG CCATGGACAA	780
ACTGCACTGA GGTTC TAAGA CACATGTATT ATTGTGAGTA TGTATATATA GAGAGAGATT	840
AAGGCGTACA GCCGGGTGGT AGAGAT TGAT TAACTTGGTA GTCTTATCTT GTC AATTGAG	900
TTTCTGTCAG TTTCTTCTTG AACAAGCACG CAGCTAAGTA AGCAACAAAG CAGGCTAACA	960
AACTAGGTAC TCACATACAG ACTTATTAAG ACATAGA AACT	1000

Şekil 26. *TPS1* promotor analizi. Altı çizilen nükleotidler nükleozom içeren bölgeleri, yeşil renkli işaretlenen bölgeler Gcn4p bağlanma elementini, sarı renkli işaretlenen bölgeler Msn2/4p bağlanma elementini, mavi renkli nükleotidler TATA kutusunu ve altı çizili kırmızı renk nükleotid transkripsiyon başlama bölgesini göstermektedir.

TATTCTGGAG CAATGATGTG GTTAGCACAA ATCTTTAAGG TCTTGTCTCT TCTCATCAAT	60
ATTCTAACCT <u>TGTTAGTCTT</u> TTTGTTCTTC AAGAACTTAC AGTCACCAGT ACCTCTTTCT	120
<u>TTCCATTCTT</u> TGGCATCGGC ATCGAATCTG AAAAGCTTGG CTCTGACCTT GTAAAGAACT	180
<u>TCTTCGTCTT</u> CTTCCATTGT CTTAACATCT ACCTTTTCCA GGTGAACCAC TGGTTCAAAA	240
TGGATATCTG <u>GTGATTCTGG</u> AGCATCATCA CCTTCCTTCT TGGTTTCCTC CTTGGTATCT	300
<u>TCTTCGTCTT</u> TCTTGGTTTC TGGCTTTTCG GCCTTCTTAC CACCAAACAT GGAGAAGACA	360
GCAGAGGATG GTGGCCTTGG AGCAGCCTCT TCCTTCTTGT CGACGACAGG TTTCTTATCT	420
TCGCTAGACA TTCTTTTTTCT ATAGTTGTGT TTATCTTCTT GCTTTTATTT CAAATTA AAC	480
AAGATCTTTC TTCTTTCTCC AATTGAATAT CAATTCATC ATCAGATTTT AGTTTCTGTT	540
TTATTTTTTA TTTTTTTATT TTTTTTTTGT TTCTTGTTTT CCGCGTACTT CCCGCTGGGC	600
GAAAAAAGAA ATGAAAAAAA GAAACGACAG GAGCATCGTG TAGGACGAAG CCCCTTATCC	660
CCT AGTTACC GAAGAAGGCC ACCAATCTTA AGTTTGATAG AGCAGTACTT ATATAAGGCT	720
ATATATAGAC TGGTTCACAA GGTTATCAAT ATGAAACTTG CGCGATCACC GATTTACGGG	780
ATTTTTTCAGG AGCGAGGTAC AAGATTTGTT GGCCTGAAAA GATCGCAAAA CATTAGCTAG	840
AAATTTTC CC CCT ATCGTTT TCCGTAGAGT AAATATAATA TCAAGAAGAT AGTTTTATAT	900
TGACTGA TTT CACAACCAAC TGCATAGATA T A AGGAGATT ACTAGATACA AGAACGCCTG	960
ATAAACAAAA AAAGAAAAAT TAACAAAAAA AATCAGTAGA	1000

Şekil 27. *NTH1* promotor analizi. Altı çizilen nükleotidler nükleozom içeren bölgeleri, yeşil renkli işaretlenen bölge Gcn4p bağlanma elementini, sarı renkli işaretlenen bölgeler Msn2/4p bağlanma elementini, mavi renkli nükleotidler TATA kutusunu ve altı çizili kırmızı renk nükleotid transkripsiyon başlama bölgesini göstermektedir.

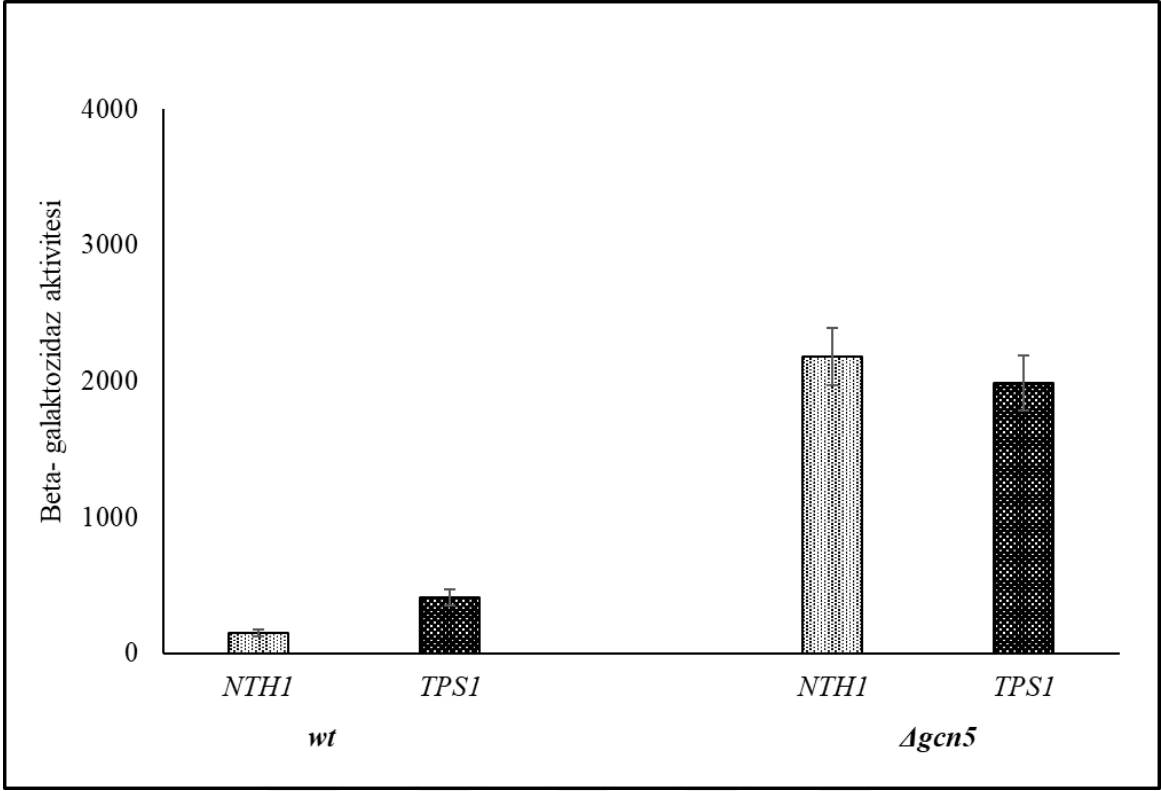
4.3. Gcn5 Proteininin *NTH1* ve *TPS1* Gen Ekspresyonlarına Etkisi

Histon asetilaz aktivitesine sahip Gcn5 proteininin trehalozun sentezinde görevli *TPS1* geninin ve yıkımında görevli *NTH1* geninin ekspresyonlarına etkisi logaritmik aşamada ve normal üreme koşullarında belirlendi. *TPS1* ve *NTH1* promotor bölgelerini barındıran plazmitlerin yaban tip ve mutant (*Δgcn5*) maya suşlarına transformasyonu yapılarak promotor aktivasyon seviyesi beta-galaktozidaz enzim aktivitesi ile ölçüldü.

Yaban tip ve mutant maya hücrelerinin *NTH1* ve *TPS1* promotor aktivasyonları Şekil 28'de verildi. Logaritmik olarak çoğalmakta olan yaban tip maya hücrelerinin stres içermeyen normal üreme koşullarında belirlenen beta-galaktozidaz enzim aktivitesi *NTH1*-LacZ füzyonu için $151,2 \pm 25,4$ ünite ve *TPS1*-LacZ gen füzyonu için $412,5 \pm 59,7$ ünite olarak ölçüldü. Aynı koşullarda mutant maya hücrelerinde beta-galaktozidaz enzim aktivitesi *NTH1*-lacZ füzyonu için $2180,8 \pm 212,3$ ünite ve *TPS1*-lacZ gen füzyonu için $1987,5 \pm 201,7$ ünite olarak hesaplandı. Normal üreme koşullarında yaban tip maya hücrelerinde *TPS1* promotor aktivasyonunun *NTH1* promotor aktivasyonundan yaklaşık 3 kat fazla ($p < 0,05$) olduğu gözlenirken mutant maya hücrelerinde *NTH1* ve *TPS1* promotor aktivasyonları arasında anlamlı bir fark ($p > 0,05$) olmadığı gözlemlendi. Ancak, Gcn5 proteininin yokluğunda *NTH1* promotor aktivasyonunun yaklaşık 14 kat ($p < 0,05$) ve *TPS1* promotor aktivasyonunun yaklaşık 5 kat ($p < 0,05$) arttığı tespit edildi.

Glikoz baskılaması birçok genin ekspresyonunu etkileyen düzenleyici bir sistemdir. Ortamda glikoz yerine diğer karbon kaynakları bulunduğunda *SUC2* gen ekspresyonu aktive olmaktadır (Neugeborn ve Carlson, 1984). Maya hücrelerinin çoğalmasında azot kaynağının çeşidi ve miktarı *SUC2* geninin ekspresyonunu etkilememektedir. Bu nedenle çalışmada *SUC2*-LacZ gen füzyonunu içeren plazmit kontrol amaçlı kullanıldı. Stres içermeyen normal üreme koşullarında *SUC2*-LacZ gen füzyonunu içeren yaban tip maya ve mutant maya hücrelerinde beta-galaktozidaz aktivitesi $5,7 \pm 0,37$ ünite ve mutant maya hücrelerinde beta-galaktozidaz aktivitesi $20,94 \pm 0,8$ ünite olarak ölçüldü.

Maya hücrelerinde *TPSI* ve *NTH1* genlerinin ekspresyonu stres koşullarında arttığından bu genler strese direncin belirteci olarak bilinir (Eleutherio vd., 2014). Çalışmamızda Gcn5 proteininin yokluğunda stres içermeyen üreme koşullarında *TPSI* ve *NTH1* genlerinin ekspresyonunun artması, Gcn5 proteininin *NTH1* ve *TPSI* genlerinin negatif düzenleyicisi olduğunu göstermektedir. Daha önce yapılan genom-tabanlı gen ekspresyon analizinde, Gcn5 proteininin yokluğunda 83 gene ait transkriptin ekspresyonunun 2 kat ve üzerinde arttığı ve 185 transkriptin ise 2 kat ve üzerinde azaldığı gözlenmiş, Gcn5 proteininin gen ekspresyonunda pozitif veya negatif düzenleyici olarak görev aldığı rapor edilmiştir (Holstege vd., 1998). *HSP12* geni ısı şoku gibi farklı çevresel stres koşullarında Msn2/4 ve Hsf1p transkripsiyon faktörleri aracılığıyla, kromatinin tekrar-organize edilmesiyle indüklenen bir gen dir (Erkina ve Erkine 2006; Erkina vd., 2008, 2010; Sadeh vd., 2011). Stres içermeyen normal üreme koşullarında, Gcn5 proteininin yokluğunun *HSP12* transkripsiyon miktarının artmasına sebep olduğu, yaban tip ve Δ gcn5 maya hücrelerinde aynı seviyede asetilasyon olmasından dolayı asetilasyon seviyesine etki etmediği tespit edilmiştir (Antonazzi vd., 2021). Arginin sentezinde görevli arginosuccinate synthetase enzimini kodlayan *ARG1* geninin transkripsiyonunun Gcn5p yokluğunda aktive olduğu, Gcn5p-HAT aktivitesinin *ARG1* geninin baskılanması için gerekli olduğu gösterilmiştir (Ricci vd., 2002). Çalışmamızda stres içermeyen koşullarda Gcn5p yokluğunda *TPSI* ve *NTH1* transkripsiyonunun arttığı belirlenmiştir. Ancak bu aktivasyonun nedeninin Gcn5p-HAT aktivitesinin yokluğundan dolayı mı (*ARG1* geninde olduğu gibi) ya da kromatin tekrar-modelleyici komplekslerin Gcn5-bağımlı olarak promotora getirilememesinden (*HSP12* geninde olduğu gibi) dolayı mı gerçekleştiği belirlenememiştir.



