



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SACCHAROMYCES CEREVISIAE MAYA TÜRÜNDE *SIR2* HİSTON
DEASETİLAZ GENİNİN *NTH1* VE *TPS1* GEN
EKSPRESYONLARINA ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇAĞLA ÇAKALOĞLU

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 *SIR2* HİSTON
DEASETİLAZ GENİNİN *NTH1* VE *TPS1* GEN
EKSPRESYONLARINA ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇAĞLA ÇAKALOĞLU

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi TÜLAY TURGUT GENÇ

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.

ÇAĞLA ÇAKALOĞLU

28/01/2022

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca her daim yanımda olan, karşılaştığım her sorunda yol gösteren, ilgi, alaka ve anlayışı ile her zaman destekleyen saygı değer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Tülay TURGUT GENÇ'e,

Tez çalışmamda kullandığım plazmitlerin teminini sağlayan Prof. Dr. Jean M. François'e,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimiyle destek olan laboratuvar arkadaşım ve hocam sayın Melih GÜNAY'a,

Lisans ve yüksek lisans öğrenciliğim boyunca manevi desteğini esirgemeyen saygı değer hocam Prof. Dr. Cüneyt AKI'ya, manevi destekleri ile her daim beni motive eden arkadaşlarım Mümin SARGIN, Berrin SARGIN, Gülsüm AKKUŞ, Pınar İNAN, Seranay TÜRKDOĞAN, Göksenin BOZ BÜRGE, Çetin BÜRGE ve Ayşin DİNLER'e,

Sadece tez çalışma süresince değil hayatımın her anında, maddi manevi her anlamda yanımda olan, her adımda beni destekleyen dayım Faruk ÇALIŞKAN ile eşi yengem Leman ÇALIŞKAN, kuzenim Levent ÇAKALOĞLU, annem Nazen ÇALIŞKAN ÇAKALOĞLU, babam İbrahim ÇAKALOĞLU ve abim Çağrı ÇAKALOĞLU'NA sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çağla ÇAKALOĞLU
Çanakkale, Ocak 2022

ÖZET

SACCHAROMYCES CEREVISIAE MAYA TÜRÜNDE SIR2 HİSTON DEASETİLİZ GENİNİN NTH1 VE TPS1 GEN EKSPRESYONLARINA ETKİSİ

Çağla ÇAKALOĞLU

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr.Öğr. Tülay TURGUT GENÇ

28/01/2022, 52

Trehaloz ve glikojen maya hücreleri tarafından kullanılan iki önemli depo karbonhidratıdır. *Saccharomyces cerevisiae* maya türü olumsuz çevre koşullarında biriktirdiği trehaloz ve glikojen moleküllerini ortam koşulları normale döndüğünde hızlıca hidroliz eder. Trehaloz sentezi TPS enzim kompleksi tarafından gerçekleştirilirken, yıkımı nötral trehalaz enzimi tarafından sağlanır. *TPS1* ve *NTH1* genlerinin ekspresyonu farklı metabolik yollar üzerinden koordineli olarak kontrol edilmektedir. Farklı stres ortamlarında her iki genin de aktivitesi artmaktadır. *NTH1* ve *TPS1* genlerinin promotor bölgesinde yer alan STRE dizileri stres yanıtı oluşturulmasında görevlidir. TOR sinyal yolağı besin açlığında hücrel yanıtın düzenlenmesinde görevlidir. Maya hücrelerinde TOR sinyal yolağının baskılanması Sir2 aktivitesini artırır ve DNA stabilizasyonunu sağlayarak kronolojik yaşam uzunluğunun artmasına neden olur. Maya hücrelerinde yaşlanma ile ilişkili bir gen olan *SIR2* geni bazı stres direnç genlerinin aktivasyonunda rol almaktadır. Yürütülen tez çalışmasında, Sir2 proteininin *NTH1* ve *TPS1* gen ekspresyonuna ve depo karbonhidrat birikimine etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla *NTH1-LacZ* ve *TPS1-LacZ* gen füzyonu içeren yaban tip ve $\Delta sir2$ mutant maya hücrelerinde azot açlığı ile oluşturulan stres koşullarında *NTH1* ve *TPS1* genlerinin promotor aktivasyonları belirlendi. Ayrıca yaban tip ve $\Delta sir2$ mutant maya hücrelerinde standart üreme koşullarında ve azot açlığında hücre içi trehaloz ve glikojen birikimi enzimatik olarak ölçüldü. Elde edilen sonuçlara göre Sir2 proteininin *NTH1* gen ekspresyonunun susturulmasından sorumlu olduğu belirlendi. *TPS1* geninin Sir2 proteini tarafından aktivasyonu veya baskılanması tamamen çevresel koşullarına bağlı olduğu tespit edildi. Ayrıca hem normal büyüme

koşullarında hem de azot açlığı altında Sir2 proteininin yokluğunda trehaloz ve glikojen birikiminin arttığı belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre, Sir2 proteinin *NTH1* gen ekspresyonunun susturulmasında, *TPS1* gen ekspresyonunun ise ortam koşullarına bağlı olarak düzenlenmesinde görevli olduğu tespit edildi. Sir2 proteini yokluğunda trehaloz ve glikojen birikiminin standart üreme koşullarında ve azot açlığında arttığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Glikojen, Histon deasetilaz, *NTH1*, *SIR2*, *TPS1*, Trehaloz



ABSTRACT

THE EFFECTS OF *SIR2* HISTON DEACETYLASE GENE ON *NTH1* AND *TPS1* GENE EXPRESSIONS IN YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Çağla ÇAKALOĞLU

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Biological Science

Advisor: Assist. Prof. Dr. Tülay TURGUT GENÇ

28/01/2022, 52

Trehalose and glycogen are important storage carbohydrates in yeast cells. *Saccharomyces cerevisiae* rapidly hydrolyzes the stress-accumulated trehalose and glycogen after environmental conditions return to normal. Trehalose synthesis is carried out by the TPS enzyme complex, while it is degraded by the neutral trehalase enzyme. The expression of *TPS1* and *NTH1* genes is coordinately controlled through different metabolic pathways. The activity of both genes increases during variable stress conditions. STRE sequences located in the promoter region of *NTH1* and *TPS1* genes are responsible for the formation of this stress response. The TOR signaling pathway is involved in regulating cellular responses to nutrient starvation. The inactivation of the TOR signaling pathway increases Sir2 activity and provides DNA stabilization, leading to an increase in chronological lifespan. *SIR2* is an aging-related gene in yeast cells and has a significant role in the activation of some stress resistance genes. The aim of this study is to determine the effect of Sir2 protein on *NTH1* and *TPS1* gene expressions and reserve carbohydrate accumulation. For this purpose, promoter activations of *NTH1* and *TPS1* genes were determined in wild type and $\Delta sir2$ mutant yeast cells including *NTH1*-LacZ and *TPS1*-LacZ gene fusion under nitrogen starvation-induced stress conditions. In addition, intracellular trehalose and glycogen accumulations were enzymatically measured in wild-type and $\Delta sir2$ mutant yeast cells under the same conditions. According to the results obtained, it was determined that Sir2 protein is responsible for silencing *NTH1* gene expression. The activation or repression of *TPS1* gene by Sir2 protein was determined to be dependent on environmental conditions. In

addition, it was determined that trehalose and glycogen accumulation increased in the absence of Sir2 protein under both normal growth conditions and nitrogen starvation.

Keywords: Glycogen, Histone deacetylase, *NTH1*, *SIR2*, *TPS1*, Trehalose



İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
JÜRİ ONAY SAYFASI.....	i
ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler.....	1
1.2. Amaç ve Kapsam.....	4

İKİNCİ BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Trehaloz Yapısı ve Önemi.....	5
2.2. Trehaloz Metabolizması.....	6
2.3. TOR Sinyal Sistemi.....	10
2.4. <i>SIR2</i> Gen Yapısı ve Fonksiyonu.....	14

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Maya Suşları.....	16
3.2. Plazmit Amplifikasyonu ve Maya hücrelerine Transformasyonu.....	16

3.4. Maya Suşlarının İnkilenme Sürelerinin Belirlenmesi.....	17
3.5. Transformant Maya Suşlarının Üreme Koşulları.....	18
3.6. Beta-Galaktozidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	18
3.7. Hücre İçi Trehaloz ve Glikojen Miktarının Belirlenmesi.....	19
3.8. İstatiksel Analiz.....	20

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Maya Suşlarının İnkilenme Süreleri ve Spesifik Üreme Oranları.....	21
4.2. Sir2 Proteininin <i>NTH1</i> ve <i>TPS1</i> Gen Ekspresyonlarına Etkisi.....	28
4.3. Sir2 Proteininin Stres Koşullarında <i>NTH1</i> ve <i>TPS1</i> Gen Ekspresyonlarına Etkisi..	32
4.4. Sir2 Proteininin Hücre İçi Trehaloz ve Glikojen Birikimine Etkisi.....	39

BEŞİNCİ BÖLÜM SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1. Sonuç ve Öneriler.....	45
KAYNAKÇA	46
ÖZGEÇMİŞ	I

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Santigrat derece
Δ	Delesyon
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
ATP	Adenozin Trifosfat
bç	Baz çifti
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
cAMP	Halkasal adenozin mono fosfat
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTT	Ditiotreitol
gr	Gram
His	Histidin
HS-DNA	Herring sperm DNA
Kbç	Kilobaz çifti
KCl	Potasyum klorür
kDA	Kilodalton
lac-Z	Beta-Galaktozidaz geni
Leu	Lösin
LiOAc	Lityum asetat
M	Molar
MAT	Mating type
Met	Metiyonin
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
ml	Mililitre
mM	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
ONPG	O-Nitro-fenil-beta-D- galaktosidaz
PEG	Polyetilen glikol
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PMSF	Fenilmetil sülfonil florür
Pro	Prolin
RNA	Ribonükleik asit
Rpm	Dakikada 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
UDP	Uridin di fosfat
Ura	Urasil

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	Yaban tip ve $\Delta sir2$ maya hücrelerinde <i>SUC2</i> promotor aktivasyonu	39



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	<i>S. cerevisiae</i> maya türünün hayat döngüsü	1
Şekil 2	Trehaloz molekülünün yapısı	5
Şekil 3	Trehaloz biyosentezi	7
Şekil 4	<i>S. cerevisiae</i> maya hücrelerinde glikojen biyosentezi	10
Şekil 5	<i>S. cerevisiae</i> maya türünde TORC1 ve TORC2 kompleksi	12
Şekil 6	TOR sinyali ve kalori kısıtlamasının maya replikatif ömrünü düzenlemesi ve Msn2/4 proteinlerin nükleer lokalizasyonu	13
Şekil 7	Yaban tip maya suşunun zamana karşı ölçülen OD ₆₀₀ değerleri	22
Şekil 8	$\Delta sir2$ mutant maya suşunun zamana karşı ölçülen OD ₆₀₀ değerleri	23
Şekil 9	Yaban tip maya suşunun logaritmik üreme grafiği	24
Şekil 10	$\Delta sir2$ mutant maya suşunun logaritmik üreme grafiği	25
Şekil 11	Yaban tip maya suşundaki ikilenme süresi ve spesifik büyüme oranı	26
Şekil 12	$\Delta sir2$ maya suşunun ikilenme süresi ve spesifik büyüme oranını	27
Şekil 13	Yaban tip ve mutant maya hücrelerinde normal üreme koşullarında belirlenen <i>NTH1</i> ve <i>TPS1</i> promotor aktivasyonu	30
Şekil 14	Sir2 proteinin varlığında <i>NTH1</i> ve <i>TPS1</i> gen ekspresyon modeli	32
Şekil 15	Yaban tip ve mutant maya hücrelerinde azot açlığında belirlenen <i>NTH1</i> promotor aktivasyonu	34
Şekil 16	Yaban tip ve mutant maya hücrelerinde azot açlığında belirlenen <i>TPS1</i> promotor aktivasyonu	37
Şekil 17	HDA aracılı trehaloz metabolizmasının baskılanması ve bunun maya yaşlanması üzerindeki etkisi	38
Şekil 18	Yaban tip ve $\Delta sir2$ mutant maya hücrelerinin standart üreme koşullarında trehaloz ve glikojen birikimi	42
Şekil 19	Yaban tip ve $\Delta sir2$ mutant maya hücrelerinin azot açlığında trehaloz birikimi	44