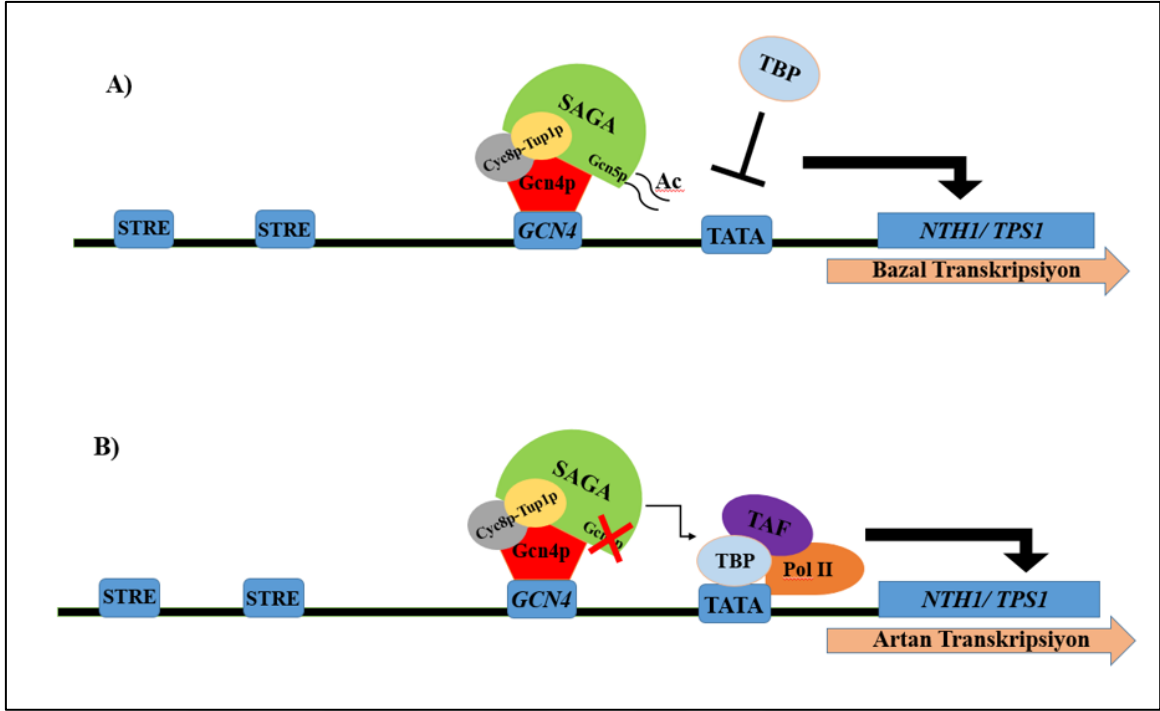
Şekil 28. Gcn5 proteininin *NTH1* ve *TPS1* promotor aktivasyonuna etkisi.

Transkripsiyonun başlayabilmesi için TBP ve TAFII proteinlerinden oluşan TFIID ile birlikte genel transkripsiyon faktörlerinin (GTF) sıralı bağlanması ve RNA polimeraz II (Pol II) enziminin promotor bölgesine yerleşerek transkripsiyon başlama kompleksinin (Transcription Initiation Complex, TIC) oluşması gereklidir. Ayrıca transkripsiyonun regülasyonu için HAT-HDAC aktivitesi ile nükleozomların tekrar modellenmesi ve aktivatör/koaktivatör ve diğer düzenleyici proteinlerin promotor bölgesine gelmesi gerekmektedir (Basehoar vd., 2004). Asetilasyon-deasetilasyon ile kromatini tekrar-modelleyen komplekslerin promotora getirilmesinde rolü olan Cyc8 (Ssn6)-Tup1 kompleksinin, hem normal koşullarda transkripsiyonel baskılama için hem de stres yanıtında transkripsiyonel indüksiyon için önemli olduğu bilinmektedir (Proft ve Struhl, 2002). Cyc8p/Tup1p kompleksinin ilgili genin promotoruna getirilmesi ise DNA'ya bağlanabilen proteinler aracılığıyla olmaktadır. Gcn4 proteini bZIP (basic leucine zipper factors) DNA bağlanma motifine sahip transkripsiyon faktörü olup Cyc8p/Tup1p kompleksini Gcn4-bağlanma elementi içeren promotora getirilmesinde görev alır. Histon H3'ün hiperasetilasyonu için HAT aktivitesine sahip Gcn5 proteininin Gcn4p aracılığıyla promotora getirilmesi gerekir (Kuo vd., 2000). İlgili genin promotorundaki Gcn4-bağlanma

elementine bağlanan Gcn4 proteinine ise Cyc8p/Tup1p kompleksi bağlanarak kromatinin tekrar-modellenebilmesi için gerekli HAT ve HDAC aktivitesine sahip proteinlerin promotora getirilmesini sağlar. HAT aktivitesine sahip olan Gcn5p, Gcn4p-Cyc8p/Tup1p kompleksine bağlanabilmek için HDAC aktivitesine sahip olan Hda1p ile rekabet halindedir. Gcn4p-Cyc8p/Tup1p kompleksine Gcn5p bağlandığında histon asetilasyonu/hiperasetilasyonu Hda1p bağlandığında ise histon deasetilasyonu gerçekleşir (Islam vd., 2011).

Gcn4p tarafından kontrol edilen promotorlarda yapılan çalışmalarda SAGA kompleksi transkripsiyonu baskılayıcı bir görev almaktadır. İndükleyici olmayan koşullarda SAGA kompleksinin TBP'nin fonksiyonunu inhibe ederek TATA kutusuna bağlanmasını engellediği gösterilmiştir. SAGA'nın inhibitör özelliği Spt3 ve Spt8 alt birimlerinin de görev alması ile gerçekleşir ve bu rol için Gcn5p'nin gerekli olduğu gösterilmiştir (Belotserkovskaya vd., 2000).

Normal üreme koşullarında Gcn5p varlığında, Gcn4p ve Cyc8p-Tup1p aracılığıyla promotora getirilen SAGA-Gcn5p TBP'nin fonksiyonunu inhibe ederek *NTH1* ve *TPS1* transkripsiyonunu baskılamış olabilir. Gcn5p yokluğunda ise TBP'nin TATA kutusuna bağlanması ile transkripsiyon artmış olabilir (Şekil 29).



Şekil 29. Normal üreme koşullarında *NTH1* ve *TPS1* transkripsiyonunun aktivasyon modeli
 (A) Yaban tip maya hücrelerinde Gcn5p histon asetilasyonu ile TBP alımının engellenmesi
 (B) Mutant maya hücrelerinde Gcn5p-bağımlı asetilasyonun gerçekleşmemesi ve promotora artan TBP alımı sonucu artan transkripsiyon.

4.4. Gcn5 Proteininin Stres Koşullarında *NTH1* ve *TPS1* Ekspresyonuna Etkisi

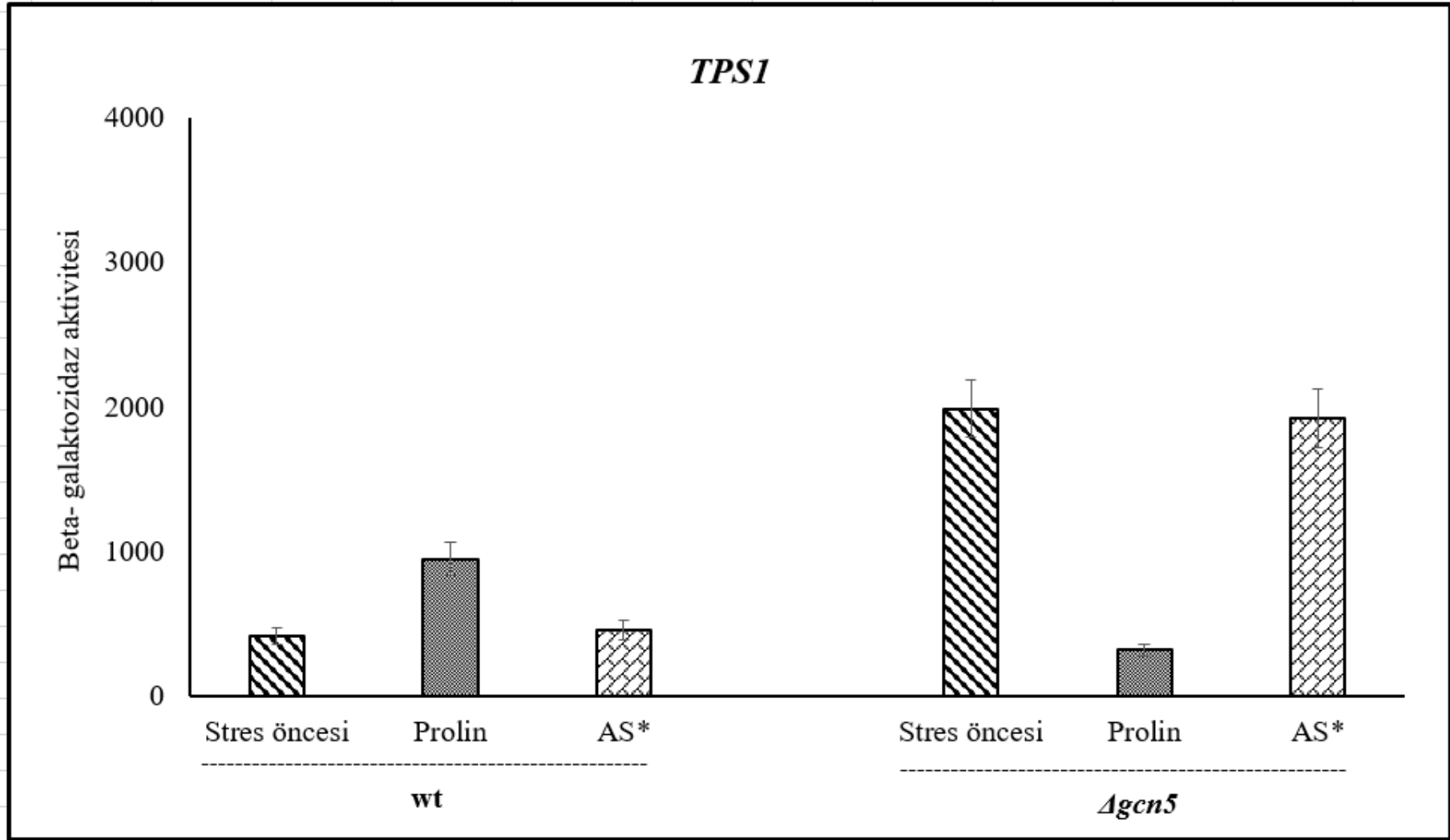
Maya hücreleri tarafından tercih edilen glutamin, asparajin, amonyum sülfat gibi azot kaynakları kuvvetli azot kaynağı olarak; tercih edilmeyen prolin, üre, ornitin gibi azot kaynakları ise zayıf azot kaynakları olarak bilinmektedir. Kuvvetli azot kaynakları hızlı büyümeyi teşvik etmektedir. Birçok mikroorganizma bu farklı azot kaynaklarını içeren bileşikleri kullanabilir (Magasanik ve Kaiser, 2002). Araştırmamızda kuvvetli azot kaynağı olarak amonyum sülfat zayıf azot kaynağı olarak prolin kullanıldı. Böylece zayıf azot kaynağı içeren ortamda bulunan hücrelerde azot açlık stresi oluşturuldu. Kuvvetli ve zayıf azot kaynağında üretilen yaban tip ve mutant maya hücrelerinde beta-galaktozidaz enzim aktivitesi ölçülerek *TPS1* ve *NTH1* promotor aktivasyonu belirlendi.

TPS1-LacZ gen füzyonu içeren yaban tip maya hücrelerinin β -galaktozidaz aktivitesi zayıf azot kaynağı içeren ortamda $948,3 \pm 112,7$ ünite iken kuvvetli azot kaynağında $458,6 \pm 65,3$ ünite olarak ölçüldü. *Agcn5* maya hücrelerinin β -galaktozidaz aktivitesi zayıf azot kaynağında $319,8 \pm 42,1$ ünite, kuvvetli azot kaynağında ise $1921,7 \pm 204,8$ ünite olarak hesaplandı. Stres içermeyen ortamdaki stres içeren ortama geçirilen yaban tip maya hücrelerinde *TPS1* promotor aktivasyonunun yaklaşık 2 kat arttığı *Agcn5* maya hücrelerinde ise yaklaşık 6 kat azaldığı belirlendi ($p < 0,05$) (Şekil 30). İlginç olarak *Agcn5* maya hücrelerinde stres öncesi belirlenen *TPS1* promotor aktivasyonunun taze kuvvetli azot kaynağına geçirildiğinde değişmezken zayıf azot kaynağı içeren ortamda azaldığı gözlemlendi. Stres koşullarında, mutant maya hücrelerinde ölçülen β -galaktozidaz aktivitesinin yaban tip maya hücrelerden 3 kat daha düşük olması ($p < 0,05$) Gcn5p yokluğunda *TPS1* promotor aktivasyonunun gerçekleşemediğini göstermektedir. Bu sonuçlar Gcn5 proteininin normal üreme koşullarında *TPS1* transkripsiyonunun baskılanması için stres koşullarında ise aktivasyonu için gerekli olduğunu göstermektedir. Gcn5 proteininin iki farklı mekanizma ile (HAT aktivitesi ve kromatin yeniden modelleme) transkripsiyonu regüle ettiği düşünüldüğünde, normal koşullarda Gcn5 proteini kromatin yeniden modellemesiyle TBP bağlanmasını kontrol ederek, stres koşullarında ise HAT aktivitesiyle veya kromatin yeniden modellemesiyle Msn2/4p bağlanmasını engelleyerek *TPS1* transkripsiyonunu düzenlemiş olabilir.

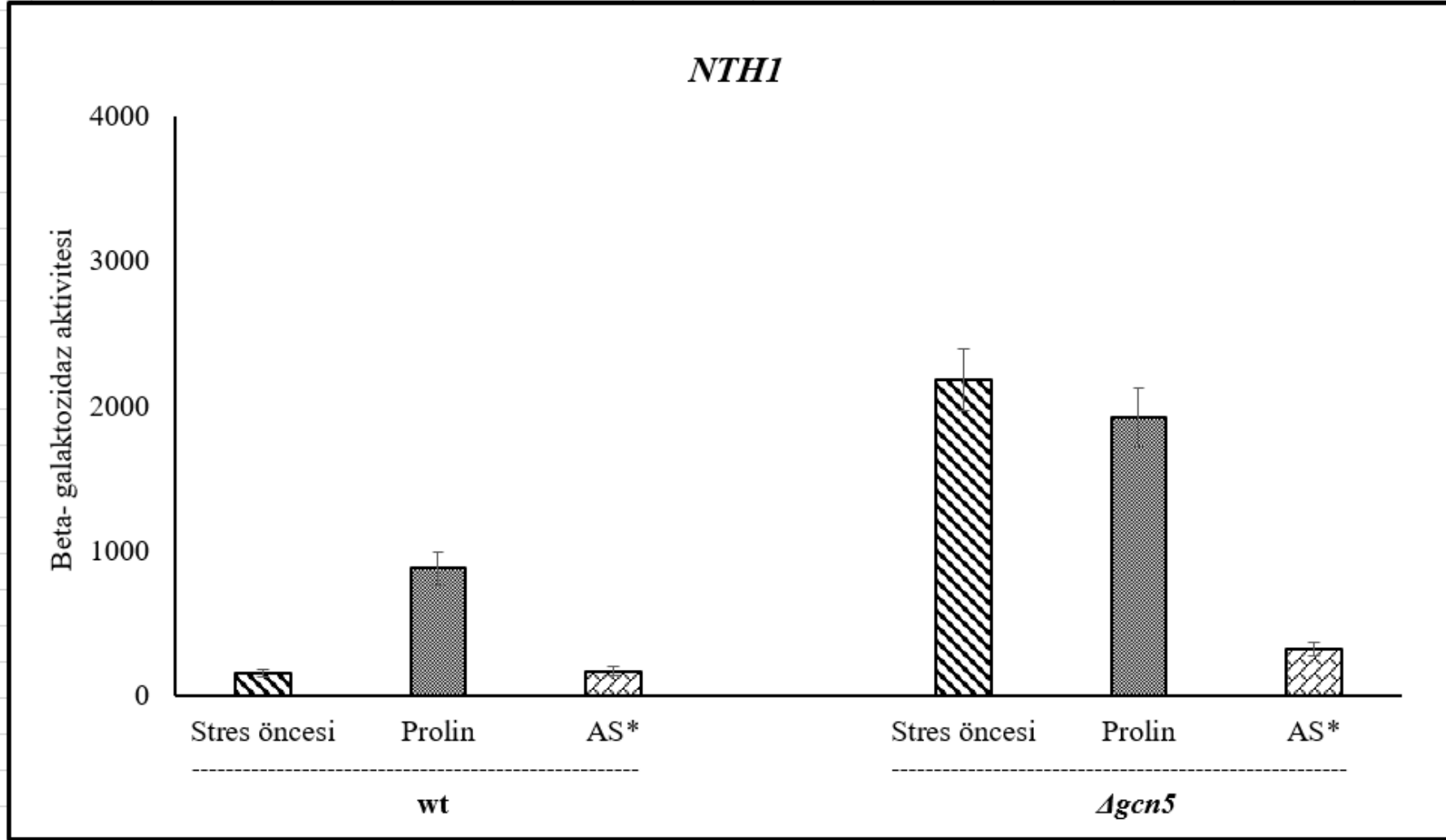
NTH1-LacZ gen füzyonunu içeren yaban tip maya suşunun β -galaktozidaz aktivitesi zayıf azot kaynağı içeren ortamda $879,4 \pm 112,3$ ünite iken kuvvetli azot kaynağında $168,1 \pm 30,2$ ünite olarak hesaplandı. Mutant maya hücrelerinde β -galaktozidaz aktivitesi zayıf azot kaynağında $1917,8 \pm 201,5$ ünite ve kuvvetli azot kaynağında $318,4 \pm 45,2$ ünite olarak ölçüldü. Stres içermeyen ortamdaki stres içeren ortama geçirilen yaban tip maya hücrelerinde *NTH1* promotor aktivasyonunun yaklaşık 6 kat arttığı mutant maya hücrelerinde ise stres öncesi seviyede kaldığı belirlendi ($p < 0,05$) (Şekil 31). İlginç olarak mutant maya hücreleri zengin azot kaynağı içeren taze ortama geçirildiğinde *NTH1* promotor aktivasyonunun yaklaşık 6 kat azaldığı gözlemlendi. Elde edilen sonuçlara göre normal üreme koşullarında ve stres koşullarında *NTH1* transkripsiyonunun baskılanması için Gcn5 proteininin gerekli olduğu gösterilmektedir.

SUC2-LacZ gen füzyonunu içeren yaban tip maya suşunun β -galaktozidaz aktivitesi zayıf azot kaynağında $0,266 \pm 0,16$ ünite olarak ve kuvvetli azot kaynağında ise $0,133 \pm 0,03$ ünite olarak hesaplandı. *SUC2-LacZ* gen füzyonunu içeren *Agcn5* maya suşunun zayıf azot kaynağında β -galaktozidaz aktivitesi $21,18 \pm 0,8$ ünite olarak ve kuvvetli azot kaynağında ise $18,66 \pm 0,8$ ünite olarak hesaplandı.

Stres koşullarında genel stres transkripsiyon faktörleri olarak bilinen *Msn2* ve *Msn4*, *TPS1* ve *NTH1* promotorunda bulunan STRE dizilerine bağlanarak transkripsiyonlarını aktive etmektedir (Winderickx vd., 1996). *Msn2* ve *Msn4* proteinlerinin nükleer lokalizasyonu TOR sinyal yolu ve cAMP yolağı tarafından kontrol edilmektedir. TOR sinyal yolu besin mevcudiyetine yanıt olarak *Msn2/Msn4*'ün nükleusa geçmesini engelleyerek stres genlerinin transkripsiyonunu baskılar. Çalışmamızda in silico analizler sonucunda *TPS1* promotorunda bulunan STRE dizilerinin nükleozomlar tarafından kapatılmadığı *NTH1* promotorunda bulunan STRE dizilerinin ise nükleozomlar tarafından kapatıldığı belirlenmiştir. *Msn2/4* transkripsiyon faktörlerin STRE dizilerine bağlanabilmesi için nükleozomların SAGA veya SWI/SNF kompleksi ile modifiye edilerek açılmaları ya da pozisyonlarının değiştirilmesi gerekmektedir. SAGA kompleksi ve alt birimlerinin stres yanıtı oluşturma ve büyüme için önemli olduğu rapor edilmiştir (Voorst vd., 2006). Azot açlığı ile oluşturulan stres koşullarında strese yanıt için SAGA gereklidir ve *Gcn5* katalitik alt birimi asetilasyon yoluyla hedef genlerin ekspresyonlarını düzenler (Rodríguez-Navarro, 2009).



Şekil 30. Stres koşullarında yaban tip ve $\Delta gen5$ maya hücrelerinde *TPS1* promotor aktivasyonu.

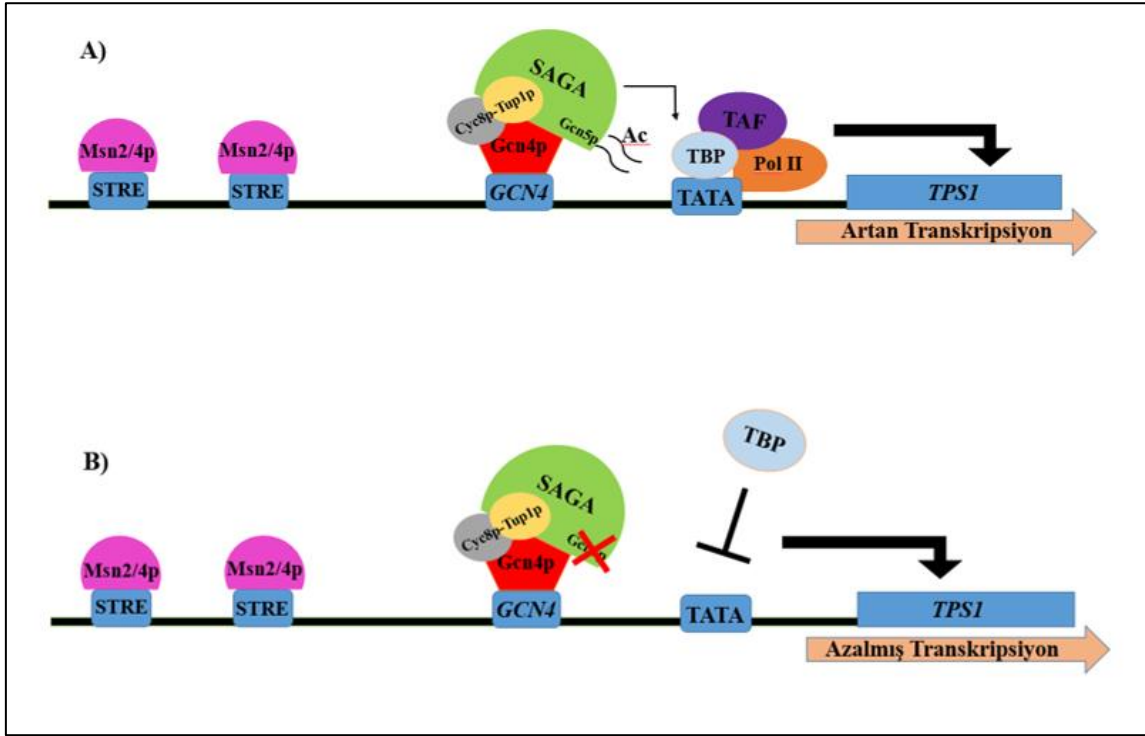


Şekil 31. Stres koşullarında yaban tip ve $\Delta gcn5$ maya hücrelerinde *NTH1* promotor aktivasyonu.