Şekil 20

Yaban tip ve *Δsir2* mutant maya hücrelerinin azot açlığında glikojen birikimi

44

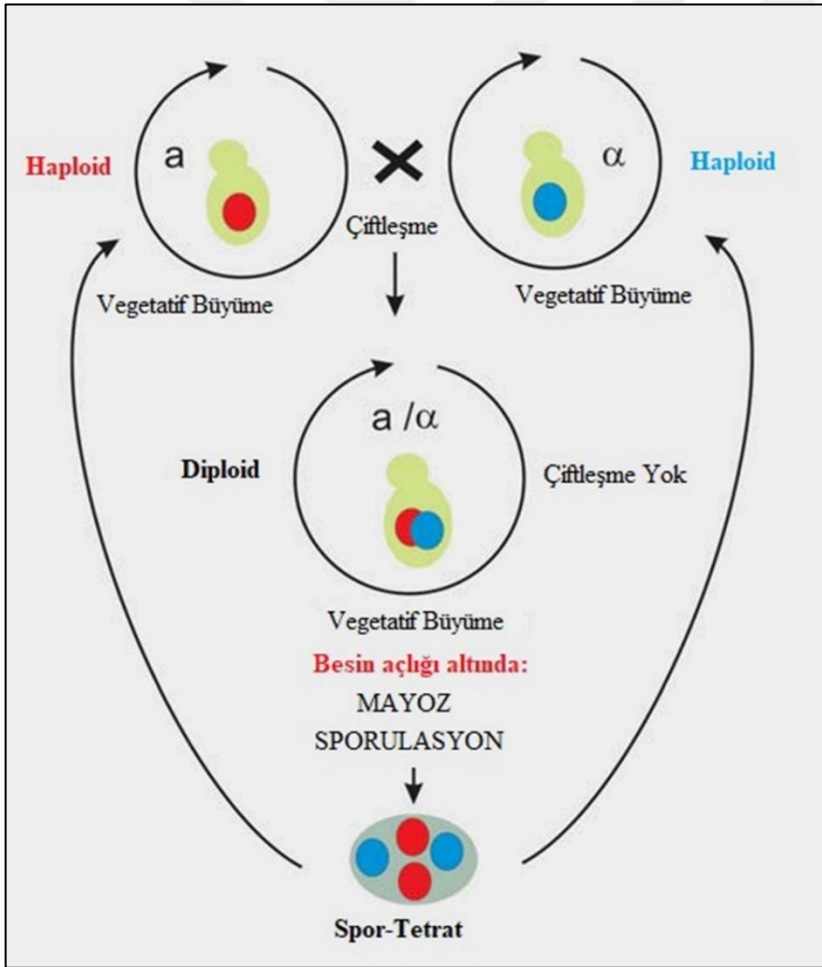


BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Mayalar Fungi alemi içerisinde yer alan tek hücreli ökaryotik mikroorganizmalardır. Maya hücreleri çeşitli metabolik özellikleri içermesi nedeniyle çok geniş bir dağılım göstermektedir. Maya türleri arasında en yaygın olarak bilinen *Saccharomyces cerevisiae* eşeyli olarak çoğalabildiği gibi eşeysiz olarak tomurcuklanarak çoğalabilmektedir. *S. cerevisiae* maya türünde haploid ve diploid olmak üzere iki farklı yaşam döngüsü vardır. Haploid formu mitoz bölünmeyle çoğalırken değişen çevre şartlarına göre diploid yaşam döngüsüne girerek mayoz bölünme yapar ve sporulasyona gider (Şekil 1) (Feldman, 2012).



Şekil 1. *S. cerevisiae* maya türünün hayat döngüsü.

Feldman, 2012

S. cerevisiae maya türü, tüm genom dizilemesi yapılan ilk ökaryotik mikroorganizma olup, içerdiği genler ve genlerin işleyişleri, genetik ve metabolik iz yolları üzerindeki faktörler birçok canlı ile benzerlik göstermektedir. *S. cerevisiae* maya türü hızlı çoğalabilmesi, genetik olarak manipülasyona uygun olması, çevre koşullarının kolaylıkla kontrol edilebilmesi ve klasik genetik çalışmalarında uygulanabilir olması nedeniyle model organizma olarak kullanılmaktadır (Feldman, 2012). *S. cerevisiae* maya türü yaklaşık 12 kbç büyüklüğünde olup, kromozom sayısı 16'dır. Toplamda 6445 gen ve 6002 protein içeren *S. cerevisiae* maya türünde 18 pseudogen ve toplam 325 RNA molekülü (14 rRNA, 112 kodlama yapmayan RNA ve 299 tRNA) içermektedir. Ayrıca, maya hücreleri 2-mikron plazmit, transpozon elementleri (Ty) ve RNA virüsleri içermektedir (Goffeau, 1996).

S. cerevisiae optimum üreme koşullarında trehaloz ve glikojen depo karbonhidratlarını sentezlemektedir. Bu karbonhidratlar maya hücreleri tarafından hem enerji kaynağı olarak kullanılmakta hem de ağır metal, oksidatif stres, osmotik stres ve ısı gibi çeşitli fizyolojik streslere karşı maya hücrelerinin korunmasını sağlamaktadır (Eleutherio vd., 2015). Maya hücreleri tarafından biriktirilen hücre içi trehaloz ve glikojen miktarı, maya hücrelerinin fizyolojik durumlarına ve üreme koşullarına göre farklılık göstermektedir (Eleutherio vd., 2015). Trehaloz molekülünün yapısal olarak β,β -1,1, α,β -1,1 ve α,α -1,1 3 farklı anomeri bulunmaktadır. Glikojen ise çok sayıda glikoz molekülünün α (1-4) ve α (1-6) glikozit bağı ile bağlanmasıyla elde edilen bir depo polisakkarittir. Canlılar tarafından kullanılan trehaloz anomeri α,α -1,1 glikozit bağı içeren trehaloz molekülü olup indirgenmemiş bir disakkarittir (Parrou ve François, 1997; Argüelles vd., 2016). Doğada birçok mikroorganizmada, bazı bitki ve hayvanlarda stres koruyucusu olarak trehaloz sentezlenmektedir (Eleutherio vd., 2015). Farklı çevresel koşullarda biriktirilen trehaloz ve glikojen ortam koşulları normale döndüğünde hızlıca yıkıma uğramaktadır. Trehaloz molekülü, trehaloz fosfat sentaz (TPS) enzim kompleksi tarafından sentezlenir. TPS enzim kompleksi Tps1p, Tps2p, Tps3p ve Tsl1p olmak üzere 4 alt ünitelerden oluşur. Tps1p ve Tps2p kompleksin katalitik alt birimi olarak görevliken, Tps3p ve Tsl1p kompleksin kararlı kalmasını sağlar. Ortam koşulları normale döndüğünde ise trehaloz molekülünün trehalaz enzimi aracılığıyla yıkımı gerçekleşir. *S. cerevisiae* maya türünde *NTH1/2* (Neutral TreHalase 1 ve 2) ve *ATH1* (Acid TreHalase 1) genleri tarafından kodlanan iki farklı trehalaz enzimi yer almaktadır. Nth1p ve Nth2p nötral trehalazları hücre sitoplazmasında bulunmakta ve nötr pH değerinde optimum aktivite göstermektedir. Hücre vakuollerinde yer alan Nth1p

ile Nth2p yaklaşık %77 oranında benzerlik göstermektedir. Asit trehalaz (Ath1p) periplazmik alanda ve vakuol içerisinde yer almaktadır ve pH değeri 4,5 olduğu zaman optimum aktivite göstermektedir. Nth1p hücre içi trehalozun yıkımından sorumlu iken, Ath1p hücre dışı trehalozun yıkımından sorumludur (Argüelles vd., 2016; Eleutherio vd., 2015). *S. cerevisiae* maya hücrelerinde *NTH1* geninin transkripsiyon seviyesi ve Nth1p aktivitesinin farklı çevresel stres koşullarında arttığı bilinmektedir. *NTH1* ve *TPS1* geninin promotor bölgelerinde yer alan STRE (Stress Response Element) dizisi olarak adlandırılan 5'-CCCT-3' nükleotid dizileri gen ekspresyonu için gereklidir (Eleutherio vd., 2015).

S. cerevisiae maya türünde farklı azot kaynaklarının algılanmasında görevli bir dizi sinyal yolağı bulunmaktadır. Bu sinyal yolakları çeşitli regülatör proteinler tarafından kontrol edilir. (Magasanik ve Kaiser, 2002). *S. cerevisiae* maya türü zayıf azot kaynağı olarak prolin, serbest aminoasitler ve üre kullanırken, kuvvetli azot kaynağı olarak ise glutamin ve amonyum tuzlarını kullanmaktadır. Azot kaynağının çeşidi maya hücrelerindeki bazı genlerin aktivasyonunu etkilemektedir (Ter Schure vd., 2000). Azot açlığına maruz bırakılan maya hücrelerinde, hücre döngüsünün G1 evresinde gecikme ve büyümede yavaşlama meydana gelmektedir (Klosinska vd., 2011).

Target of Rapamycin (TOR) sinyal yolağı besin açlığına maruz bırakılan maya hücrelerinde oluşan hücresel yanıtların düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Rohde ve Cardenas, 2003). Glutamin, azot metabolizmasında TOR kompleksinin düzenlenmesinde görevlidir. TOR kompleksi, kuvvetli azot kaynağı içeren ortamda Gln3p, Gat1p, Rtg1p ve Msn2/4p transkripsiyon faktörlerini inaktif olarak kalmasını sağlar. TOR sinyal yolağının inhibisyonu, G1 evresinin uzamasına ve glikojen birikimine neden olmaktadır (Rohde ve Cardenas, 2003). TOR sinyal yolağının inhibisyonu Sir2 aktivitesini artırarak ve rDNA'yı stabilize ederek kronolojik hayat uzunluğunun artmasına neden olmaktadır (Medvedik vd., 2007). Besin açlığı ve kalori kısıtlamasının Ras-PKA ve TOR/Sch9 yolaklarını etkileyerek yaşam uzunluğunu etkilediği bilinmektedir (Santos vd., 2016).

SIR2 (Silent Information Regulator 2) maya hücrelerinde karakterize edilen yaşlanma ile ilişkili gen olup, memelilerde de homoloğu bulunmaktadır (Brachmann, vd., 1995). Sir2 proteini, telomer bölgelerinde transkripsiyonun baskılanmasında, rDNA genlerinin ve çiftleşme-tipi (Mating-type) genlerinin susturulmasında, çift zincirli DNA kırıklarının

tamirinde, hücre döngüsünde ve kromozomların stabilizasyonunda görev almaktadır. *S. cerevisiae* maya türünde Sir2 proteini kronolojik ve replikatif yaşam süresi üzerine etki etmektedir. Maya hücrelerinde tekrarlı rDNA rekombinasyonunu ve ERC (Extrachromosomal rDNA Circle) oluşumunu baskılayarak replikatif yaşam süresini uzatmaktadır (Kaeberlein vd., 2005). Sir2 proteini hücre yaşlanma mekanizması üzerindeki etkisinin yanında stres direnç genlerinin de aktivasyonunda görevli olduğu bilinmektedir (Kang vd., 2014; Nussbaum vd., 2014). *S. cerevisiae* maya hücrelerinde Hsf1p'in glikoz azlığında aktive edildiği ve besin açlığında maya hücrelerinde kalori kısıtlamasına stres yanıtı olarak yaşam süresinin uzamasına dahil olan genlerle ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Hahn ve Thiele, 2004).

1.2. Amaç ve Kapsam

Trehaloz molekülü farklı stres koşullarında biriktirilen ve stres sonrası yıkılarak karbon kaynağı olarak kullanılan bir stres metabolitidir. Trehalozun sentezinden sorumlu olan genlerden *TPS1* geni ve yıkımından sorumlu olan genlerden *NTH1* geninin farklı stres koşullarında Msn2/4 transkripsiyon faktörleri aracılığıyla transkripsiyonlarının arttığı bilinmektedir. TOR sinyal sisteminin baskılanması Sir2 aktivitesinin artmasına ve rDNA stabilizasyonuna neden olarak yaşam uzunluğuna etki etmektedir. TOR sinyal sistemi Msn2/4 transkripsiyon faktörlerinin nükleer lokalizasyonu belirleyerek dolaylı olarak Msn2/4 bağımlı genlerinde transkripsiyonlarını regüle etmektedir. Ayrıca TOR sinyal sistemi Sir2 aktivitesi ve regülasyonunda görev almaktadır. Bu nedenle yürütülen tez çalışmasında, Sir2 proteininin *NTH1* ve *TPS1* gen ekspresyonlarına etkisi ve stres altında trehaloz ve glikojen birikimine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

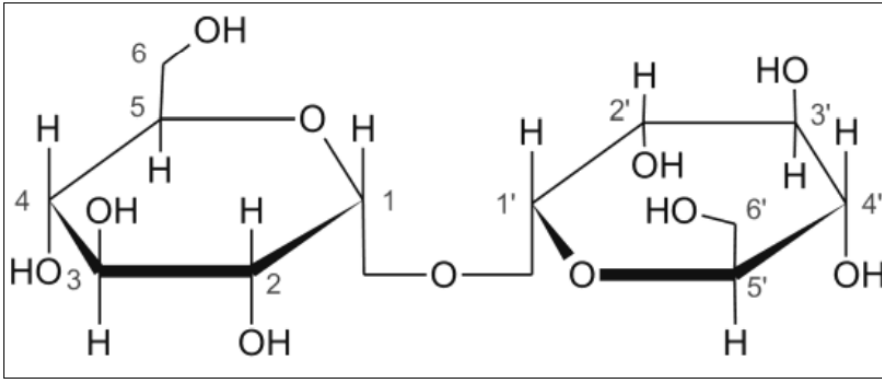
İKİNCİ BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Mayalar tek hücreli ökaryotik canlılar olup, diğer mikroorganizmalar gibi doğada geniş yaşam alanına sahiptir. Mayaların doğal habitatlarında aniden ortaya çıkan çevresel streslere tepki oluşturma şekli ve tepki mekanizmaları oldukça önemlidir. Ayrıca, maya hücreleri bu tip çevresel değişikliklere hızlıca yanıt oluşturabilecek şekilde evrimleşmiştir. Bu çevresel stresler, sıcaklık, basınç, bazı iyonlar, toksik özellikteki maddeler, pH ve besine ulaşabilme gibi fiziksel ya da kimyasal şekilde olabilmektedir (Hohmann ve Meger, 2003). Trehaloz ve glikojen maya hücreleri tarafından depo karbonhidratı olarak kullanılmasının yanında, çevresel stres ve besin açlığı nedeniyle oluşan stres kaynaklı olumsuz şartlardan korunmak için biriktirilmektedir. Hücre içi trehaloz ve glikojen miktarı, maya hücrelerinin fizyolojik durumu, üreme ortamlarına ve aşamalarına göre farklılık göstermektedir (Eleutherio vd., 2015; Parrou vd., 1997).