Isı şoku ve oksidatif (H_2O_2 treatment) stres *HSP12* geninin promotor ve kodlama bölgelerinde (ORF) histon asetilasyonunu arttırmaktadır. *HSP12* histon hiperasetilasyonunun gen transkripsiyonunda işlevsel olup olmadığını belirlemek için yapılan bir çalışmada maya hücreleri histon asetil transferaz inhibitörü olan spermidin (SPD) ile muamele edildiğinde *HSP12* transkripsiyonunun oksidatif stres koşullarında azalmadığı tersine arttığı gözlenmiştir (Antonazzi vd., 2021). Bunun üzerine araştırmacılar oksidatif stres ile ilişkili olan ve HAT aktivitesine sahip Gcn5 proteininin yokluğunda *HSP12* transkripsiyon miktarının normal üreme koşullarında arttığını tespit etmişlerdir. Çalışmanın devamında oksidatif stres ve normal üreme koşullarında *HSP12* geninin promotor ve ORF bölgelerindeki histon asetilasyon seviyesi belirlendiğinde, oksidatif stresin hem yaban tip ve hem de *Δgcn5* maya hücrelerinde hiperasetilasyona neden olduğu ancak asetilasyon seviyelerinin yaban tip ve *Δgcn5* maya hücrelerinde benzer olduğu gözlenmiştir (Antonazzi vd., 2021). Araştırmacılar MNase kesimi ile nükleozomların pozisyonlarını belirlediklerinde *Δgcn5* maya hücrelerinin +1 nükleozom kaymasını gerçekleştiremediğini tespit etmişlerdir. Çalışmanın sonunda *HSP12* asetilasyon seviyesi değişmediği için *HSP12* transkripsiyonunun aktivasyonunda Gcn5p'nin HAT aktivitesinin rolü olmadığı, ancak Gcn5 proteininin nükleozomların kaydırılması için gerekli olduğu belirlenmiştir. Kromatin tekrar-modelleyici komplekslerin Gcn5-bağımlı olarak *HSP12* promotoruna getirilmesi ile *HSP12* geninin transkripsiyonunun aktive edildiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda azot açlığı ile oluşturulan stres koşullarında *Δgcn5* maya hücrelerinde *TPS1* transkripsiyonunun azaldığı ve *NTH1* transkripsiyonunun ise arttığı belirlenmiştir.

Yaban tip mayada stres koşullarında TOR sinyal yolunun inaktif hale gelmesiyle translasyonu artan Gcn4 transkripsiyon faktörü Cyc8-Tup1 ile SAGA kompleksini promotora çekerek stres yanıtı oluşturur ve *TPS1*'in transkribe edilmesini sağlayabilir (Şekil 32). Gcn5p artan H3 asetilasyonu ile transkripsiyonu pozitif olarak regüle eder ayrıca nükleozom mobilizasyonu yoluyla nükleozomlarla çevrili olan bağlanma dizilerini de transkripsiyon faktörlerinin bağlanabileceği şekilde modifiye edebilir. Nükleozomların kaydırılması veya açılması ile kapalı olan STRE dizilerine stres koşullarında nükleusa giren Msn2 ve Msn4 bağlanabilir. Bu sayede strese yanıt verilerek *TPS1* ekspresyonu gerçekleşmiş olabilir. Mutant maya hücrelerinde Gcn5 proteini eksikliğinden kaynaklı

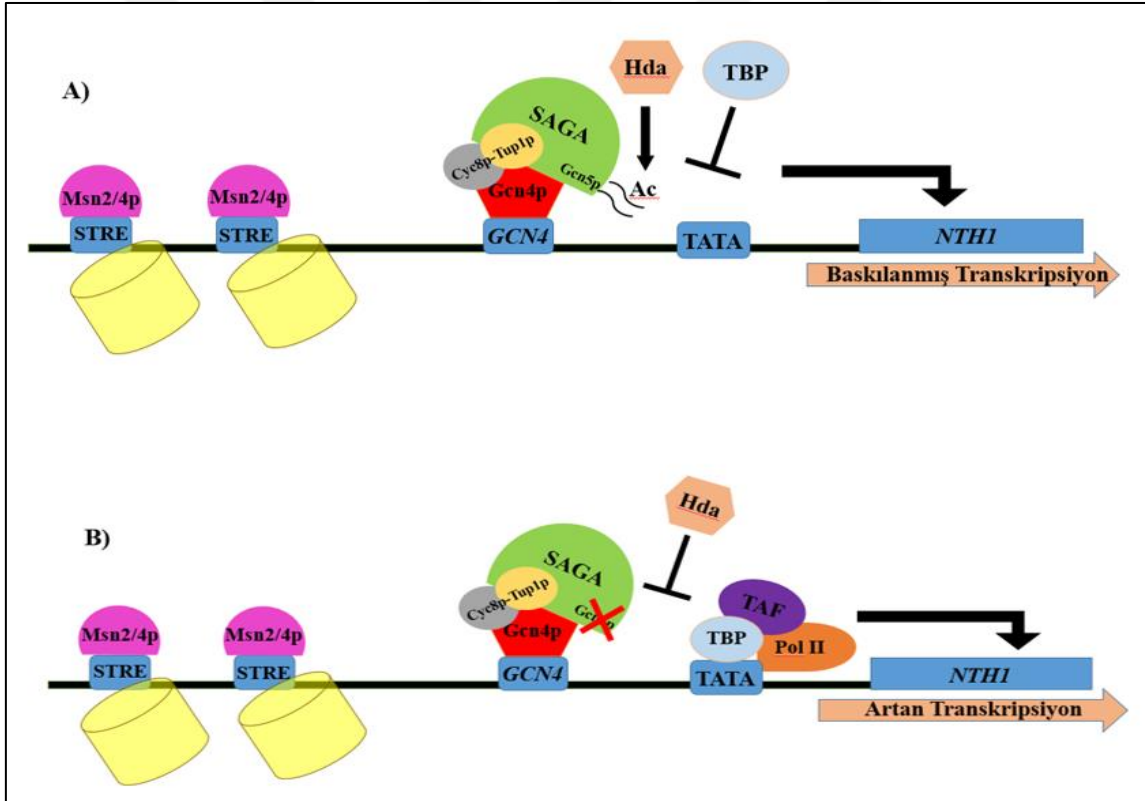
histon H3 asetilasyonu gerçekleşemez ve buna bağlı nükleozomların mobilize olamaması hücrelerin stres yanıtı geliştirememesine neden olabilir.



Şekil 32. Stres koşullarında yaban tip ve $\Delta gcn5$ maya hücrelerinde *TPS1* aktivasyonu. (A) Yaban tip maya hücrelerinde Gcn5p histon asetilasyonu ile aktive edilen transkripsiyon (B) Mutant maya hücrelerinde Gcn5p'ye bağlı asetilasyonun gerçekleşmemesi ve TBP alımının regüle edilememesi nedeniyle azalan transkripsiyon.

Stres koşullarında nükleusa artan Gcn4p geçişi ve Cyc8-Tup1 kompleksinin desteğiyle Gcn4p, SAGA kompleksini promotora çekerek yüksek oranda transkripsiyona neden olmuş, ve Gcn5p eksikliği *NTH1* baskılanmasını engellemiş olabilir. Stres koşullarında SAGA kompleksi tarafından asetilenmiş histonlar transkripsiyonun baskılanması için HDA komplekslerini trehaloz promotoruna alır. SAGA'nın artan asetilasyonuna bağlı olarak asetilenmiş histonların HDA komplekslerini promotora alma affinitelerinin de arttığı yapılan bir çalışmada belirtilmiştir (Yu vd., 2021). Yaban tip mayada zayıf azot ile muamele sırasında Gcn4/Cyc8-Tup1 kompleksinin SAGA'yı promotora almasıyla Gcn5 tarafından histon asetilasyonu gerçekleşebilir. Asetillenmiş histonların artan affinitesi HDA komplekslerinin promotora alımına öncülük etmiş olabilir (Şekil 33). Bu

sayede deasetilasyon yolu ile nükleozomlar modifiye edilerek *NTH1*'in hiperaktivasyonu baskılanmış olabilir. Promotorun hiper asetilasyonu, asetilasyon ve deasetilasyon işbirliği ile bastırılarak gereksiz aktivasyon engellenmiş olabilir. Mutant maya hücrelerinde ise Gcn5p eksikliğine rağmen diğer kromatin-tekrar modelleme faktörleri sayesinde nükleozomların modifiye edilmesi ile açığa çıkan STRE bölgeleri ve Msn2/4 tarafından strese yanıt verebildiği için hiper asetilasyonun daha da artmasına sebep olmuş olabilir. Bu bağlamda Gcn5p eksikliğinde histonlar asetile edilemeyecek, nükleozomlar modifiye edilemeyecek ve HDA kompleksleri promotora alınamayacaktır, bu da artan transkripsiyonun baskılanamamasına sebep olarak *NTH1*'in hiperaktivite göstermesine sebep olabilir.

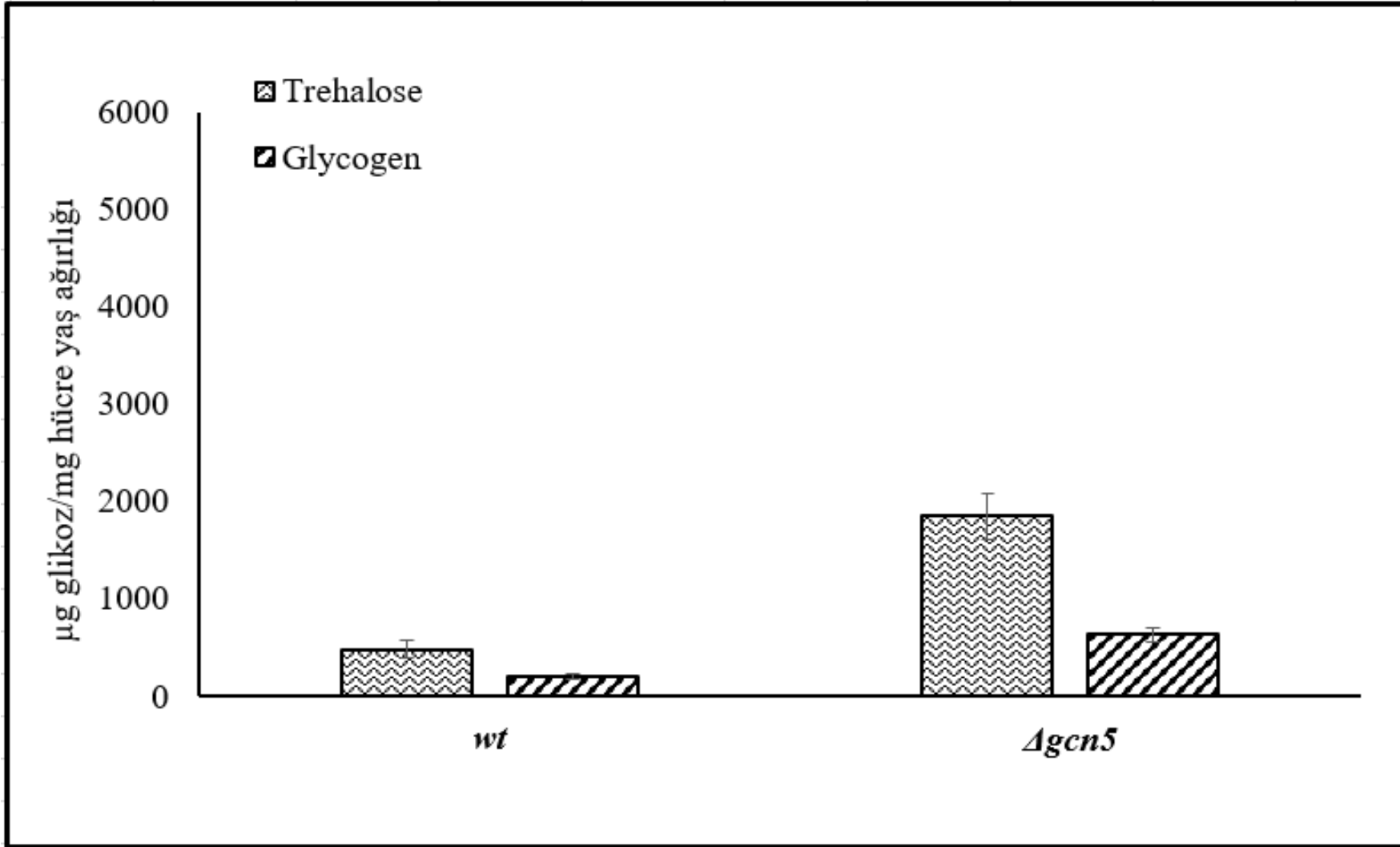


Şekil 33. Stres koşullarında yaban tip ve $\Delta gcn5$ maya hücrelerinde *NTH1* aktivasyonu. A) Yaban tip maya hücrelerinde Gcn5p histon asetilasyonu ile TBP alımının engellenmesi ve HDA kompleksinin promotora alımı ile transkripsiyonun baskılanması B) Mutant maya hücrelerinde Gcn5p'ye bağlı asetilasyonun gerçekleşmemesi ve HDA kompleksinin promotora alınamaması nedeniyle artan hiper aktivasyon.

4.5. Gcn5 Proteininin Hücre İçi Trehaloz ve Glikojen Birikimine Etkisi

Trehaloz ve glikojen, stres sırasında maya hücreleri tarafından biriktirilen iki önemli depo karbonhidrattır. Stres koşullarından bağımsız olarak zengin besin ortamında üretilen maya hücrelerinde logaritmik aşamanın sonunda ve durağan aşamanın başında trehaloz ve glikojen birikimi gerçekleşmektedir. Çalışmamızda Gcn5p proteininin trehaloz ve glikojenin birikimi üzerine etkisi enzimatik olarak belirlenmiştir.

Yaban tip ve mutant maya hücrelerinde Gcn5 proteininin trehaloz ve glikojen birikimine etkisi Şekil 34'de verildi. Logaritmik olarak çoğalmakta olan yaban tip maya hücrelerinin stres içermeyen normal üreme koşullarında hücre içi trehaloz miktarı $479,2 \pm 91,3$ µg glikoz/mg yaş maya ağırlığı iken, glikojen miktarı ise $201,8 \pm 32,1$ µg glikoz/mg yaş maya ağırlığı olarak belirlendi. Aynı koşullarda *Δgcn5* maya suşunun hücre içi trehaloz miktarı $1848,6 \pm 238,9$ µg glikoz/mg yaş maya ağırlığı olarak belirlenirken, glikojen miktarı ise $633,8 \pm 74,2$ µg glikoz/mg yaş maya ağırlığı olarak hesaplandı. Normal üreme koşullarındaki yaban tip maya hücrelerinde biriken trehaloz miktarı glikojen miktarından yaklaşık 2 kat daha fazla iken ($p < 0,05$), *Δgcn5* maya hücrelerinde biriken trehaloz miktarı ise glikojen miktarından yaklaşık 3 kat daha fazla olarak belirlendi ($p < 0,05$). Yaban tip maya suşuyla karşılaştırıldığında ise *Δgcn5* maya suşunun hücre içerisinde biriken trehaloz miktarında yaklaşık 4 katlık bir artış meydana geldiği gözlemlendi ($p < 0,05$). Benzer şekilde yaban tip maya suşuna göre *Δgcn5* maya suşunun hücre içerisinde biriken glikojen miktarında da yaklaşık 3 katlık bir artış meydana gelmiştir ($p < 0,05$). Çalışmamızda normal koşullarda mutant maya suşunda *NTH1* ve *TPS1* aktivitelerinde yaban tip suşu göre artış gözlemlendi. Normal koşullar altında yaban tip maya hücresinde logaritmik aşama sırasında trehaloz konsantrasyonunun düşük ve trehaloz metabolizmasında görevli enzimlerin bazal aktivite göstermesi beklenir (Eleutherio vd., 2014). Yaban tip mayada normal koşullarda trehaloz ve glikojen logaritmik aşamanın sonlarına göre depo edilmektedir. Çalışmamız da bu aşamada gerçekleştirilerek *NTH1* ve *TPS1* genlerinin yaban tip mayada bazal transkribe uğradığı gözlemlenirken, mutant mayada ise hem *NTH1* ve *TPS1* genlerinde hem de hücre içi depo karbonhidrat birikiminde artış gözlemlenmiştir.



Şekil 34. Gcn5 proteininin trehaloz ve glikojen birikimine etkisi.

Zayıf azot kaynağı içeren ortama geçirilen yaban tip maya suşunun hücre içerisinde biriktirdiği trehaloz miktarı $1421,5 \pm 235,6$ µg glikoz/mg yaş maya ağırlığı, kuvvetli azot içeren ortamdaki trehaloz miktarı ise $562,4 \pm 68,7$ µg glikoz/mg yaş maya ağırlığı olarak belirlendi (Şekil 35). *Δgcn5* maya suşunun zayıf azot stresinde biriktirdiği trehaloz miktarı $2134,7 \pm 256,2$ µg glikoz/mg yaş maya ağırlığı iken kuvvetli azot içeren ortamda $1003,7 \pm 112,4$ µg glikoz/mg yaş maya ağırlığı olarak tespit edildi. Aynı şekilde yaban tip maya suşunun zayıf azot stresinde hücre içerisinde biriktirdiği glikojen miktarı $4987,3 \pm 358,4$ µg glikoz/mg yaş maya ağırlığı iken kuvvetli azot içeren ortamda ise $398,7 \pm 52,3$ µg glikoz/mg yaş maya ağırlığı olarak belirlendi (Şekil 36). *Δgcn5* maya suşunun zayıf azot stresinde biriktirdiği glikojen miktarı $827,1 \pm 92,8$ µg glikoz/mg yaş maya ağırlığı olarak belirlenirken kuvvetli azot içeren ortamda $462,5 \pm 55,6$ µg glikoz/mg yaş maya ağırlığı olarak hesaplandı.

Logaritmik aşamadan zayıf azot stresine geçirilen yaban tip maya suşunda hücre içinde biriken trehalozun miktarının normal koşullardan yaklaşık 3 kat daha fazla olduğu belirlenirken, glikojen miktarının ise yaklaşık 24 kat daha fazla olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$). Kuvvetli azot kaynağına geçirilen yaban tip mayada ise trehaloz miktarında belirgin bir fark gözlenmezken, glikojen miktarı normal koşullara göre yaklaşık 2 kat artmıştır ($p < 0,05$). Logaritmik aşamadan zayıf azot stresine geçirilen *Δgcn5* mutant maya suşunda hücre içinde biriken trehaloz ve glikojen miktarında stres koşullarında normal koşullara göre hafif bir artış olsa da iki ortam arasında belirgin bir fark gözlenmedi. Kuvvetli azot kaynağına geçirilen *Δgcn5* maya suşunda trehaloz miktarı normal koşullara göre yaklaşık 2 kat azalmışken ($p < 0,05$) aynı koşullara geçirilen glikojen miktarında ise belirgin bir fark gözlenmedi.

Yaban tip maya suşu ile *Δgcn5* maya suşunun trehaloz miktarları karşılaştırıldığında zayıf azot stresinde mutant suşun trehaloz miktarı yaban tip suştan yaklaşık 1,5 kat fazla olduğu gözlemlendi. Kuvvetli azot ortamında biriken trehaloz miktarları göz ününe alındığında ise *Δgcn5* mutant maya suşunun yaban tip suştan 2 kat fazla olduğu belirlendi ($p < 0,05$). Yaban tip maya hücresi ile *Δgcn5* maya hücresinin zayıf azot stresli ortamda hücre içinde biriken glikojen miktarlarında da belirgin bir fark gözlemlendi. Yaban tip maya hücrelerindeki glikojen miktarı mutant suşa kıyasla yaklaşık 6 kat daha yüksektir ($p < 0,05$). Fakat buna

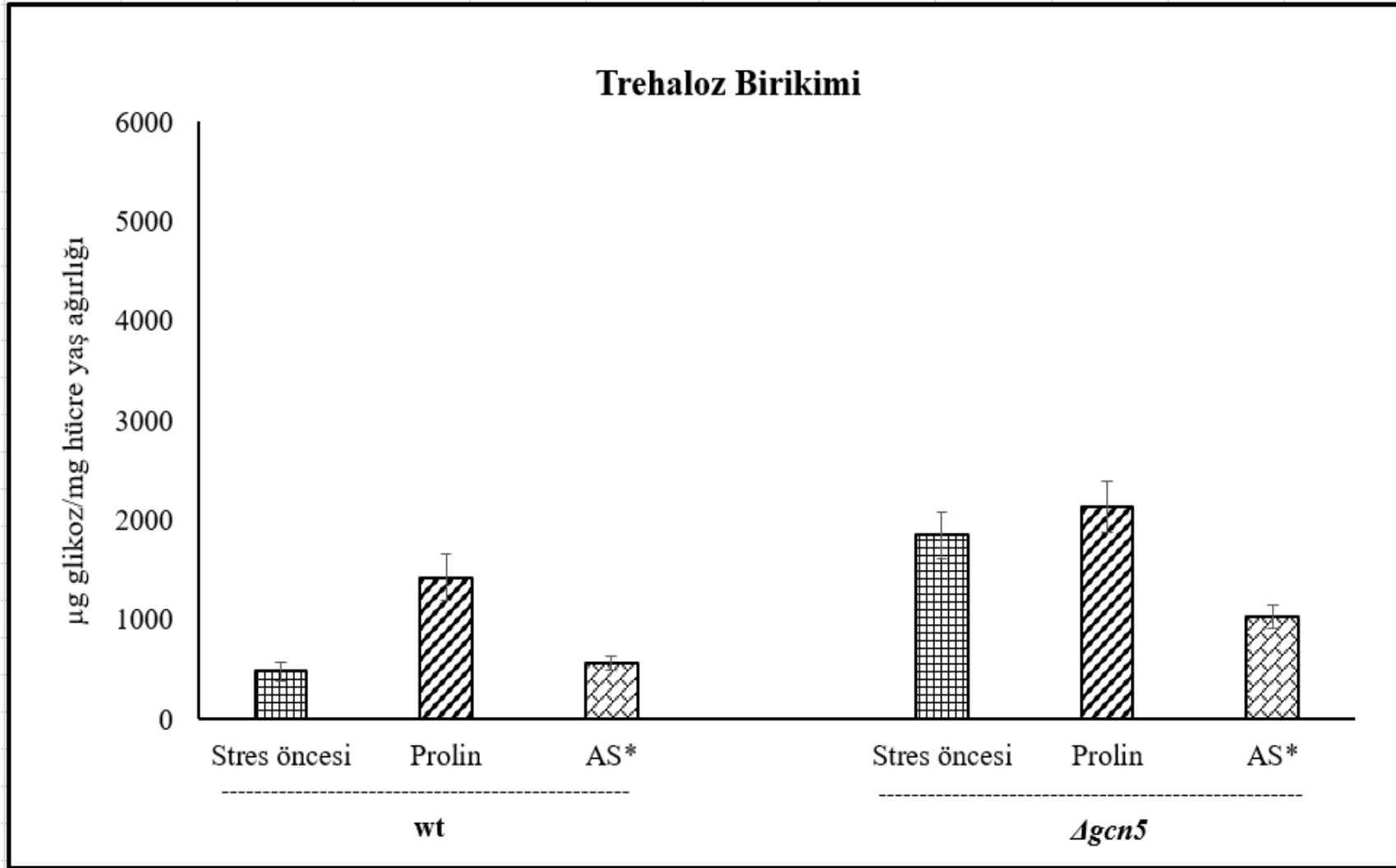
rağmen iki maya suşunun kuvvetli azot ortamındaki hücre içi biriken glikojen miktarları arasında belirgin bir fark gözlenmedi.

Trehalozun yıkımı nötral trehalaz enzimi ile gerçekleştirilirken, glikojen ise glikojen fosforilaz enzimi ile parçalanır. Yaban tip mayaya göre *Δgcn5* mutant maya suşunda trehaloz ve glikojen miktarlarının normal koşulda artması hücrelerin stres koşullarındaki gibi trehaloz ve glikojen biriktirdiğini, bu birikimin baskılanmadığını veya hücrelerde bu rezerv karbonhidratların yıkılamadığını göstermektedir. Stres koşullarında trehalaz enziminin aktive olması cAMP-Protein Kinaz A (PKA)'nın fosforilasyonu ile gerçekleşmektedir veya durağan fazdaki mayaya glikoz eklenmesi durumunda hücrede trehalaz aktive olur (Eleutherio vd., 2014). Bu bağlamda mutant hücreler stres koşullarında ya da durağan aşamada olmadığı için *NTH1* ekspresyonunun yüksek olmasına rağmen trehalozun hücre içinde birikmesi trehalaz enzimlerinin aktive edilmediğinin göstergesi olabilir. Glikojenin de yaban tip hücrede birikenden yüksek gözlenmesi *Gcn5* proteininin logaritmik aşamada rezerv karbonhidrat üretimini ve birikimini baskıladığını göstermektedir. Bu durum *Gcn5* protein eksikliğinin hedef genlerin bazal transkripsiyondan daha fazla eksprese edilmesine neden olduğu fikrine sebep olmaktadır. Bu sonuç *Δgcn5* mutant hücrelerinde erken safhada hücrede stres koşullarındaki gibi trehaloz ve glikojen birikmesi ile sonuçlanabilir.