2.1. Trehaloz Yapısı ve Önemi

S. cerevisiae maya türü, çeşitli çevresel streslere maruz kaldığında trehaloz molekülü sentezleyerek depolamaktadır. Depolanan trehaloz miktarı maya hücrelerinin fizyolojik koşullarına göre farklılık göstermektedir. Trehaloz molekülü, α -1,1 glikozidik bağ içeren indirgenmemiş bir disakkarittir (Şekil 2). Ayrıca, birçok mikroorganizmada bulunmasının yanı sıra bazı bitki ve hayvan hücrelerinde stres metaboliti olarak sentezlenmektedir (Eleutherio vd., 2015). Trehaloz sahip olduğu fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle endüstriyel uygulamalar için oldukça önemli bir moleküldür.



Şekil 2. Trehaloz molekülünün yapısı (α,α -1,1-trehaloz).

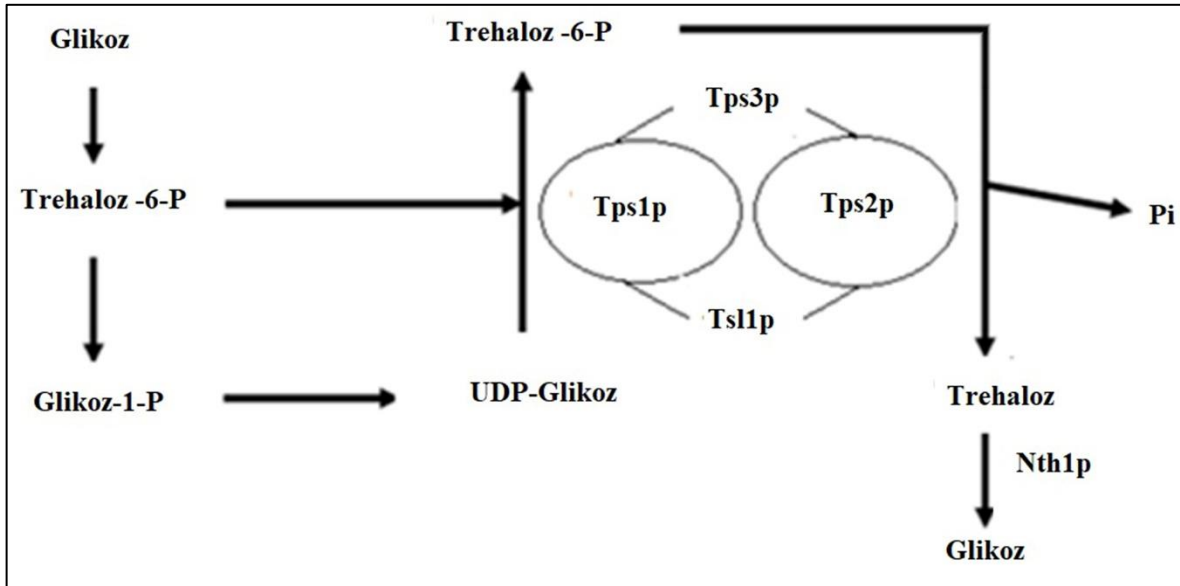
Trehaloz molekülü sukroz, maltoz ve laktozun aksine oksidatif stres ve soğuk stresi gibi iç ve dış streslere karşı koruyucu özelliğe sahiptir (Eldeen vd., 2018). Ayrıca, trehalozun bazı toksinlerin sebep olduğu enflamasyonları önleyebildiği gösterilmiştir. Trehaloz sağlık alanında ise embriyonik hücrelerin ve trombositlerin dondurularak muhafaza edilmesi, kuru göz sendromu ve Huntington hastalığından kaynaklı komplikasyonların azaltılmasında kullanılmaktadır (Eldeen vd., 2018). Ayrıca, yürütülen diğer bir çalışmada ise trehaloz molekülünün Alzheimer hastalığı, frontotemporal demans, ilerleyici supranükleer felç ve kortikobazal dejenerasyon gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklara karşı önleyici ve tedavi edici özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Eldeen vd., 2018).

Farklı mutasyonlar taşıyan *S. cerevisiae* maya hücreleri ile yürütülen çalışmalarda, trehalozun hücreleri ozmotik strese, oksidatif strese, alkol stresine, ısı stresine, donma ve kuraklık streslerine karşı koruduğu rapor edilmiştir. Trehalozun maya hücrelerinde oksidatif hasara karşı temel proteinleri koruyarak hücrelerin hayatta kalma sürelerini ve fermantasyon kapasitesini arttırdığı gösterilmiştir (Eleutherio vd., 2015). Oksidatif stres ve kalori kısıtlamasına maruz bırakılan maya hücrelerinde, trehaloz molekülünün reaktif oksijen türlerinden kaynaklı oksidatif hasara karşı hücreyi koruduğu rapor edilmiştir (Titorenko vd., 2012).

2.2. Trehaloz Metabolizması

Trehaloz, *S. cerevisiae* maya hücrelerinde enerji kaynağı olarak kullanılmasının yanında stres koşullarında sentezlenen ve hücreyi strese karşı koruyan bir moleküldür. Hücre içi trehaloz miktarı mayaların fizyolojik durumlarına, üreme aşamalarına ve çevre koşullarına göre değişkenlik göstermektedir (Eleutherio vd., 2015). *S. cerevisiae* maya hücrelerinde trehaloz molekülü TPS enzim kompleksiyle sentezlenmektedir. TPS enzim kompleksi Tps1p, Tps2p, Tps3p ve Tsl1p alt ünitelerinden oluşmaktadır (Eleutherio vd., 2015; Trevisol vd., 2014). Tps1p ve Tps2p, TPS kompleksinin katalitik alt ünitesi olarak görev yaparken, Tps3p ve Tsl1p düzenleyici alt ünitelerdir ve TPS kompleksinin kararlı bir yapıda kalmasını sağlar (Thevelein ve Hohmann, 1995; Eleutherio vd., 2015). *S. cerevisiae* maya türünde *TPS1* geni ikinci kromozom üzerinde 1488 bç uzunluğunda kodlama bölgesine sahip intron içermeyen bir gendir (Lokus: NC_001134.8, Koordinat: Chr2: 488905-490392, komplement dizi). *TPS1* geni tarafından kodlanan trehaloz fosfat sentetaz enzimi (EC:

2.4.1.15) 495 aminoasit içeren 56 kDa moleküler ağırlığa sahiptir (Eleutherio vd., 2015). *S. cerevisiae* maya hücrelerinde trehaloz biyosentezi iki basamakta gerçekleşir. İlk basamakta Tps1p tarafından üridin-di-fosfat glikoz (UDP-Glikoz) ve glikoz-6-fosfat molekülleri trehaloz-6-fosfata dönüştürülür. Daha sonra, trehaloz fosfat fosfataz aktivitesine sahip Tps2 proteini trehaloz-6-fosfat molekülünü defosforile ederek trehaloz molekülüne çevirir (Şekil 3) (Eleutherio vd., 2015). Hücre içi veya dışı stres olmadığı durumda TPS kompleksinin alt üniteleri ayrı durumda hücrede bulunur ve Tps1 enzim aktivitesi çok düşüktür. Maya hücreleri strese maruz kaldığı zamanda *TSL1* geni TPS kompleksinin bir araya gelmesini sağlar ve aktif TPS kompleksine dönüştürür (Eleutherio vd., 2015; Trevisol vd., 2014).



Şekil 3. Trehaloz biyosentezi.

Petzold vd. 2006'dan modifiye edilmiştir.

Maya hücrelerinde stres koşulları altında biriktirilen trehaloz molekülünün, stres koşulları ortadan kalktığında yıkımı gerçekleştirilir. Trehaloz molekülü trehalaz enzimi (E.C. 3.2.1.28) ile yıkımı gerçekleşir ve iki glikoz molekülü elde edilir. *S. cerevisiae* maya hücrelerinde trehaloz yıkımından sorumlu olan iki tip trehalaz enzimi vardır. Trehaloz yıkımında görevli olan nötral trehalaz enzimi, *NTH1* ve *NTH2* genleri tarafından kodlanırken, asit trehalaz enzimi (*Ath1p*) *ATH1* geni tarafından kodlanır. Nth1 ve Nth2 nötral trehalazları hücre sitoplazmasında bulunmakta ve nötr pH değerinde optimum aktivite göstermektedir. Stres koşullarında biriktirilen trehaloz ağırlıklı olarak Nth1p tarafından hidroliz edilmektedir (Argüelles vd., 2016; Eleutherio vd., 2015). Asit trehalaz (*Ath1p*)

periplazmik alanda ve vakuol içerisinde yer almaktadır ve pH değeri 4,5 olduğu zaman optimum aktivite göstermektedir. Maya hücrelerinin dışarıdan aldıkları hücre dışı trehalozun yıkımından Ath1p sorumludur (Argüelles vd., 2016; Parrou vd., 2005; Eleutherio vd., 2015; Jules vd., 2004).

Stres koşullarında *TPS1* ve *NTH1* genleri birlikte aktive edilir. Ancak Nth1 proteini inaktif durumda olduğundan stres süresince trehaloz birikimi gerçekleşirken trehaloz yıkımı gerçekleşmez (Eleutherio vd., 2015). Ortam koşulları normale döndüğünde ise, stres koşullarında biriktirilen trehaloz molekülü Nth1p tarafından hızlıca yıkılır (Eleutherio vd., 2015). Yapılan çalışmalarda, Tps1p aktivitesinin *TSL1*'in gen ifadesinde meydana gelen değişimlerden etkilendiği gösterilmiştir. PKA tarafından Tps3 proteini fosforile edildiğinde TPS kompleksinin cAMP-PKA yoluyla regüle edildiği gösterilmiştir (Eleutherio vd., 2015; Trevisol vd., 2014). Ayrıca, Tps3p yokluğunda Tps1p baskılanamaz ve aktivitesi devam eder, bu durum Tps3p'nin trehaloz biyosentezinin düzenlenmesinde görevli olduğunu göstermektedir (Trevisol vd., 2014). Tps1p heksoz transpot proteinlerini ve hekzokinazın enzimatik aktivitesini kontrol ederek glikolize giren glikoz seviyesini düzenler (Thevelein, 1992; Eleutherio vd., 2015). Tps1p, hekzokinaz aktivitesini baskılayarak glikozun farklı metabolik yollara geçişine olanak sağlar ve böylece ortam koşullarına göre glikoliz reaksiyonlarının fazla çalışması engellenmiş olur. Ayrıca, $\Delta tps1$ maya hücreleri ile yapılan çalışmalarda Tps1 proteininin, trehalozun yıkımı ile glikolitik yolun regülasyonunda da görevli olduğu gösterilmiştir (Eleutherio vd., 2015). $\Delta tps1$ ve $\Delta tps2$ mutant maya hücreleri ile yapılan çalışmada, hücre içi trehaloz miktarında meydana gelen azalmanın, hücrelerin kronolojik yaşam sürelerini etkilediği gösterilmiştir. Kalori kısıtlamasına bağlı olarak trehaloz miktarında meydana gelen değişim maya hücrelerinin kronolojik yaşam süresini değiştirmektedir (Titorenko, 2012).