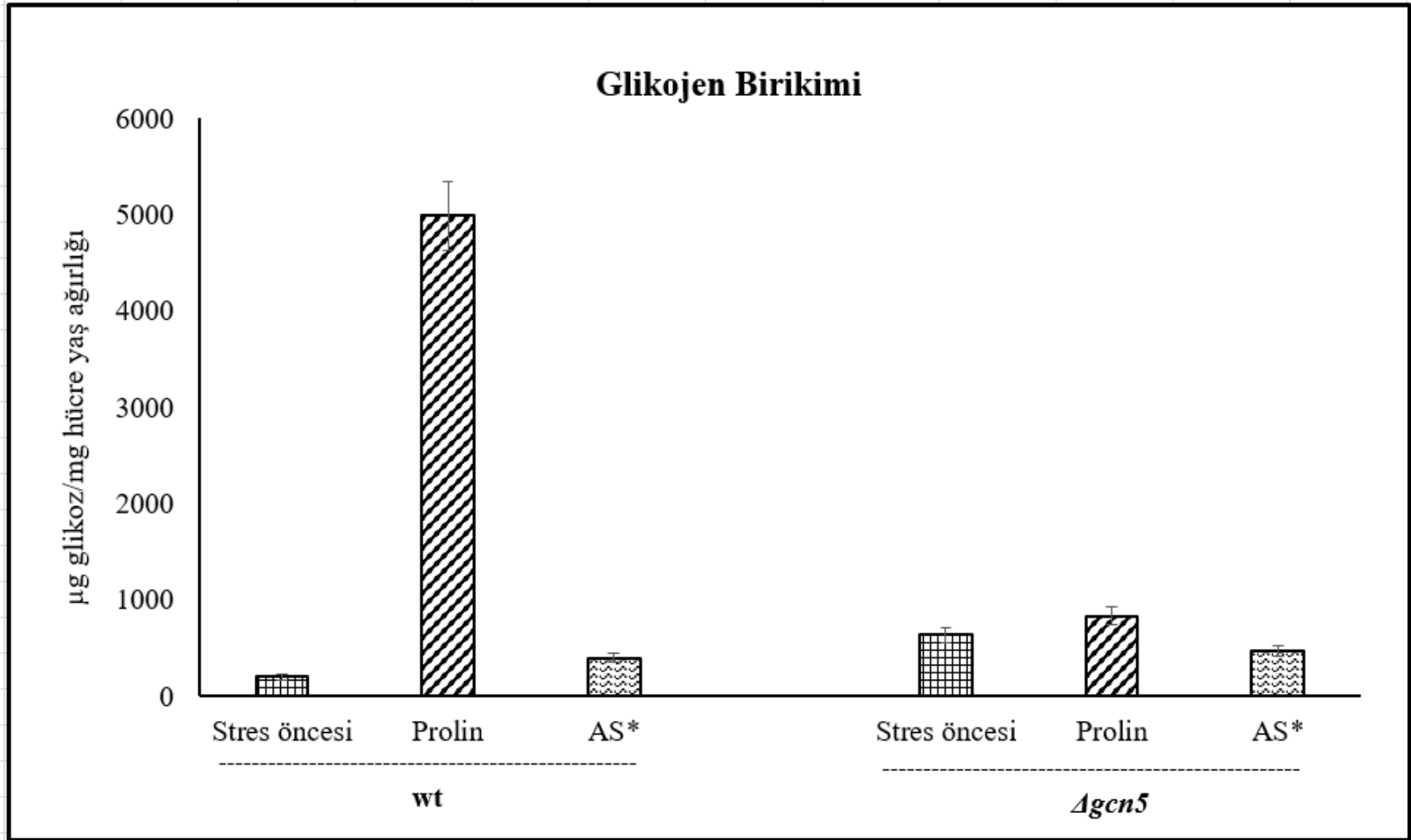
Maya hücreleri için prolin içeren ortam stres koşullarını oluşturduğu için bu zayıf azot kaynağı ile muamele strese yanıt ile sonuçlanır ve transkripsiyon faktörleri aracılığıyla hücrede trehaloz üretilmesi için stres sinyali oluşur. Bu faktörler *Gcn4p* veya *Gln3p*, *Gat1p* gibi GATA transkripsiyon faktörleri ya da *Msn2p*, *Msn4p* gibi STRE dizilerine bağlanan transkripsiyon faktörleri olabilir. *Gcn5p* logaritmik aşamada *TPS1* ve *NTH1* için baskılayıcı bir görev üstlenir. Fakat mutant maya hücresinde *TPS1* ve *NTH1* promotor aktivitesine göre trehaloz birikimi tutarlı değildir. Özellikle zayıf azotlu ortamda yüksek *NTH1* ve düşük *TPS1*'e göre yaban tip mayadan fazla trehaloz birikimi gözlenmesi bu uyumsuzluğu göstermektedir. Ayrıca kuvvetli azot kaynağında da yüksek *TPS1* ve düşük *NTH1* ise bu koşuldaki düşük trehaloz miktarı ile tutarlı değildir. Bu bağlamda *Gcn5p*'nin sadece *TPS1* veya *NTH1* üzerinde değil TPS kompleksini oluşturan diğer alt birimleri kodlayan *TPS2*, *TPS3* ve *TSL1* genlerinin ekspresyonları üzerinde de görev alabileceği düşünülebilir.

TPS1'in delesyonu TPS aktivitesini ve biriken trehalozu ortadan kaldırırsa da diğer genlerin silinmesi de buna benzer bir sonuç verebilmektedir. Örneğin *TPS2*'nin delesyonu TPP (trehaloz-6-fosfat fosfataz) aktivitesini ortadan kaldırır veya diğer genlerin silinmesi bu aktivitenin azalmasına neden olur (Eleutherio vd., 2014). Bu bağlamda Gcn5 proteininin eksikliğine bağlı hücre içi biriken trehaloz miktarının analizinde sadece *TPS1* ve *NTH1* promotor aktivitesi kesin bir sonuç sağlamıyor olabilir. Çalışmanın genişletilmesi açısından TPS kompleksinin alt birimlerini kodlayan diğer genleri de kapsayan bir araştırma yapılabilir.

Yaban tip maya hücresine göre mutant maya hücresinde glikojenin yaklaşık 6 kat azalması stres koşullarında hücrenin glikojen birikimi için Gcn5p'ye ihtiyaç duyduğunu göstermektedir. Logaritmik aşamada bazal transkripsiyon için baskılayıcı bir role sahip olduğu düşünülen Gcn5 proteininin kuvvetli azot ortamında ise belirgin bir etkisinin olmadığı söylenebilir. Tüm bu sonuçlara göre glikojenin transkripsiyonu ve hücre içi birikimi için Gcn5 proteini gereklidir ve glikojen regülasyonunda Gcn5p görev alır. Bu nedenle glikojen depo karbonhidratının daha kapsamlı regülasyon çalışmalarında $\Delta gcn5$ mutant maya hücresi glikojen metabolizma genlerinin analizinde kullanılabilir. Glikojen biyosentezinde görevli genlerin mutant suşları ile çalışılarak Gcn5p'nin kapsamlı analizi bu çalışmanın ilerleyen aşamaları için olumlu sonuçlar verebilir.



Şekil 35. Yaban tip ve $\Delta gcn5$ maya suşlarının stres koşullarında trehaloz birikimi.



Şekil 36. Yaban tip ve *Δgcn5* maya suşlarının stres koşullarında glikojen birikimi.

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ ve ÖNERİLER

Transkripsiyonel ko-aktivatör SAGA'nın alt birimi olan Gcn5 proteini histon asetilasyonu yoluyla kromatin yapısını modifiye eder ve bu özelliğine sahip olması transkripsiyon ile ilişkilendirilir. Bu sebeple çalışmamızda Gcn5 proteinine odaklanılarak trehalozun biyosentezinde görevli olan *NTH1* ve *TPS1*'in gen ekspresyonuna olan etkisi analiz edildi. Trehaloz birçok canlıda bulunan ve olumsuz stres koşullarına karşı hücreyi korumakla görevli depo karbonhidrattır (Eleutherio vd., 2014). Stres koşullarında *TPS1* tarafından kodlanan enzim ile sentezlenen trehaloz ortam şartları normale döndüğünde ise *NTH1*'in kodladığı trehalaz enzimi ile yıkılmaktadır. Gerçekleştirdiğimiz tez çalışmasına göre Gcn5 proteininin *NTH1* ve *TPS1* promotor aktivitesinde pozitif ve negatif rolü olduğu belirlendi. Gcn5 proteininin normal koşullarda *NTH1* ve *TPS1* gen aktivitesinde bazal transkripsiyon için baskılayıcı bir görev aldığı belirlendi. Gcn5p'nin stres koşullarında ise *NTH1*'in baskılanmasında, *TPS1*'in ise stres yanıtı oluşturması ve aktivitesi için gerekli olduğu tespit edildi. Bu bilgilere göre SAGA kompleksinin/Gcn5p'nin ve histon asetilasyonunun gen aktivasyonu ile ilişkisine ek olarak represyonunda da görev alabileceği ikili bir model öneriyoruz. Ayrıca hücrede trehaloz ve glikojen birikiminde de Gcn5 proteininin önemli bir rol oynadığı belirlendi.

Çalışmamızın sonucuna göre Gcn5 proteininin normal koşullarda ve stres ortamında Gcn4p ve Cyc8-Tup1 kompleksi aracılığıyla *NTH1* gen aktivitesinin baskılanmasında görevli olduğu, *TPS1* gen aktivitesinin ise hem baskılanmasında hem de aktivasyonunda görev aldığı düşünülmektedir. Bu çalışmanın devamı niteliğinde olacak bir sonraki çalışmalar için *Δgcn4*, *Δcyc8*, *Δtup1* mutantlarında *NTH1* ve *TPS1* promotor aktivitelerinin analiz edilmesi önerilebilir. SAGA kompleksinin daha kapsamlı araştırılması açısından SAGA'nın fonksiyonel alt birimlerinin duble mutant suşları ile çalışılması uygun olabilir.

Gcn5p eksikliğinde meydana gelen trehaloz ve glikojen birikimine göre Gcn5p'nin sadece *TPS1* ve *NTH1*'in transkripsiyonunda değil depo karbonhidrat birikiminde de görevli olduğu gösterildi. Son olarak çalışmamızda Gcn5'in promotorlar üzerinde ve trehaloz,

glikojen depo karbonhidratları üzerinde ortamdaki azot mevcudiyetine göre aktivasyonda veya represyonda etkisi olabileceği düşünölmektedir. Bu araştırmaya ek olarak Gcn5 mutantının trehaloz ve glikojen metabolizmasında görevli diğer genlerde de araştırılması çalışmanın detaylı analizi için olumlu sonuçlar getirebilir. Gcn5 proteininin delesyonu ile elde edilecek mayalar sahip olduğu yüksek trehaloz içeriği sayesinde birçok endüstriyel alanda kullanım olanağı kazanabilir. Trehaloz miktarının yüksek olmasının sağladığı uzun raf ömrü ve dayanıklılık gıda, sağlık ve biyoendüstriyel açıdan avantajlı maya hücrelerinin geliştirilmesine fırsat verebilir.



KAYNAKÇA

- Altmann, M. ve Linder, P. (2010). “Power of Yeast for Analysis of Eukaryotic Translation Initiation”. *Journal of Biological Chemistry*, 285(42), 31907–31912. doi:10.1074/jbc.r110.144196.
- Antonazzi, F., Di Felice, F. ve Camilloni, G. (2021). “GCN5 enables HSP12 induction promoting chromatin remodeling, not histone acetylation”. *Biochemistry and Cell Biology*, 99(6), 700-706.
- Argüelles, J. C. (2000). “Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis”. *Archives of Microbiology*, 174(4), 217–224. doi:10.1007/s002030000192.
- Arndt, K. ve Fink, G. R. (1986). “GCN4 protein, a positive transcription factor in yeast, binds general control promoters at all 5'TGACTC 3'sequences”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(22), 8516-8520.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. ve Struhl, K. (1992). “Short protocols in molecular biology”. *New York*, 275, 28764-28773.
- Backs, J. (2005). “Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation”. *Circulation Research*, 98(1), 15–24. doi:10.1161/01.res.0000197782.214.
- Balasubramanian, R., Pray-Grant, M. G., Selleck, W., Grant, P. A. ve Tan, S. (2001). “Role of the Ada2 and Ada3 transcriptional coactivators in histone acetylation”. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 7989–7995. doi:10.1074/jbc.m110849200.
- Bao, Y. ve Shen, X. (2011). “SnapShot: chromatin remodeling: INO80 and SWR1”. *Cell*, 144(1), 158–158.e2. doi:10.1016/j.cell.2010.12.024.
- Basehoar, A. D., Zanton, S. J., ve Pugh, B. F. (2004). “Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes.” *Cell*, 116(5), 699-709.
- Belda, I., Ruiz, J., Santos, A., Van Wyk, N. ve Pretorius, I. S. (2019). “*Saccharomyces cerevisiae*”. *Trends in Genetics*, 35(12), 956-957. doi:10.1016/j.tig.2019.08.009.