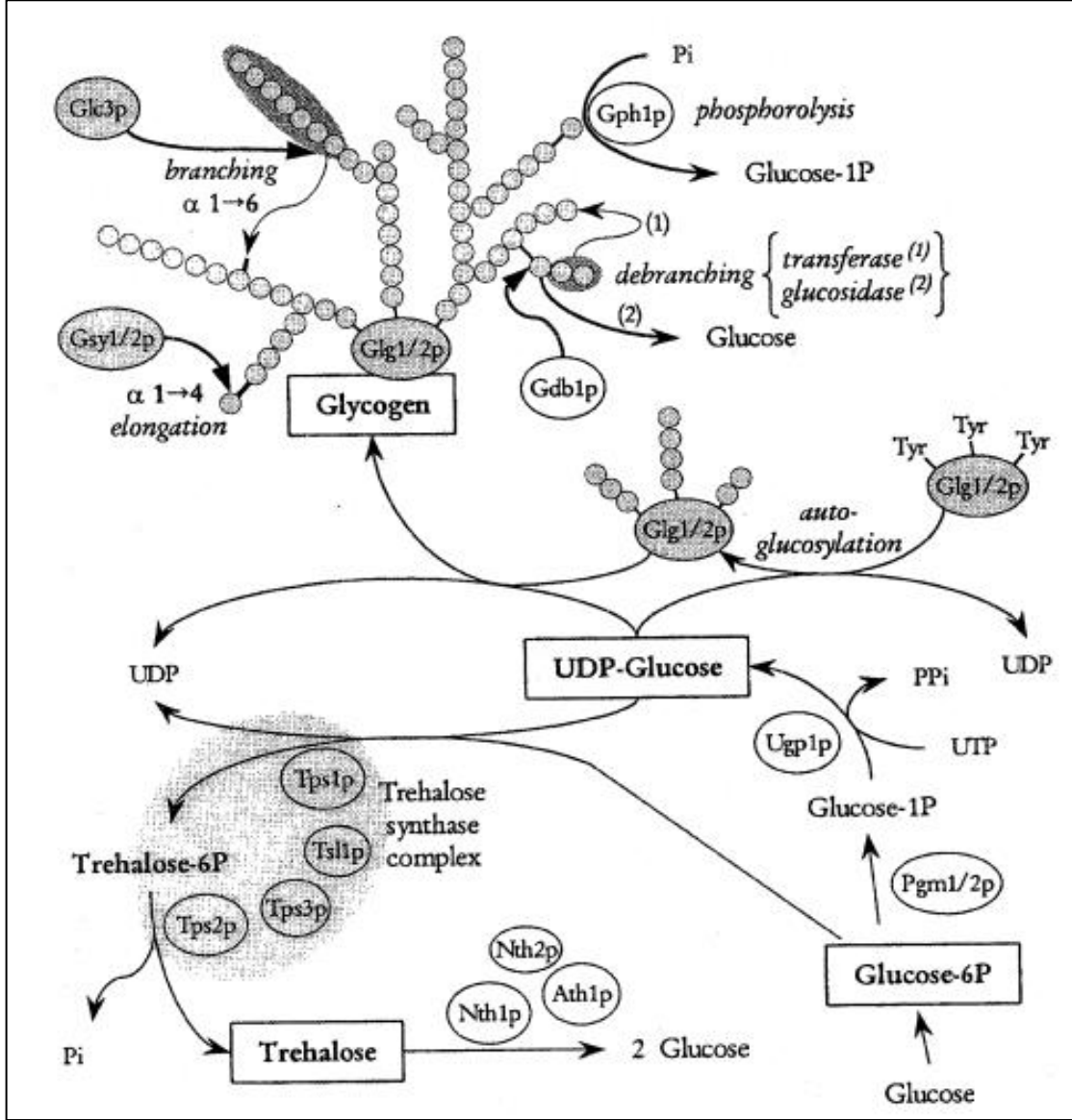
NTH1 (YDR001) geni *S. cerevisiae* maya türünde tek kopya halinde 4. kromozomda bulunmaktadır. *NTH1* geninin kodlama bölgesi 2256 bp uzunluğunda olup, intron içermemektedir. Nth1 proteini ise yaklaşık 85 kilodalton moleküler ağırlığında ve 751 aminoasit içeren bir proteindir (*Saccharomyces* Genome Database, 2022). Nth1p Protein kinaz A (PKA) tarafından fosforlanan fosfoprotein yapısında bir enzimdir. Nth1p regülasyonu fosforilasyon ve defosforilasyon mekanizması ile kontrol edilmektedir (Argüelles vd., 2016). *NTH1* transkripsiyonu ve Nth1 proteininin enzimatik aktivitesi oksidatif

stres, ısı şoku stresi ve metal stresi gibi çevresel stres altında artış göstermektedir (Eleutherio vd., 2015). *NTH1* geninin promotor bölgesinde Msn2 ve Msn4 transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı stres yanıt elementlerinin (STRE; Stress Response Element, 5'-CCCCT-3') bu aktivasyon için gerekli olduğu bilinmektedir (Eleutherio vd., 2015). Çevresel stres koşullarında *NTH1* transkript seviyesinde artış olmasına karşın üretilen Nth1 enzimi inaktif formdadır. Ortam koşulları normale döndüğünde, cAMP bağımlı PKA tarafından Nth1p fosforlanarak aktif hale gelir ve trehaloz molekülü hidroliz edilir (Wera vd., 1999).

Nth1p üzerinde PKA tarafından fosforlanan 17 ser/thr aminoasitinden 8 tanesi (Thr58, Thr135, Thr149, Ser20, Ser21, Ser60, Ser83, Ser475) diğer maya türlerinde de korunmuştur. Nth1p üzerindeki bu bölgelerin fosforlanması trehalaz enzimin bazal seviyedeki aktivasyonu için önemlidir (Wera vd., 1999). Nth1 proteininde Ser20, Ser21, Ser60, Ser83 aminoasitlerinin tümünün protein kinaz A tarafından fosforlanması sonucu aktivasyon gerçekleşmektedir. PKA tarafından Nth1p'nin Ser60 ve Ser83 aminoasitlerinin fosforlanması 14.3.3 protein aracılı aktivasyonu için önemlidir. Ayrıca, fosforlanmış Nth1p'nin 14.3.3 proteini bağımlı aktivasyonunun Ca^{2+} bağımlı Nth1p aktivasyonundan daha önemli olduğu rapor edilmiştir (Eleutherio vd., 2015).

S. cerevisiae maya türünde diğer depo karbonhidrat molekülü glikojendir. Hücre içi glikojen miktarı; sıcaklık stresi, oksidatif stres, ozmotik stres azot ve karbon açlığı gibi farklı stres koşullarında artmaktadır. *S. cerevisiae* maya türünde glikojen biyosentezi çekirdeklenme (nükleasyon), uzama ve dallanma olmak üzere üç basamakta gerçekleşir (François ve Parrou, 2001). Maya hücrelerinde glikojen molekülü *GLG1* (Glycogenin-Like Gene 1) ve *GLG2* (Glycogenin-Like Gene 2) tarafından kodlanan glikojenin ve *GSY2* (Glycogen SYNthase 2) tarafından kodlanan glikojen sentaz enzimi yardımıyla UDP-glikoz üzerinden sentezlenir. *PGM1* (PhosphoGlucoMutase 1) ve *PGM2* (PhosphoGlucoMutase 2) genleri tarafından kodlanan fosfo-glikomutaz enzimi glikoz-6-fosfatı glikoz-1-fosfata dönüştürür. UDP-glikoz pirofosforilaz enzimi üridin-tri-fosfat (UTP) ve glikoz-1-fosfat moleküllerini kullanarak UDP-glikoz sentezlenmesini sağlar. UDP-glikoz molekülü üzerinden glikojenin proteininin glikoziltransferaz aktivitesi ile glikojenine glikoz bağlanır. *GSY1* (Glycogen SYNthase 1) ve *GSY2* tarafından kodlanan glikojen sentetaz enzimleri ve *GLC3* (Glycogen 3) geni tarafından kodlanan α -1,6 dallanma enzimi ile glikojen sentezi gerçekleşir. Glikojen yıkımı ise *GPH1* (Glycogen PHosphorylase 1) ve *GDB1* (Glycogen

DeBranching 1) genleri tarafından kodlanan enzimlerin aktivitesi ile glikoz-1-fosfat ve serbest glikoz molekülleri elde edilir (Şekil 4) (François ve Parrou, 2001).



Şekil 4. *S. cerevisiae* maya hücrelerinde glikojen biyosentezi.

François ve Parrou, 2001

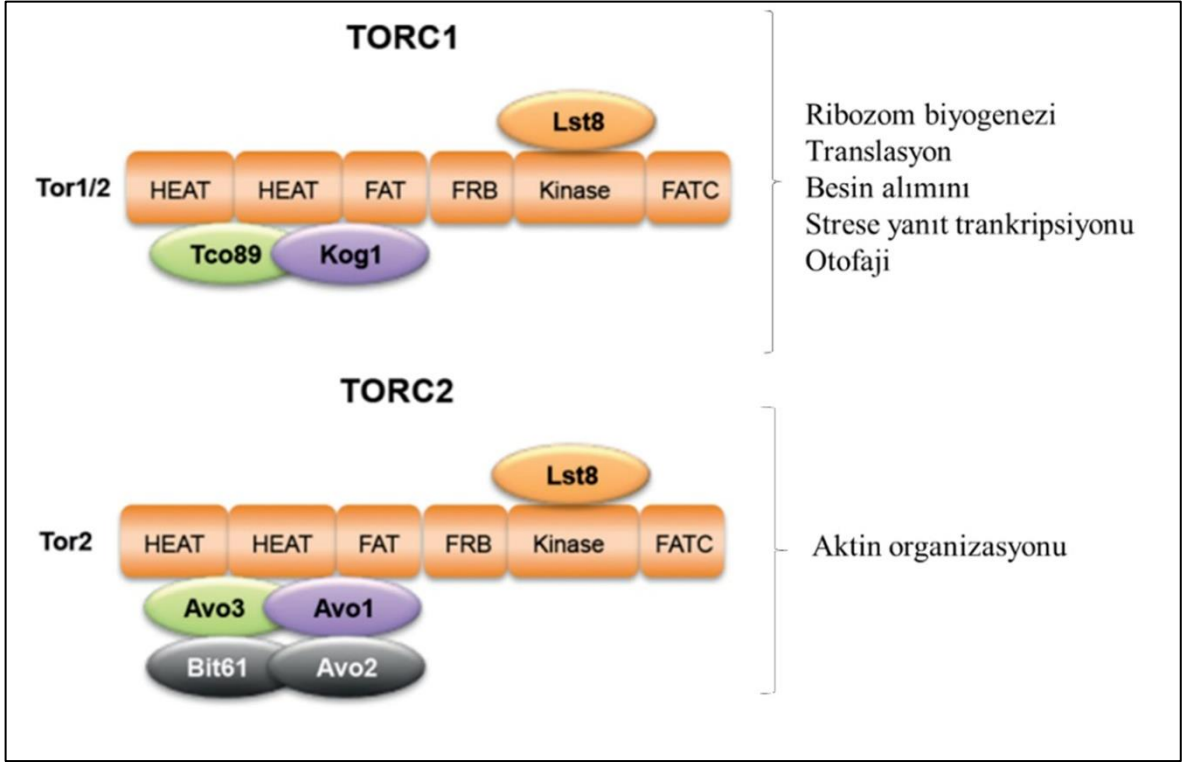
2.3. TOR Sinyal Sistemi

S. cerevisiae maya türünde farklı azot kaynakları bir dizi sinyal yolağı ile algılanır ve hücre içine alınarak kullanılır. Bu sinyal yolağları farklı regülatör proteinlerin aktivitesi ile kontrol edilmektedir (Magasanik ve Kaiser, 2002). *S. cerevisiae* maya türü genel olarak amonyum tuzlarını ve glutamini azot kaynağı olarak kullanırken, azot açlığı durumunda

alternatif azot kaynaklarının kullanımına yönelir. Maya hücreleri tarafından kullanılan alternatif azot kaynakları serbest aminoasitler, prolin ve üredir (Ter Schure vd., 2000). Maya hücreleri glutamin ve amonyum tuzlarını güçlü azot kaynağı olarak kullanırken, prolin ve üre zayıf azot kaynağı olarak kullanılır. Güçlü ve zayıf azot kaynaklarının kullanımı esnasında bazı genlerin ifadelerinde değişiklikler gerçekleşir. Maya hücreleri azot açlığına maruz kaldığında ribozom biyogenezi ve translasyon sürecinde meydana gelen azalmalar nedeniyle hücre siklusunun G1 evresinde uzama ve büyümede yavaşlama gözlenir (Klosinska vd., 2011).

S. cerevisiae maya hücrelerinde hücre büyümesinin kontrolünde ve besin açlığında oluşacak olan hücresel yanıtların düzenlenmesinde TOR sinyal yolağı önem arz etmektedir (Rohde ve Cardenas, 2003). *S. cerevisiae* maya türünde iki farklı TOR kompleksi bulunmaktadır (TORC1 ve TORC2). TORC1 kompleksi (TOR Complex 1) dört alt birimden oluşmaktadır (Kog1p (Kontroller of Growth), Lst8p (Lethal with Sec Thirteen), Tco89p; (Tor Complex One), Tor1p/Tor2p). TORC2 (TOR Complex 2) kompleksi ise Avo1p (Adheres Voraciously to Tor2), Avo2p, Avo3p Tor2p, Bit61p (Binding Partner of Tor2p) ve Lst8p, olmak üzere altı alt birimden oluşur (Şekil 5) (Wullschleger vd., 2006). TORC1 kompleksi rapamisin varlığında inhibe olurken, TORC2 kompleksi rapamisinden etkilenmemektedir. Rapamisin varlığında ya da azot eksikliğinde TORC1 kompleksi baskılanır ve hücre içi stress genleri aktive olarak Nitrogen Discrimination yolağı (NDP) ve Retrograde Response yolağında (RTG) görevli olan genleri aktive eder.

S. cerevisiae maya türünde Tor1p ve Tor2p protein kinaz enzimleri *TOR1* ve *TOR2* genleri tarafından kodlanır. Tor1p ve Tor2p yaklaşık 280 kDa ağırlığında olup amino asit dizileri %67 oranında benzerlik göstermektedir. Tor1 ve Tor2 proteinleri hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve devamlılığında görevlidir. Hücre döngüsü devam ederken Tor2 proteini, hücre iskeleti elemanı olan aktinlerin düzenlenmesinden sorumludur (Schmidt vd., 1996; Wullschleger vd., 2006).