- Belotserkovskaya, R., Sterner, D. E., Deng, M., Sayre, M. H., Lieberman, P. M. ve Berger, S. L. (2000). “Inhibition of TATA-Binding Protein function by SAGA subunits Spt3 and Spt8 at Gcn4-activated promoters”. *Molecular and Cellular Biology*, 20(2), 634–647. doi:10.1128/mcb.20.2.634-647.2000.
- Benaroudj, N., Lee, D. H. ve Goldberg, A. L. (2001). “Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals”. *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 24261–24267. doi:10.1074/jbc.m101487200.
- Benayoun, B. A., Pollina, E. A. ve Brunet, A. (2015). “Epigenetic regulation of ageing: linking environmental inputs to genomic stability”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(10), 593–610. doi:10.1038/nrm4048.
- Binda, M., Péli-Gulli, M.-P., Bonfils, G., Panchaud, N., Urban, J., Sturgill, T. W., Loewith, R. ve De Virgilio, C. (2009). “The Vam6 GEF controls TORC1 by activating the EGO complex”. *Molecular Cell*, 35(5), 563–573. doi:10.1016/j.molcel.2009.06.033.
- Blázquez, M. A., Stucka, R., Feldmann, H., ve Gancedo, C. (1994). “Trehalose-6-P synthase is dispensable for growth on glucose but not for spore germination in *Schizosaccharomyces pombe*”. *Journal of Bacteriology*, 176(13), 3895–3902. doi:10.1128/jb.176.13.3895-3902.1994.
- Cameroni, E., Hulo, N., Roosen, J., Winderickx, J. ve Virgilio, C. D. (2004). “The novel yeast PAS kinase Rim15 orchestrates G0-associated antioxidant defense mechanisms”. *Cell Cycle*, 3(4), 460-466.
- Cheng, C., Mu, J., Farkas, I., Huang, D., Goebel, M. G., ve Roach, P. J. (1995). “Requirement of the self-glucosylating initiator proteins Glg1p and Glg2p for glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Molecular and Cellular Biology*, 15(12), 6632-6640.
- Cheon, Y., Kim, H., Park, K., Kim, M., ve Lee, D. (2020). “Dynamic modules of the coactivator SAGA in eukaryotic transcription”. *Experimental & Molecular Medicine*. doi:10.1038/s12276-020-0463-4.

- Cherkasova, V. A. (2003). “Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2alpha kinase *GCN2*”. *Genes & Development*, 17(7), 859–872. doi:10.1101/gad.1069003.
- 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. (2011). “Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast”. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D700–D705. doi:10.1093/nar/gkr1029.
- Clapier, C. R. ve Cairns, B. R. (2009). “The biology of chromatin remodeling complexes”. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), 273–304. doi:10.1146/annurev.biochem.77.06.
- Cocklin, R. ve Goebel, M. (2011). “Nutrient sensing kinases PKA and Sch9 phosphorylate the catalytic domain of the ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34”. *PLoS One*, 6(11), e27099.
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H. N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Teixeira, M. ve Thevelein, J. M. (2014). “Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(2), 254-299.
- Creamer, D. R., Hubbard, S. J., Ashe, M. P. ve Grant, C. M. (2022). “Yeast protein kinase a isoforms: A means of encoding specificity in the response to diverse stress conditions?”. *Biomolecules*, 12(7), 958.
- Davie, J. R. (1998). “Covalent modifications of histones: Expression from chromatin templates”. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8(2), 173–178. doi:10.1016/s0959-437x(98)80138-x.
- Dawes, I. W., ve Perrone, G. G. (2020). “Stress and ageing in yeast”. *FEMS Yeast Research*, 20(1), foz085.
- Durchschlag, E., Reiter, W., Ammerer, G. ve Schüller, C. (2004). “Nuclear localization destabilizes the stress-regulated transcription factor Msn2”. *Journal of Biological Chemistry*, 279(53), 55425-55432.

- Dutnall, R. N., Tafrov, S. T., Sternglanz, R., ve Ramakrishnan, V. (1998). “Structure of the histone acetyltransferase Hat1:A paradigm for the *GCN5*-related N-acetyltransferase superfamily”. *Cell*, 94(4), 427–438. doi:10.1016/s0092-8674(00)81584-6.
- Dutta, A., Sardu, M., Gogol, M., Gilmore, J., Zhang, D., Florens, L., Abmayr, S. M., Washburn, M. P. ve Workman, J. L. (2017). “Composition and function of mutant Swi/Snf complexes”. *Cell Reports*, 18(9), 2124–2134. doi:10.1016/j.celrep.2017.01.058.
- Elbein, A. D. (2003). “New insights on trehalose: a multifunctional molecule”. *Glycobiology*, 13(4), 17R–27. doi:10.1093/glycob/cwg047.
- Eleutherio, E., Panek, A., De Mesquita, J. F., Trevisol, E., ve Magalhães, R. (2014). “Revisiting yeast trehalose metabolism”. *Current Genetics*, 61(3), 263–274. doi:10.1007/s00294-014-0450-1.
- Engel, S. R. ve Cherry, J. M. (2013). “The new modern era of yeast genomics: community sequencing and the resulting annotation of multiple *Saccharomyces cerevisiae* strains at the Saccharomyces Genome Database”. *Database*, 2013. doi:10.1093/database/bat012.
- Erkina, T. Y. ve Erkine, A. M. (2006). “Displacement of histones at promoters of *Saccharomyces cerevisiae* heat shock genes is differentially associated with Histone H3 Acetylation”. *Molecular and Cellular Biology*, 26(20), 7587–7600. doi:10.1128/mcb.00666-06.
- Erkina, T. Y., Tschetter, P. A. ve Erkine, A. M. (2007). “Different requirements of the SWI/SNF complex for robust nucleosome displacement at promoters of heat shock factor and Msn2- and Msn4-regulated heat shock genes”. *Molecular and Cellular Biology*, 28(4), 1207–1217. doi:10.1128/mcb.01069-07.
- Erkina, T. Y., Zou, Y., Freeling, S., Vorobyev, V. I. ve Erkine, A. M. (2010). “Functional interplay between chromatin remodeling complexes RSC, SWI/SNF and ISWI in regulation of yeast heat shock genes”. *Nucleic Acids Research*, 38(5), 1441–1449. doi:10.1093/nar/gkp1130.

- Espinola Lopez, J. M., ve Tan, S. (2020). “The Ada2/Ada3/Gcn5/Sgf29 histone acetyltransferase module”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 194629. doi:10.1016/j.bbagr.2020.194629.
- Foster, A. J., Jenkinson, J. M. ve Talbot, N. J. (2003). “Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*”. *The EMBO Journal*, 22(2), 225-235.
- Garmendia-Torres, C., Goldbeter, A. ve Jacquet, M. (2007). “Nucleocytoplasmic oscillations of the yeast transcription factor Msn2: evidence for periodic PKA activation”. *Current Biology*, 17(12), 1044-1049.
- Georgakopoulos, T. ve Thireos, G. (1992). “Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription”. *The EMBO Journal*, 11(11), 4145-4152.
- 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*, 274(5287), 546–567. doi:10.1126/science.274.5287.546.
- González, A., ve Hall, M. N. (2017). “Nutrient sensing and TOR signaling in yeast and mammals”. *The EMBO Journal*, 36(4), 397–408. doi:10.15252/embj.201696010.
- Görner, W., Durchschlag, E., Martinez-Pastor, M. T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., Ruis, H. ve Schüller, C. (1998). “Nuclear localization of the C₂H₂ zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity”. *Genes & Development*, 12(4), 586-597.
- Grant, P. A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S. M., Brownell, J. E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, T. C., Winston, F., Berger, S. L. ve Workman, J. L. (1997). “Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex”. *Genes & Development*, 11(13), 1640–1650. doi:10.1101/gad.11.13.1640.
- Hałasa, M., Wawruszak, A., Przybyszewska, A., Jaruga, A., Guz, M., Kałafut, J., Stepulak, A. ve Cybulski, M. (2019). “H3K18Ac as a marker of cancer progression and potential target of anti-cancer therapy”. *Cells*, 8(5), 485. doi:10.3390/cells8050485.

- Helmlinger, D., ve Tora, L. (2017). “Sharing the SAGA”. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(11), 850–861. doi:10.1016/j.tibs.2017.09.001.
- Hinnebusch, A. G. (2005). “Translational regulation of Gcn4 and the general amino acid control of yeast”. *Annual Review of Microbiology*, 59(1), 407–450. doi:10.1146/annurev.micro.59.0318.
- Hohmann, S., Bell, W., Neves, M. J., Valckx, D. ve Thevelein, J. M. (1996). “Evidence for trehalose-6-phosphate-dependent and-independent mechanisms in the control of sugar influx into yeast glycolysis”. *Molecular Microbiology*, 20(5), 981-991.
- Holstege, F. C., Jennings, E. G., Wyrick, J. J., Lee, T. I., Hengartner, C. J., Green, M. R., Golub, T. R., Lander, E. S. ve Young, R. A. (1998). “Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome”. *Cell*, 95(5), 717–728. doi:10.1016/s0092-8674(00)81641-4.
- Huang, B., Zhong, D., Zhu, J., An, Y., Gao, M., Zhu, S., Dang W., Wang X., Yang, B. ve Xie, Z. (2020). “Inhibition of histone acetyltransferase GCN5 extends lifespan in both yeast and human cell lines”. *Aging Cell*. doi:10.1111/ace.13129.
- Huber, A., French, S. L., Tekotte, H., Yerlikaya, S., Stahl, M., Perepelkina, M. P., Tyers, M., Rougemont, J., Beyer, A, L. ve Loewith, R. (2011). “Sch9 regulates ribosome biogenesis via Stb3, Dot6 and Tod6 and the histone deacetylase complex RPD3L”. *The EMBO Journal*, 30(15), 3052-3064.
- Islam, A., Turner, E. L., Menzel, J., Malo, M. E. ve Harkness, T. A. (2011). “Antagonistic Gcn5-Hda1 interactions revealed by mutations to the anaphase promoting complex in yeast”. *Cell Division*, 6(1), 1-16.
- Jacinto, E. ve Lorberg, A. (2008). “TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals”. *Biochemical Journal*, 410(1), 19–37. doi:10.1042/bj20071518.
- Jacquet, M., Renault, G., Lallet, S., De Mey, J. ve Goldbeter, A. (2003). “Oscillatory nucleocytoplasmic shuttling of the general stress response transcriptional activators Msn2 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*”. *The Journal of Cell Biology*, 161(3), 497-505.

- Jules, M., Guillou, V., Francois, J., ve Parrou, J.-L. (2004). “Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 2771–2778. doi:10.1128/aem.70.5.2771-2778.2004.
- Koutelou, E., Hirsch, C. L., ve Dent, S. Y. (2010). “Multiple faces of the SAGA complex”. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(3), 374–382. doi:10.1016/j.ceb.2010.03.005.
- Kuo, M.-H., Brownell, J. E., Sobel, R. E., Ranalli, T. A., Cook, R. G., Edmondson, D. G., Roth, S. Y. ve Allis, C. D. (1996). “Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines”. *Nature*, 383(6597), 269–272. doi:10.1038/383269a0.
- Kuo, M.-H., vom Baur, E., Struhl, K., ve Allis, C. D. (2000). “Gcn4 activator targets Gcn5 histone acetyltransferase to specific promoters independently of transcription”. *Molecular Cell*, 6(6), 1309–1320. doi:10.1016/s1097-2765(00)00129-5.
- Lee, J., Moir, R. D. ve Willis, I. M. (2009). “Regulation of RNA polymerase III transcription involves *SCH9*-dependent and *SCH9*-independent branches of the target of rapamycin (TOR) pathway”. *Journal of Biological Chemistry*, 284(19), 12604–12608.
- Li, M. W. ve Lam, H. M. (2008). “Searching for nitrogen sensing systems in higher plants. Dynamic Soil”, *Dynamic Plant*, 2(1), 13–22.
- Li, S., ve Shogren-Knaak, M. A. (2009). “The gcn5 bromodomain of the saga complex facilitates cooperative and cross-tail acetylation of nucleosomes”. *Journal of Biological Chemistry*, 284(14), 9411–9417. doi:10.1074/jbc.m809617200.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, 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. doi:10.1016/s1097-2765(02)00636-6.
- Lomvardas, S., ve Thanos, D. (2002). “Opening chromatin”. *Molecular Cell*, 9(2), 209–211. doi:10.1016/s1097-2765(02)00463-x.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. ve Randall, R.J. (1951). “Protein measurement with the folin Phenol reagent”. *J Biol Chem.*, 193(1), 265–275.
- Lu, M., Liu, S., Sangaiah, A. K., Zhou, Y., Pan, Z. ve Zuo, Y. (2018). “Nucleosome positioning with fractal entropy increment of diversity in telemedicine”. *IEEE Access*, 6, 33451–33459. doi:10.1109/access.2017.2779850.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., ve Richmond, T. J. (1997). “Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution”. *Nature*, 389(6648), 251–260. doi:10.1038/38444.
- Luke, M. M., Della Seta, F., Di Como, C. J., Sugimoto, H., Kobayashi, R. ve Arndt, K. T. (1996). “The SAP, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase”. *Molecular and Cellular Biology*, 16(6), 2744-2755.
- Magasanik, B. ve Kaiser, C. A. (2002). “Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Gene*, 290(1-2), 1–18. doi:10.1016/s0378-1119(02)00558-9.
- Maicas, S., Guirao-Abad, J. P., ve Argüelles, J.-C. (2016). “Yeast trehalases: Two enzymes, one catalytic mission”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1860(10), 2249–2254. doi:10.1016/j.bbagen.2016.04.020.
- Mohler, K., Mann, R., Kyle, A., Reynolds, N., ve Ibbá, M. (2017). “Aminoacyl-tRNA quality control is required for efficient activation of the TOR pathway regulator Gln3p”. *RNA Biology*, 15(4-5), 594–603. doi:10.1080/15476286.2017.1379635.
- Natarajan, K., Meyer, M. R., Jackson, B. M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A. G., ve Marton, M. J. (2001). “Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast”. *Molecular and Cellular Biology*, 21(13), 4347–4368. doi:10.1128/mcb.21.13.4347-4368.2001.
- Neigeborn, L. ve Carlson, M. (1984). “Genes affecting the regulation of *SUC2* gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Genetics*, 108(4), 845-858.
- Northcote, D. H. (1953). “The molecular structure and shape of yeast glycogen”. *Biochemical Journal*, 53(3), 348–352. doi:10.1042/bj0530348.