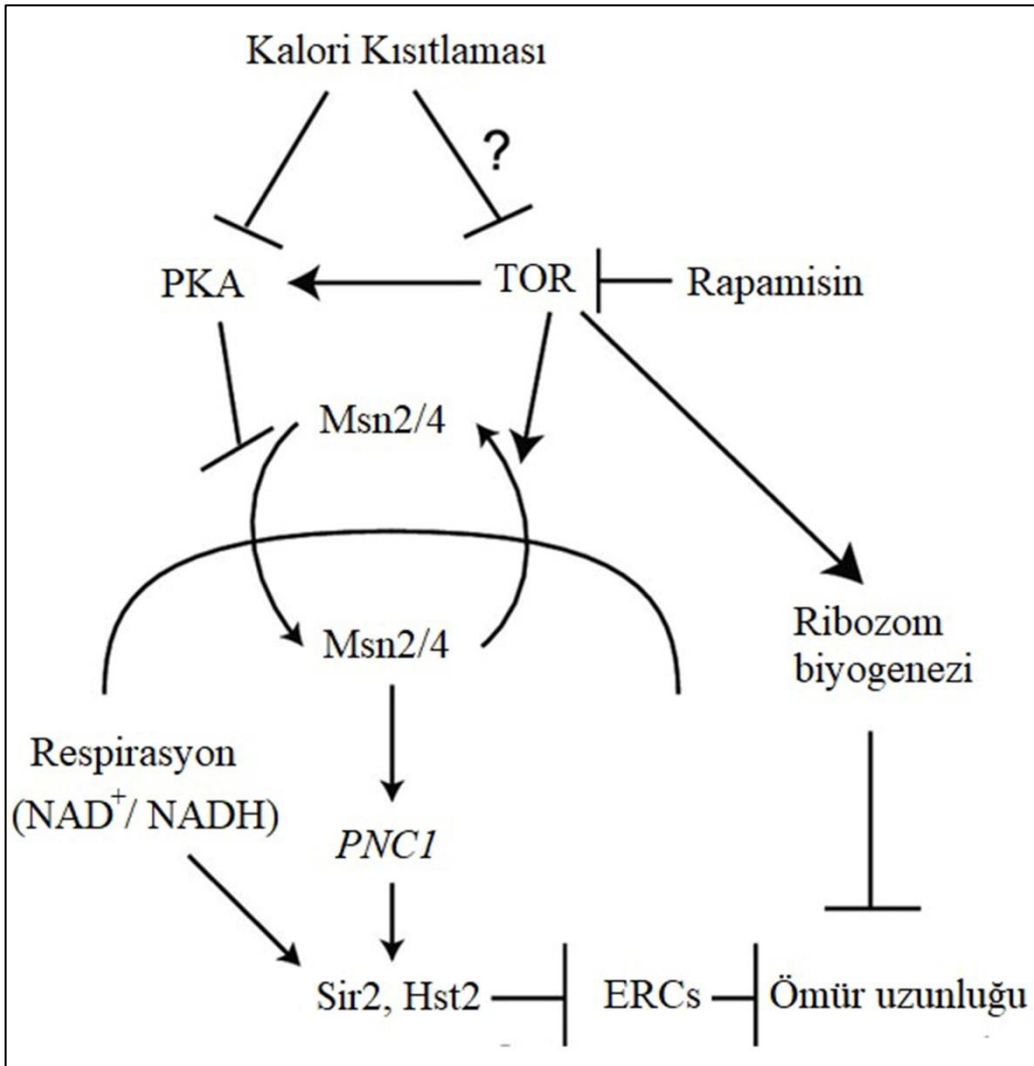


Şekil 5. *S. cerevisiae* maya türünde TORC1 ve TORC2 kompleksi.

Wullschleger vd., 2006'dan modifiye edilmiştir.

Besin açlığına maruz bırakılan mayalarda ve diğer organizmalarda yaşam uzunluğunda artma olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Katewa ve Kapahi, 2010). Kalori kısıtlaması (Caloric restriction, CR), Ras-PKA ve TOR/Sch9 sinyal yollarından gelen sinyalleri azaltarak yaşam uzunluğunu artırmaktadır. Her iki sinyal yolu büyümenin kontrolünde, metabolizmanın regülasyonunda ve besin stresine karşı cevap oluşturulmasında görevli olup birlikte çalışırlar. TOR sinyal yolu cAMP/PKA sinyal iletim sistemi ile ters çalışır (Herman ve Ramachandran, 2011). TOR sinyalinin yaşlanma geciktirici role sahip olduğu yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir (Kaeberlein vd., 2005; Powers vd., 2006; Medvedik vd., 2007). *S. cerevisiae* hücrelerinde, TOR yolagındaki genlerde oluşan mutasyonlar veya maya hücrelerinin rapamisine maruz bırakılması kronolojik hayat uzunluğunun (Chronologic Life Span, CLS) uzamasına neden olmaktadır (Powers vd., 2006). Kuvvetli bir azot kaynağı olan glutamin TOR kompleksinin düzenlenmesinde görevlidir. Glutamin veya başka güçlü azot kaynağının varlığında TOR kompleksi, Gln3p, Gat1p, Rtg1p ve Msn2/4p proteinlerinin pasif olarak kalmasını sağlar. TOR yolagının rapamisin ile inhibisyonu, hücre siklusunun G1 fazının uzamasına, protein sentezinin baskılanmasına, otofajinin artmasına ve glikojen birikiminde artışa neden olmaktadır (Rohde

ve Cardenas, 2003). Ayrıca TOR yolağının inhibisyonu, kalori kısıtlamasında olduğu gibi, Sir2 aktivitesini artırarak ve rDNA stabilizasyonu yaparak kronolojik hayat uzunluğunun artmasına neden olmaktadır (Medvedik vd., 2007). TOR inhibisyonu ve kalori kısıtlamasında Sir2 bağımlı yaşam uzunluğunun artışı, Msn2/4 transkripsiyon faktörlerinin sitoplazmadan nükleusa geçerek *PNC1* (Pyrazinamidase and NiCotinamidase) promotör bölgesinde bulunan STRE dizilerine bağlanarak aktive edilmesiyle gerçekleşmektedir (Şekil 6) (Medvedik vd., 2007).



Şekil 6. TOR Sinyali ve CR'nin Maya Replikatif Ömrünü Düzenlemesi ve Msn2/4 proteinlerinin nükleer lokalizasyonu.

Medvedik vd., 2007

Yapılan çalışmalarda, TOR sinyal yolağının inhibisyonuyla ökaryotik canlılarda yaşlanmanın geciktirilebileceği ve ömrün uzatılabileceği öne sürülmüştür (Vellai, 2003; Medvedik, 2007). TOR sinyal yolağının inhibe edilmesinin, yaşam süresini nasıl etkilediğini ortaya çıkarmak amaçlı yapılan bir çalışmada ise TORC1 kompleksinin baskılanması sonucunda RNA polimeraz II aracılığı ile gerçekleştirilen transkripsiyonun baskılandığı ve rDNA genlerinde histonların deasetilasyona uğradığı tespit edilmiştir (Ha ve Huh, 2010).

2.4. *SIR2* Geninin Yapısı ve Fonksiyonu

Mayalarda en iyi karakterize edilen yaşlanma ile ilişkili olan *SIR2* genidir. Sir2 ilk olarak mayada genleri susturabilen kromatin düzenleyici olarak tanımlanan, sirtuin familyasına ait bir proteindir (Brachmann vd., 1995). Sir2 proteini telomer bölgelerinde transkripsiyonun baskılanmasında, rDNA genlerinin ve çiftleşme-tipi (Mating-type) genlerinin susturulmasında görevlidir. Ayrıca Sir2 proteini çift zincirli DNA kırıklarının tamirinde, hücre döngüsünde ve kromozomların stabilizasyonunda da görevleri vardır. *S. cerevisiae* maya türünde *SIR2* genine ilave olarak, Hst1, Hst2, Hst3 ve Hst4 sirtuin proteinlerini kodlayan 4 gen daha bulunmaktadır. *HST1* (Homolog of SIR Two 1) ve *SIR2* genleri birbirinin paraloğu olup, farklı işlevlere sahiptir. *HST1* aşırı ifade edildiğinde, Mata hücrelerinde *SIR2* gen mutasyonunun etkilerini baskılayabilmektedir (Brachmann vd., 1995). Ayrıca Hst1, Sum1 DNA bağlanma proteini ile birlikte kompleks oluşturarak spesifik bazı genlerin baskılanmasını, NAD⁺ ve tiamin biyosentezini baskılamaktadır. Hst2, sitoplazmada lokalize olup, subtelomerik genlerin ve rDNA genlerinin susturulmasını olumsuz etkilemektedir. Hst3 ve Hst4 proteinleri histon deasetilaz olarak görev yapan diğer sirtuinlerdir ve H3K56 için spesifik olan histon deasetilazlardır. H3K56 deasetilasyonu hücre döngüsünün devamlılığını ve transkripsiyonel olarak genin susturulmasını sağlamaktadır (Brachman vd., 1995; Xie vd., 1999; Li vd., 2010;).

Sir2 proteininin glukoneogenez, oksidatif stres yanıtında ve NF-κB sinyal yollarında görev aldığı belirtilmiştir (Houtkooper vd., 2012; Qin vd., 2017). Sir2 proteininin yokluğunda, etanol alımı ve katabolizmasının artmasından ve stres direnç genlerinin aktivasyonundan dolayı kronolojik yaşam uzunluğunun dramatik olarak azaldığı tespit edilmiştir (Fabrizio vd., 2005). Ayrıca *SIR2* gen mutasyonu taşıyan maya hücrelerinin kronolojik yaşam uzunluğunun ve oksidatif stres direncinin eksponensiyel safhada azaldığı,

post-dioksik ve durağan aşamada ise arttığı rapor edilmiştir (Kang vd., 2014). *S. cerevisiae* maya türünde ısı şoku transkripsiyon faktörü olan Hsf1 proteini çeşitli çevresel streslere karşı yanıt oluşturulmasında görevlidir (Nussbaum vd., 2014). Hsf1 proteini birçok organizmada korunmuş olarak bulunur ve ısı şoku elementlerine (Heat Shock Element-HSE) bağlanarak çalışır. Hsf1p'nin aktive olması ve DNA'ya bağlanmasının gerçekleşmesi için, Sir2 tarafından deasetillenmesi gerekir (Patel, 2016). *S. cerevisiae* maya hücrelerinde, düşük glikoz konsantrasyonunda Hsf1 proteininin aktive edildiği, maya hücrelerinde kalori kısıtlamasına stres yanıtı olarak yaşam süresinin uzamasına dahil olan genlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Hahn ve Thiele, 2004).

NAD⁺ bağımlı histon deasetilaz aktivitesine sahip Sir2 proteininin farklı stres koşullarında görev alarak maya hücrelerinin strese direncini etkilediği gösterilmiştir (Kang vd., 2014). Trehaloz molekülü farklı stres koşullarında biriktirilen ve stres sonrası yıkılarak karbon kaynağı olarak kullanılan bir stres metabolitidir. Trehalozun sentezinden sorumlu olan genlerden *TPS1* geni ve yıkımından sorumlu olan genlerden *NTH1* geninin farklı stres koşullarında Msn2/4 transkripsiyon faktörleri aracılığıyla transkripsiyonlarının arttığı bilinmektedir. TOR sinyal sistemi Msn2/4 transkripsiyon faktörlerinin nükleer lokalizasyonu belirleyerek dolaylı olarak STRE içeren genlerinde transkripsiyonlarını regüle etmektedir. Bu nedenle yürütülen tez çalışmasında daha önce ilişkisi belirlenmemiş Sir2 proteininin *NTH1* ve *TPS1* gen ekspresyonuna etkisi belirlendi. Ayrıca, azot açlığına maruz bırakılan yaban tip ve $\Delta sir2$ mutant maya hücrelerinin trehaloz ve glikojen birikimleri ölçüldü.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Çalışmada Kullanılan Maya Suşları

Tez çalışması kapsamında kullanılan BY4741 maya suşu (MATa; *ura3Δ0*; *leu2Δ0*; *his3Δ1*; *met15Δ0*) ve Y03738 maya suşu (MATa; *ura3Δ0*; *leu2Δ0*; *his3Δ1*; *met15Δ0*; *YDL042C::kanMX4*) *S. cerevisiae* suşları olup EUROSCARF (European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis) koleksiyonundan satın alındı. Genomu tamamen dizilenen haploid *S. cerevisiae* BY4741 maya suşunun metabolik yollarda rol alan genlerinde mutasyon bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmada kontrol maya suşu olarak kullanıldı. Diğer *S. cerevisiae* Y03738 maya suşu ise yaban tip BY4741 maya suşu ile izogenik olup *SIR2* gen mutasyonu taşımaktadır.

3.2. Plazmit Amplifikasyonu ve Maya Hücrelerine Transformasyonu

Araştırmada *NTH1-LacZ*, *TPS1-LacZ* ve *SUC2-LacZ* gen füzyonlarını içeren YEep (Yeast Episomal plasmid) plazmitleri kullanıldı. YEep plazmitleri, *S. cerevisiae* hücrelerinde seçici üreme ortamı koşullarında stabil olarak kalabilmektedir. *NTH1-LacZ* ve *TPS1-LacZ* gen füzyonu barındıran pNL1 plazmitleri Prof. Dr. Jean M. François'dan (Institut National Des Sciences Appliquées, Toulouse, France) temin edilmiştir. *SUC2-LacZ* gen füzyonu ise Tülay TURGUT GENÇ tarafından yürütülen daha önceki çalışmalar esnasında hazırlanmış olup *CYC1-LacZ* gen füzyonunun promotor bölgesi ile *SUC2* geni promotor bölgesi değiştirilmiştir (Türkel vd., 2003). YEep plazmitlerinin yapısında *Escherichia coli* bakterisi hücrelerinde replikasyon için ColE replikasyon orijini ile seleksiyon için ampisiline dirençli olmasını sağlayan beta-laktamaz geni (*BLA*), ve *S. cerevisiae* maya hücrelerinde replikasyon için 2 mikron replikasyon orijini ile seleksiyon için *URA3* (URAcil requiring 3) geni bulunmaktadır. *NTH1-LacZ* gen füzyonunu içeren plazmitte *NTH1* geninin 770 bp uzunluğundaki promotor bölgesi, *TPS1-LacZ* gen füzyonunu içeren plazmitte ise *TPS1* geninin 1000 bp uzunluğundaki promotor bölgesi bulunmakta olup bu bölgelerin gen transkripsiyonunun regülasyonu için gerekli olan tüm kontrol dizilerini içerdiği rapor edilmiştir (Parrou ve François, 1997). Stres ile transkripsiyonu aktive edilmediği bilinen *SUC2* (Sucrose nonfermenting 2) genine ait promotor bölgesini barındıran *SUC2-LacZ* gen

füzyonu çalışmamızda kontrol olarak kullanıldı.

NTH1-LacZ, *TPS1-LacZ* ve *SUC2-LacZ* gen füzyonunu içeren plazmitler MgCl₂-CaCl₂ yöntemi kullanılarak XL1-Blue *E. coli* hücrelerine aktarıldı. Transformant bakteri hücrelerinin ayrıştırılması için TYE^{amp} (Ampisilin: 35 mg/mL) petrilere ekimi yapıldı. TYE^{amp} petrilinde üreme gösteren bakteri hücrelerinden rastgele bir koloni seçilerek NB^{Amp} besin ortamına inoküle edildi. Transformant *E. coli* hücreleri yaklaşık 16-18 saat, 37 °C’de ve 120 rpm/dk hızda çalışan çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Plazmit pürifikasyon kiti (GeneJet Plasmid Kit, #K050-Fermentas) kullanılarak, transformant *E. coli* hücrelerinden *NTH1-LacZ*, *TPS1-LacZ* ve *SUC2-LacZ* gen füzyonunu içeren plazmitler saflaştırıldı. Plazmit pürifikasyonu ile elde edilen plazmitler, 100 µL 1xTE çözeltisinde resuspend edilerek daha sonra kullanılmak üzere -20 °C’de stoklandı.

Çalışmamızda *NTH1-LacZ*, *TPS1-LacZ* ve *SUC2-LacZ* gen füzyonunu içeren plazmitler, yaban tip (BY4741) maya suşuna ve *Δsir2* maya suşuna LiOAc/SS-DNA/PEG metodu kullanılarak transformasyonu yapıldı. Transformasyon sırasında taşıyıcı DNA olarak Herring Sperm DNA (5 µL HS-DNA) kullanıldı. Transformant maya suşlarının seleksiyonu için, maya hücreleri YNBD-HLM (%0,16 Yeast Nitrogen Base + %0,5 Amonyum sülfat + %2 Dekstroz + %0,2 Histidin + %0,3 Lösin + %0,2 Metiyonin + %2 Agar) besi ortamına ekilerek 3-4 gün boyunca 30 °C’de üretildi. Petrilere üreme gösteren transformant maya kolonilerinden bir koloni seçilerek taze YNBD-HLM katı besi yerine aktarıldı ve 3-4 gün 30 °C’de inkübasyona bırakıldı. Transformant *S. cerevisiae* suşlarını içeren petrilere beta-galaktozidaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi için +4 °C’de muhafaza edildi.

3.4. Maya Suşlarının İkilene Sürelerinin Belirlenmesi

Yaban tip (BY4741) ve *Δsir2* mutant (Y03738) *S. cerevisiae* maya suşlarının üreme eğrileri %0,2 urasil içeren YNBD-HLM üreme ortamında belirlendi. Maya hücreleri sıvı kültür ortamında 15 gün boyunca 30 °C sıcaklıkta ve 120 rpm çalkalama ile inkübe edildi. Bu sürenin ilk 2 gününde 2 saatte bir, diğer günlerde 6 saatte bir 1 mL numune alınarak spektrofotometrede OD₆₀₀ değerleri ölçüldü. Çalışmanın sonunda yaban tip ve *Δsir2* mutant maya suşlarının zamana karşı OD₆₀₀ değerine karşılık gelen hücre sayısını içeren üreme

eğrileri (Growth curve) çizildi. Maya hücrelerinin üreme eğrileri kullanılarak ikilenme süreleri (Doubling Time, Dt) ve spesifik üreme oranları (Specific Growth Rate, μ) hesaplandı.

3.5. Transformant Maya Suşlarının Üreme Koşulları

NTH1-LacZ, *TPS1-LacZ* ve *SUC2-LacZ* gen füzyonlarını taşıyan yaban tip ve *Asir2* transformant maya hücreleri 25 mL'lik erlenmayerlerde 5 mL YNBD-HLM sıvı besi ortamında O/N üreme kültürleri 16-18 saat sabit çalkalama ile 30 °C'de inkübe edildi. O/N hücre kültürlerinden yaklaşık OD₆₀₀ değeri 0,2-0,3 olacak şekilde taze kültürler (YNBD-HLM) transformant maya hücreleri aktarıldı ve aynı koşullarda logaritmik faza kadar (OD₆₀₀ değeri yaklaşık 0,6-0,7 aralığında) üretildi. Logaritmik aşamaya gelen hücre kültürlerinden beta-galaktozidaz aktivite tayini için 5 mL, trehaloz ve glikojen tayini için 20 mL hacimde örnekleme yapıldı. Kalan hücre kültürleri 3 eşit kültüre ayrıldı. Birinci grupta yer alan hücreler stres uygulanmadan normal koşullar altında üremeye bırakıldı. İkinci ve üçüncü gruptaki hücreler 5000 rpm hızda +4 °C sıcaklıkta 5 dakika süreyle çöktürüldü. Daha sonra soğuk distile su ile yıkandı ve tekrar çöktürülerek hücre pelleti elde edildi. İkinci gruptaki hücreler amonyum sülfat yerine %0,1 prolin içeren YN (%0,16 Yeast Nitrogen Base + %2 Dekstroz + %0,2 Histidin + %0,3 Lösin + %0,2 Metiyonin) sıvı kültürü ile, üçüncü gruptaki hücreler ise %0,5 amonyum sülfat içeren YNBD-HLM sıvı kültürü ile resuspend edildi. Tüm kültürler sabit çalkalamada 4 saat süreyle 30 °C'de inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda kültürlerden beta-galaktozidaz enzim aktivitesini belirlemek için 5 mL ve trehaloz ve glikojen birikiminin tayini için 20 mL örnek alındı.

3.6. Beta-Galaktozidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Farklı üreme koşullarında üretilen yaban tip ve mutant *S. cerevisiae* transformantları 5000 rpm hızda 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Elde edilen transformant maya hücreleri 1 mL steril suda çözdürülerek yıkandı ve aynı şartlarda yeniden santrifüj edildi. Çöktürülerek toplanan maya hücreleri 200 μ L Breaking Tamponu (100mM Tris (pH 8,0) + %20 Gliserol + 4mM PMSF + 1mM DTT) içinde çözdürüldü ve çözelti üzerine 20 μ L Kloroform ve 20 μ L %0,1 SDS eklenerek geçirgenliği artırılmış hücre lizatları elde edildi. Bu hücre lizatlarından 30 μ L alındı ve 970 μ L Z-Tamponu (40mM NaH₂PO₄ + 60mM

NaHPO₄ + 1mM MgSO₄ +10mM KCl) içeren cam test tüplerine eklendi. Tüpler ısıtıcı bloğa yerleştirildi ve 2 dakika 30 °C’de beklendikten sonra üzerlerine 200 µL ONPG ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Başlangıç zamanı kaydedilen reaksiyon, tüplerde sarı renk oluşumu gözlenene kadar 30 °C’de inkübasyona bırakıldı. Deney tüplerinde sarı renk oluşumu gözlendiği zaman, tüplere 500 µL 1M Na₂CO₃ çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu ve reaksiyonun bittiği süre kaydedildi. Oluşan sarı rengin miktarı spektrofotometrede OD₄₂₀ değerinde okunarak kaydedildi. Hücre lizatlarının toplam protein miktarı Lowry ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak belirlendi (Lowry vd., 1951). Elde edilen hücre lizatlarından 20 µL alınarak 1000 µL Tampon C (9,8 mL Tampon A (%2 Na₂CO₃ + %0,4 NaOH) + 100 µL % 1,56 CuSO₄.5H₂O) içeren cam test tüplerine eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Bu süre sonunda tüplere 100 µL Folin Ciocalteu ‘s Phenol reagent eklenerek 30 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Tüplerde görülen mavi rengin yoğunluğu OD₇₅₀ değerinde spektrofotometrik olarak ölçümü yapıldı ve elde edilen değerler kaydedildi.

3.7. Hücre içi Trehaloz ve Glikojen Miktarının Belirlenmesi

Normal üreme koşullarından ve stres koşullarından alınan yaban tip ve *Asir2* mutant maya hücrelerinin depoladığı trehaloz ve glikojenin miktarı Parrou ve François (1997) tarafından geliştirilen enzimatik tayin yöntemi kullanılarak belirlendi. Farklı üreme şartlarında elde edilen 20 mL maya hücreleri santrifüj ile çöktürülerek toplandı. Soğuk steril distile su ile iki kez yıkandıktan sonra hücrelerin yaş ağırlıkları belirlendi. Hücre lizatının oluşturulabilmesi için hücrelerin üzerine 250 µl 0,25M Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilerek 95 °C’de 2 saat protein inaktivasyonu yapıldı. Hücre lizatının üzerine 150 µl 1M Asetik asit ve 600 µL NaOAc eklenerek pH 5,2 olarak ayarlandı. Maya hücrelerinin hücre içinde biriktirdiği trehaloz ve glikojen miktarını belirlemek için, hazırlanan hücre lizatının yarısına 3mU Trehalaz enzimi (Sigma T-8778) ilave edildi ve 37 °C’de 18 saat inkübe edildi. Hücre lizatının diğer yarısına ise 100 mg α-amiloglikozidaz enzimi (Sigma, A-7420) eklenerek 57 °C’de 18 saat inkübe edildi. Enzimatik reaksiyon sonunda trehalozun ve glikojenin yıkımı ile açığa çıkan glikoz miktarı GOD (Glikoz Oksidaz Peroksidaz) yöntemiyle belirlendi (Goldstein ve Lampen, 1975). GOD enzimi üzerine eklenen hücre lizatları 37 °C’de 15 dk inkübe edildi. Oluşan pembe-kırmızı rengin miktarı spektrofotometrede OD₅₄₆ değerinde ölçüldü. Glikoz standardının verdiği OD₅₄₆ absorbans değerine göre hücre lizatların içerdiği

glikoz miktarı, glikoz standart çözeltisinin içerdiği glikoz miktarına göre maya yaş ağırlığının üzerinden normalize edilerek, miligram hücrede biriktirilen mikrogram glikoz (μg glikoz/mg yaş ağırlığı) olarak hesaplandı.