- Oliphant, A. R., Brandl, C. J., ve Struhl, K. (1989). “Defining the sequence specificity of DNA-binding proteins by selecting binding sites from random-sequence oligonucleotides: analysis of yeast *GCN4* protein”. *Molecular and Cellular Biology*, 9(7), 2944-2949.
- Parrou J.L. ve François J. (1997). “A simplified procedure for an rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells”. *Analytical Biochemistry*, 248: 186- 188.
- Parrou, J. L., Enjalbert, B., Plourde, L., Bauche, A., Gonzalez, B. ve François, J. (1999). “Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Yeast*, 15(3), 191-203.
- Parrou, J., Jules, M., Beltran, G., Ve Francois, J. (2005). “Acid trehalase in yeasts and filamentous fungi: Localization, regulation and physiological function”. *FEMS Yeast Research*, 5(6-7), 503–511. doi:10.1016/j.femsyr.2005.01.002.
- Parthun, M. R. (2007). “Hat1: the emerging cellular roles of a type B histone acetyltransferase”. *Oncogene*, 26(37), 5319–5328. doi:10.1038/sj.onc.1210602.
- Pedruzzi, I. (2000). “*Saccharomyces cerevisiae* Ras/cAMP pathway controls post-diauxic shift element-dependent transcription through the zinc finger protein Gis1”. *The EMBO Journal*, 19(11), 2569–2579. doi:10.1093/emboj/19.11.2569.
- 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.
- Pérez-Martín, J. (1999). “Chromatin and transcription in *Saccharomyces cerevisiae*”. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(4), 503–523. doi:10.1111/j.1574-6976.1999.tb00410.x.
- Pfanzagl, V., Görner, W., Radolf, M., Parich, A., Schuhmacher, R., Strauss, J., Reiter, W., Tansey, W. ve Schüller, C. (2018). “A constitutive active allele of the transcription factor Msn2 mimicking low PKA activity dictates metabolic remodeling in yeast”. *Molecular Biology of the Cell*, 29(23), 2848-2862.

- Proft, M. ve Struhl, K. (2002). “Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress”. *Molecular Cell*, 9(6), 1307–1317. doi:10.1016/s1097-2765(02)00557-9.
- Rawal, Y., Chereji, R. V., Valabhoju, V., Qiu, H., Ocampo, J., Clark, D. J. ve Hinnebusch, A. G. (2018). “Gcn4 binding in coding regions can activate internal and canonical 5' promoters in yeast”. *Molecular Cell*, 70(2), 297-311.
- Reinke, A., Anderson, S., McCaffery, J. M., Yates, J., 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*”. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 14752–14762. doi:10.1074/jbc.m313062200.
- Ricci, A. R., Genereaux, J. ve Brandl, C. J. (2002). “Components of the SAGA histone acetyltransferase complex are required for repressed transcription of *ARG1* in rich medium”. *Molecular and Cellular Biology*, 22(12), 4033–4042. doi:10.1128/mcb.22.12.4033-4042.2002.
- Rodríguez-Navarro, S. (2009). “Insights into SAGA function during gene expression”. *EMBO Reports*, 10(8), 843–850. doi:10.1038/embor.2009.168.
- Rose M.D., Winston F. ve Heiter P. (1990). “Methods in yeast genetics”. *A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press Books.
- Sadakierska-Chudy, A., ve Filip, M. (2014). “A comprehensive view of the epigenetic landscape. Part II: histone post-translational modification, nucleosome level, and chromatin regulation by ncRNAs”. *Neurotoxicity Research*, 27(2), 172–197. doi:10.1007/s12640-014-9508-6.
- Sadeh, A., Movshovich, N., Volokh, M., Gheber, L. ve Aharoni, A. (2011). “Fine-tuning of the Msn2/4-mediated yeast stress responses as revealed by systematic deletion of Msn2/4 partners”. *Molecular Biology of the Cell*, 22(17), 3127-3138.
- Shen, Y., Wei, W., ve Zhou, D.-X. (2015). “Histone acetylation enzymes coordinate metabolism and gene expression”. *Trends in Plant Science*, 20(10), 614–621. doi:10.1016/j.tplants.2015.07.005.

- Shen, Z. J., Postnikoff, S. ve Tyler, J. K. (2019). “Is Gcn4-induced autophagy the ultimate downstream mechanism by which hormesis extends yeast replicative lifespan?”. *Current Genetics*, 65(3), 717-720.
- Sherman, F. (2002). “Getting started with yeast”. *Methods in Enzymology*, 3–41. doi:10.1016/s0076-6879(02)50954-x
- Silljé, H. H. W., Paalman, J. W. G., ter Schure, E. G., Olsthoorn, S. Q. B., Verkleij, A. J., Boonstra, J., ve Verrips, C. T. (1999). “Function of Trehalose and Glycogen in Cell Cycle Progression and Cell Viability in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Journal of Bacteriology*, 181(2), 396–400. doi:10.1128/jb.181.2.396-400.1999
- Smith, C. L., Horowitz-Scherer, R., Flanagan, J. F., Woodcock, C. L. ve Peterson, C. L. (2003). “Structural analysis of the yeast SWI/SNF chromatin remodeling complex”. *Nature Structural Biology*, 10(2), 141–145. doi:10.1038/nsb888.
- Staschke, K. A., Dey, S., Zaborske, J. M., Palam, L. R., McClintick, J. N., Pan, T., Edenberg, H. J. ve Wek, R. C. (2010). “Integration of general amino acid control and Target of Rapamycin (TOR) regulatory pathways in nitrogen assimilation in yeast”. *Journal of Biological Chemistry*, 285(22), 16893–16911. doi:10.1074/jbc.m110.121947.
- Sterner, D. E., Nathan, D., Reindle, A., Johnson, E. S. ve Berger, S. L. (2006). “Sumoylation of the yeast Gcn5 protein”. *Biochemistry*, 45(3), 1035–1042. doi:10.1021/bi051624q.
- Stewart, G. G. (2014). “SACCHAROMYCES / *Saccharomyces cerevisiae*”. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 309–315. doi:10.1016/b978-0-12-384730-0.00292-5
- Struhl, K. (1998). “Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms”. *Genes & Development*, 12(5), 599–606. doi:10.1101/gad.12.5.599.
- Sunnarborg, W. S., Miller, S. P., Unnikrishnan, I. ve LaPorte, D. C. (2001). “Expression of the yeast glycogen phosphorylase gene is regulated by stress-response elements and by the HOG MAP kinase pathway”. *Yeast*, 18(16), 1505-1514.
- 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.

- Tanner, K. G., Trievel, R. C., Kuo, M.-H., Howard, R. M., Berger, S. L., Allis, C. D., Marmorstein, R. ve Denu, J. M. (1999). “Catalytic mechanism and function of invariant glutamic acid 173 from the histone acetyltransferase *GCN5* transcriptional coactivator”. *Journal of Biological Chemistry*, 274(26), 18157–18160. doi:10.1074/jbc.274.26.18157.
- Tyagi, M., Imam, N., Verma, K., ve Patel, A. K. (2016). “Chromatin remodelers: We are the drivers!!”. *Nucleus*, 7(4), 388–404. doi:10.1080/19491034.2016.1211217.
- Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G., Riezman, H., Broach, J. R., Virgilio, C., Hall, M. N. ve Loewith, R. (2007). “Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Molecular Cell*, 26(5), 663–674. doi:10.1016/j.molcel.2007.04.020.
- Utley, R. T., Ikeda, K., Grant, P. A., Côté, J., Steger, D. J., Eberharter, A., John, S. ve Workman, J. L. (1998). “Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes”. *Nature*, 394(6692), 498–502. doi:10.1038/28886.
- Voorst, V., F., Houghton-Larsen, J., Jønson, L., Kielland-Brandt, M. C. ve Brandt, A. (2006). “Genome-wide identification of genes required for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress”. *Yeast*, 23(5), 351–359. doi:10.1002/yea.1359.
- Wagner, G., Lin, Y., Fletcher, C. M., Zhou, J., ve Allis, C. D. (1999). “Solution structure of the catalytic domain of *GCN5* histone acetyltransferase bound to coenzyme A” *Nature*, 400(6739), 86–89. doi:10.1038/21922.
- Wanke, V., Cameroni, E., Uotila, A., Piccolis, M., Urban, J., Loewith, R. ve De Virgilio, C. (2008). “Caffeine extends yeast lifespan by targeting TORC1”. *Molecular Microbiology*, 69(1), 277–285. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06292.x.
- 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.
- Wilson, B. G., ve Roberts, C. W. M. (2011). “SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer”. *Nature Reviews Cancer*, 11(7), 481–492. doi:10.1038/nrc3068.

- Wilson, W. A., Roach, P. J., Montero, M., Baroja-Fernández, E., Muñoz, F. J., Eydallin, G., Viale, A. M. ve Pozueta-Romero, J. (2010). “Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria”. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 952-985.
- Winderickx, J., de Winde, J. H., Crauwels, M., Hino, A., Hohmann, S., Van Dijck, P. ve Thevelein, J. M. (1996). “Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control?”. *Molecular and General Genetics MGG*, 252(4), 470–482. doi:10.1007/bf02173013.
- Wong, E. D., Karra, K., Hitz, B. C., Hong, E. L., ve Cherry, J. M. (2013). “The yeast genome app: the *Saccharomyces* Genome Database at your fingertips”. *Database*, 2013. doi:10.1093/database/bat004.
- Woodage, T., Basrai, M. A., Baxevanis, A. D., Hieter, P., ve Collins, F. S. (1997). “Characterization of the CHD family of proteins”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(21), 11472–11477. doi:10.1073/pnas.94.21.11472.
- Wu, J. (2000). “25 years after the nucleosome model: Chromatin modifications”. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(12), 619–623. doi:10.1016/s0968-0004(00)01718-7.
- Yang, X.-J., ve Seto, E. (2007). “HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention”. *Oncogene*, 26(37), 5310–5318. doi:10.1038/sj.onc.1210599.
- Yu, R., Cao, X., Sun, L., Zhu, J., Wasko, B. M., Liu, W., Jo, M. C., Qin, L., Kaeberlein, M., Han, Z., ve Dang, W. (2021). “Inactivating histone deacetylase HDA promotes longevity by mobilizing trehalose metabolism”. *Nature Communications*, 12(1). doi:10.1038/s41467-021-22257-2.
- Zhang, W., Du, G., Zhou, J., ve Chen, J. (2018). “Regulation of sensing, transportation, and catabolism of nitrogen sources in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82(1), e00040–17. doi:10.1128/mnbr.00040-17.
- Zhong, Y., Kanagaratham, C., ve Radzioch, D. (2013). “Chromatin remodelling during host-bacterial pathogen interaction”. *Chromatin Remodelling*. doi:10.5772/55977.