3.8. İstatistiksel Analiz

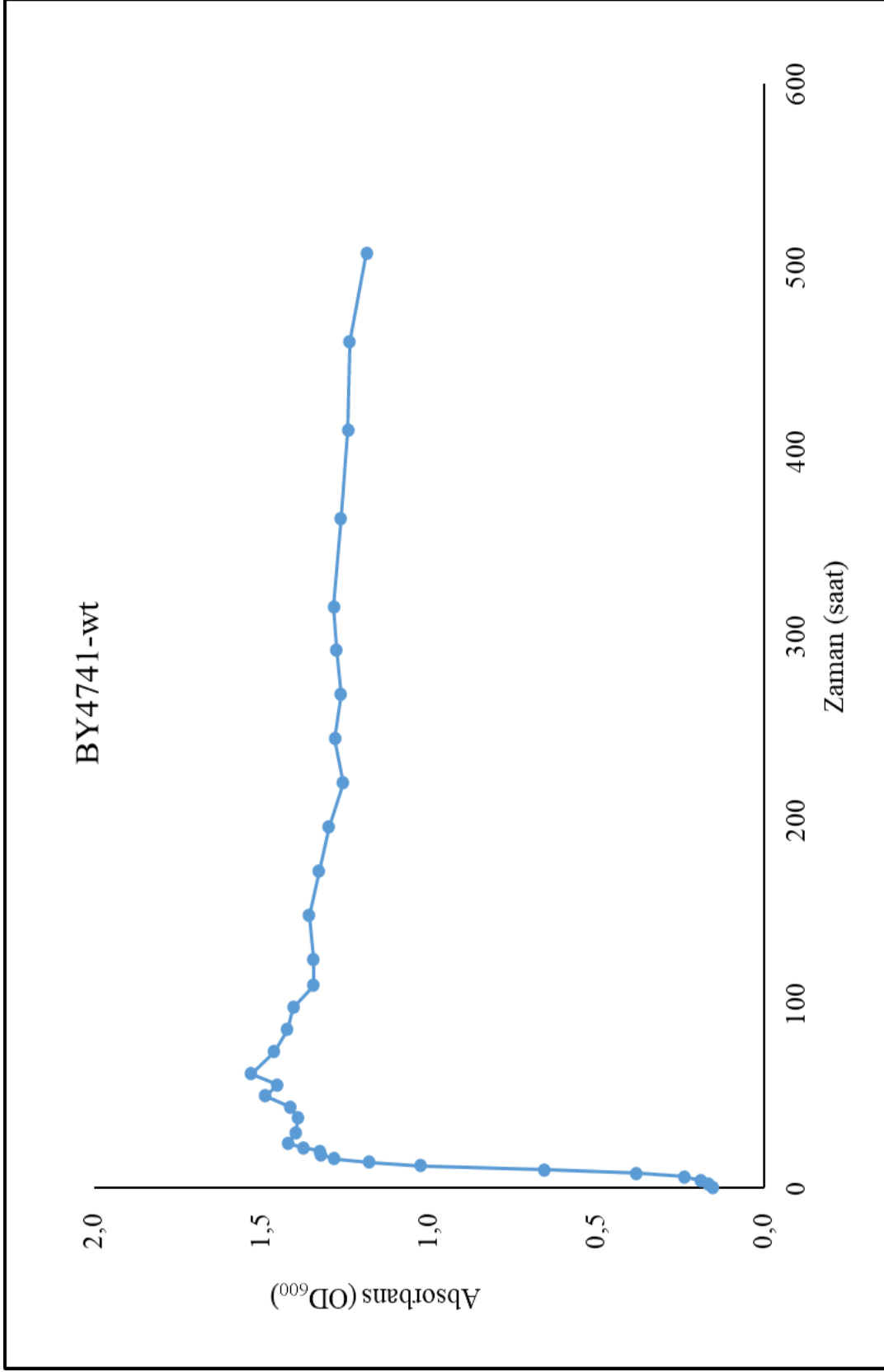
Enzim deneyleri her bir transformant maya suşu için ikili setler olarak en az üç tekrarlı bir şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar, en az üç bağımsız transformantın ve üç bağımsız deneyin ortalama \pm standart sapması (SD) hesaplandı. Veri analizleri Graph Pad Prism 9 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, ABD) kullanılarak yapıldı. Veri analizi sonucunda 0,05'ten küçük olan farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

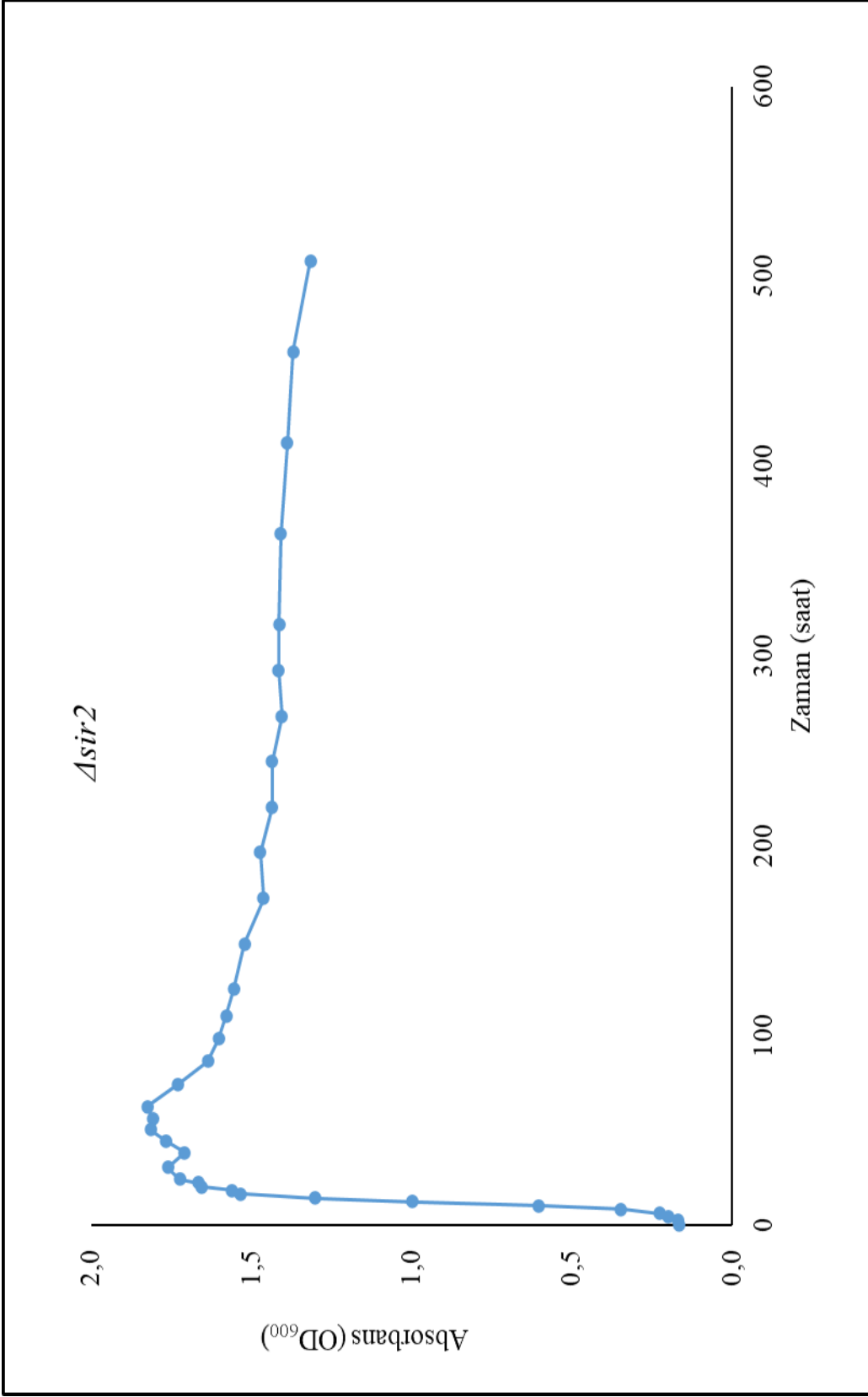
ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Maya Suşlarının İkilenme Süreleri ve Spesifik Üreme Oranları

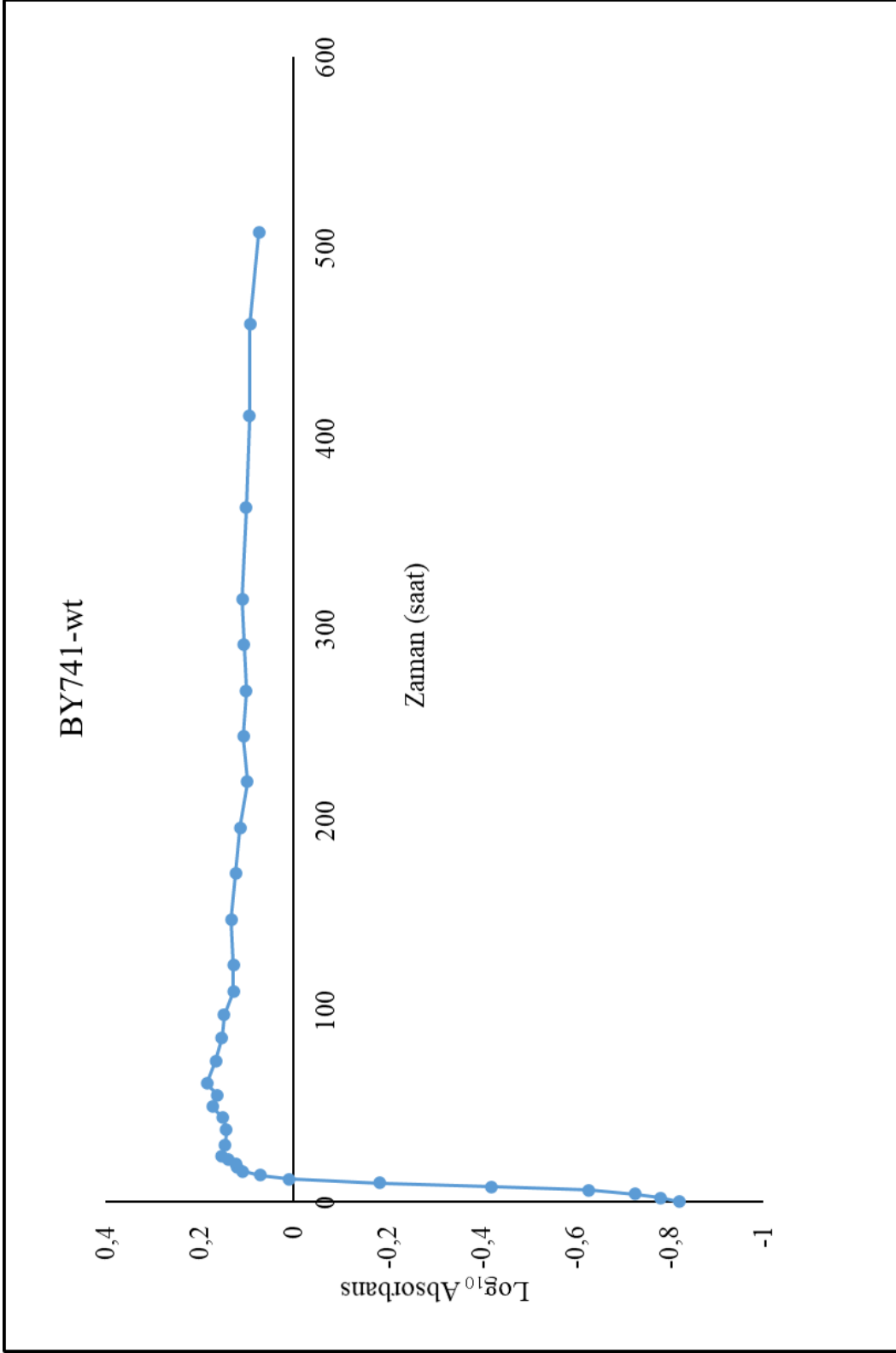
Çalışmada kullanılan yaban tip (BY4741) ve $\Delta sir2$ mutant (Y03738) *S. cerevisiae* maya suşlarının üreme eğrileri %0,2 urasil içeren YNBD-HLM üreme ortamında belirlendi. Maya suşlarının bir gecelik kültürlerinden alınan hücreler YNB-HLMU taze sıvı besi yerlerine OD₆₀₀ değeri 0,2 olacak şekilde geçirilerek 15 gün boyunca 30 °C sıcaklıkta ve 120 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyonun ilk 2 gününde 2 saatte bir diğer günlerde 6 saate bir hücre kültürlerinden örnek alınarak spektrofotometrede OD₆₀₀ absorbans değeri belirlendi. Yaban tip (BY4741) maya hücrelerinin zamana karşı ölçülen absorbans değerlerini içeren grafik Şekil 8'de, $\Delta sir2$ mutant (Y03738) maya hücrelerinin zamana karşı ölçülen absorbans değerlerini içeren grafik ise Şekil 9'da verildi. Yaban tip ve $\Delta sir2$ mutant maya suşlarının OD₆₀₀ değerine karşılık gelen logaritmik değerleri hesaplanarak zamana karşı grafiğe yerleştirildi ve logaritmik üreme (Growth curve) grafiği çizildi. Yaban tip maya hücrelerinin logaritmik üreme grafiği Şekil 10'da, $\Delta sir2$ mutant maya hücrelerinin logaritmik üreme grafiği ise Şekil 11'de verildi. Logaritmik grafik kullanılarak maya hücrelerinin eksponensiyel olarak çoğalma gösterdiği zaman aralığında (4 saat-14 saat aralığı) bulunan absorbans değerlerine karşılık gelen hücre miktarı standart üreme grafiği kullanılarak hesaplandı. Elde edilen değerlerin zamana karşı Ln hücre sayısını içeren grafiği çizilerek yaban tip maya hücreleri için Şekil 12'de ve $\Delta sir2$ mutant maya hücreleri için Şekil 13'te verildi. Maya hücrelerinin ikilenme süreleri (Doubling Time, dt) ve spesifik üreme oranları (Specific Growth Rate, μ) Ln hücre sayısı grafikleri kullanılarak hesaplandı. Mikroorganizmaların ikilenme süresi hücre sayısındaki artışın iki katına ulaşması için geçen süreyi (t), spesifik büyüme oranı (μ) ise hücre miktarının toplam hücre miktarına göre birim zamandaki artışını temsil etmektedir. Yaban tip maya hücrelerinin ikilenme süresi (dt) 1,678±0,42 (1 saat 41 dakika±25 dakika) ve spesifik üreme oranı (μ) 0,4132 olarak belirlendi. $\Delta sir2$ mutant maya hücrelerinin ikilenme süresi (dt) ise 1,648±042 (1 saat 39 dakika±25 dakika) ve spesifik üreme oranı (μ) 0,4207 olarak hesaplandı. Çalışmamızda yaban tip ve $\Delta sir2$ mutant maya hücrelerinin hücre döngüsünü yaklaşık olarak 2 saatte (±25 dakika) tamamladığı belirlendiğinden bir sonraki aşamada uygulanacak olan azot açlığı stres süresinin en az bir hücre döngüsünü tamamlayabilmesi için 4 saat olarak belirlendi.



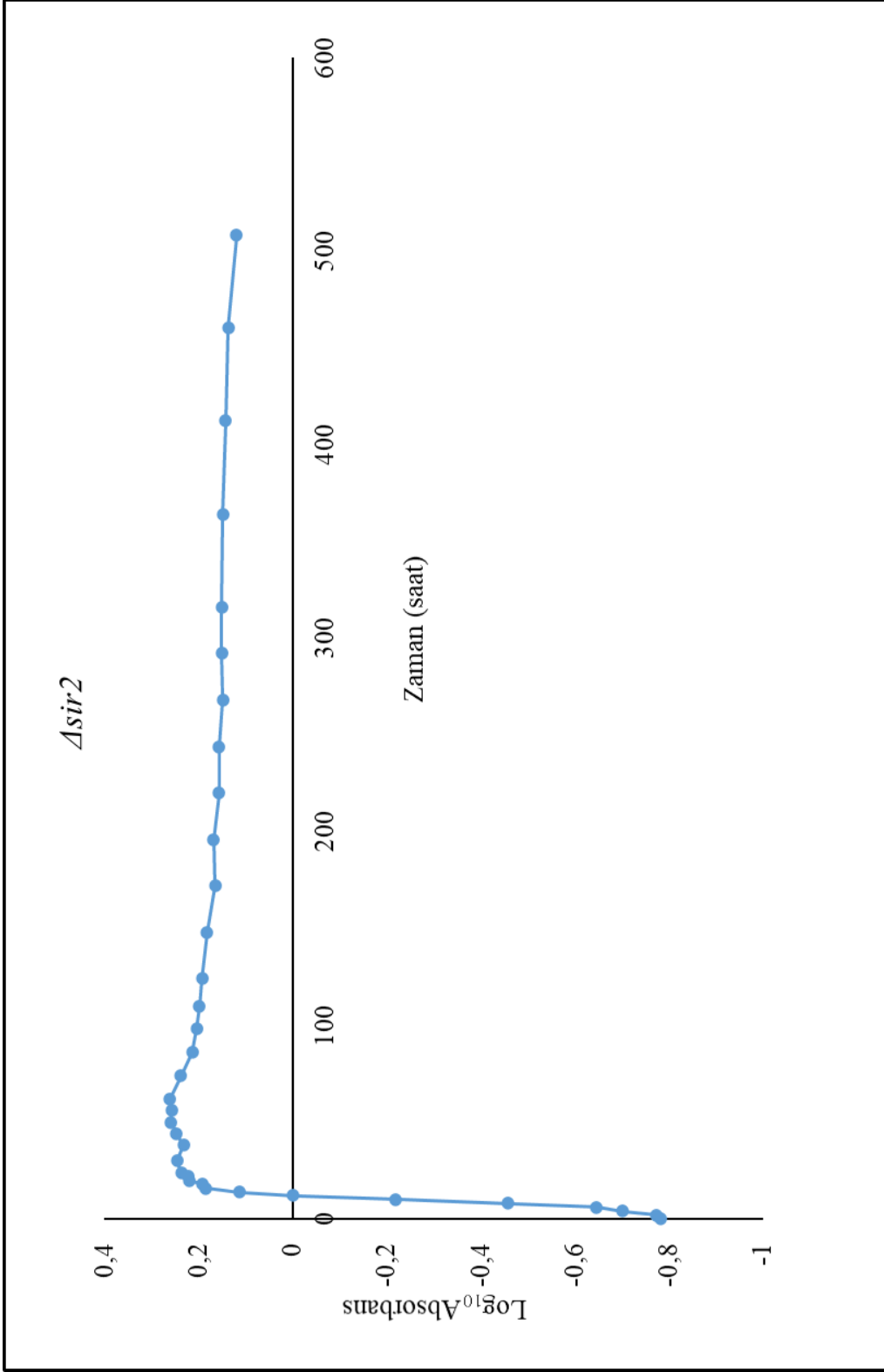
Şekil 7. Yaban tip maya suşunun zamana karşı ölçülen OD₆₀₀. değerleri



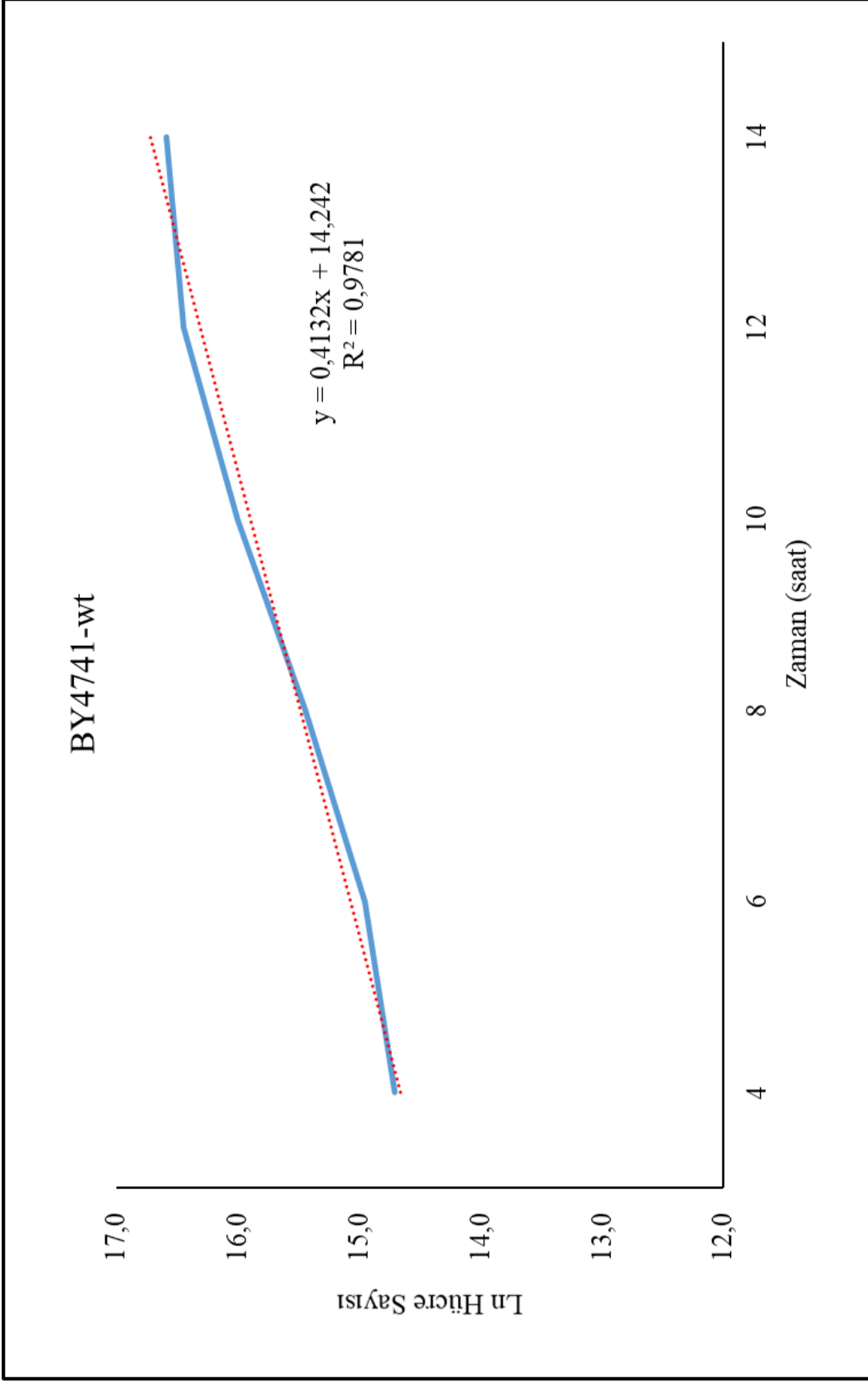
Şekil 8. $\Delta sir2$ mutant maya suşunun zamana karşı ölçülen OD_{600} değerleri



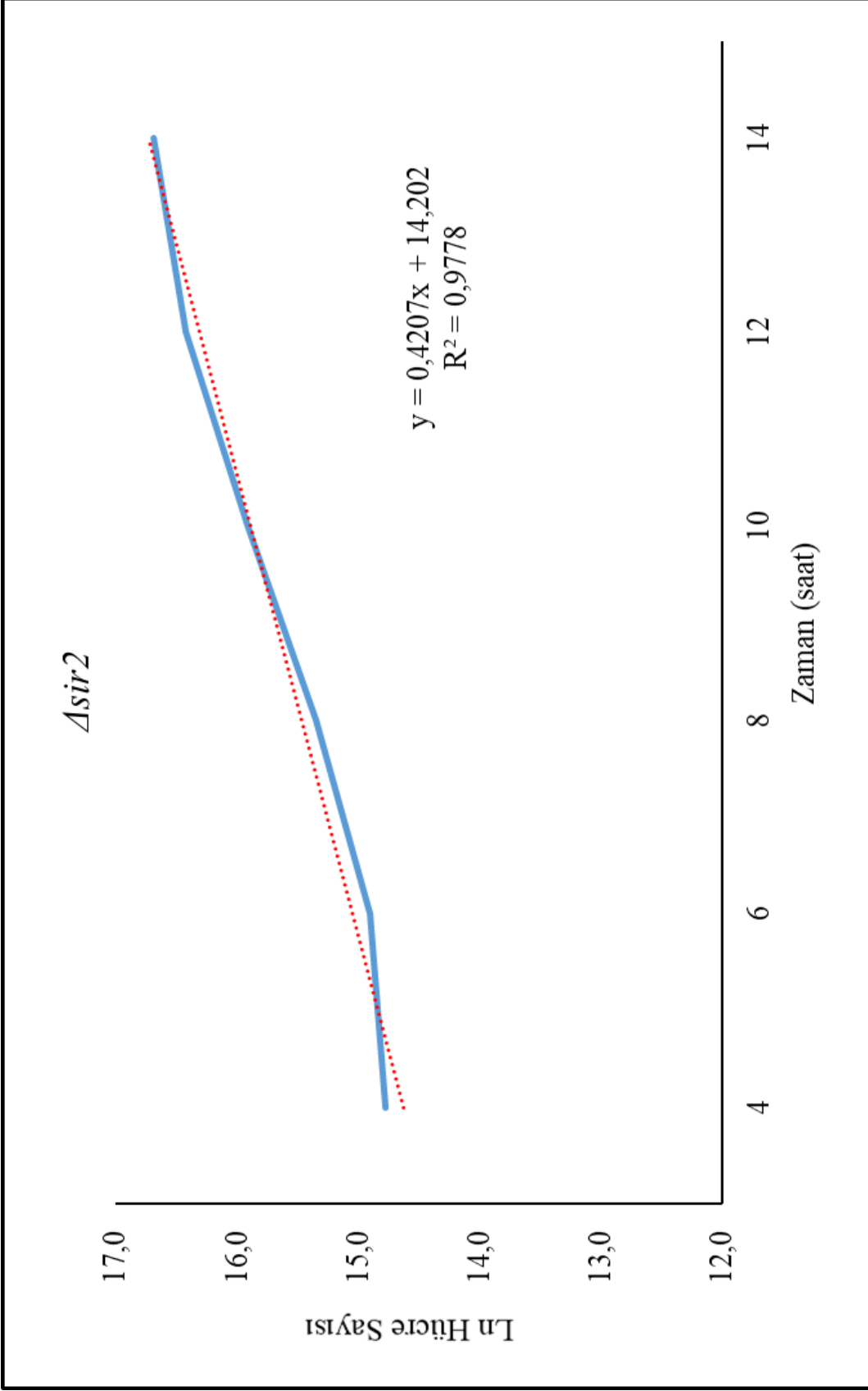
Şekil 9. Yaban tip maya suşunun logaritmik üreme grafiği.



Şekil 10. $\Delta sir2$ mutant maya suşunun logaritmik üreme grafiği.



Şekil 11. Yaban tip maya suşunun ikilenme süresi ve spesifik büyüme oranı



Şekil 12. *Δsir2* maya suşunun ikilenme süresi ve spesifik büyüme oranını

4.2. Sir2 Proteininin *NTH1* ve *TPS1* Gen Ekspresyonlarına Etkisi

Farklı genetik ve fizyolojik değişkenler maya hücrelerinin yaşam uzunluğunu artırdığı gibi farklı stres koşullarına da direnç göstermesini sağlamaktadır. Yaşlanmanın en belirleyici sebebinin hücrelerin veya organizmanın stres ile başa çıkma yeteneğini kaybetmesi olarak görülmektedir (Kourtis ve Tavernakis, 2011). *S. cerevisiae* maya hücrelerinde NAD^+ bağımlı histon deasetilazı kodlayan *SIR2* geni kromatinin sessizleştirilmesinde (Chromatine silencing) görevli olup maya hücrelerinin kronolojik yaşam uzunluğunu (CLS) etkilemektedir. Replikatif yaşam uzunluğu için gerekli olan *SIR2* geninin kronolojik yaşam uzunluğu ve farklı streslere karşı yüksek direnç için de gerekli olduğu gösterilmiştir (Longo vd., 2012).

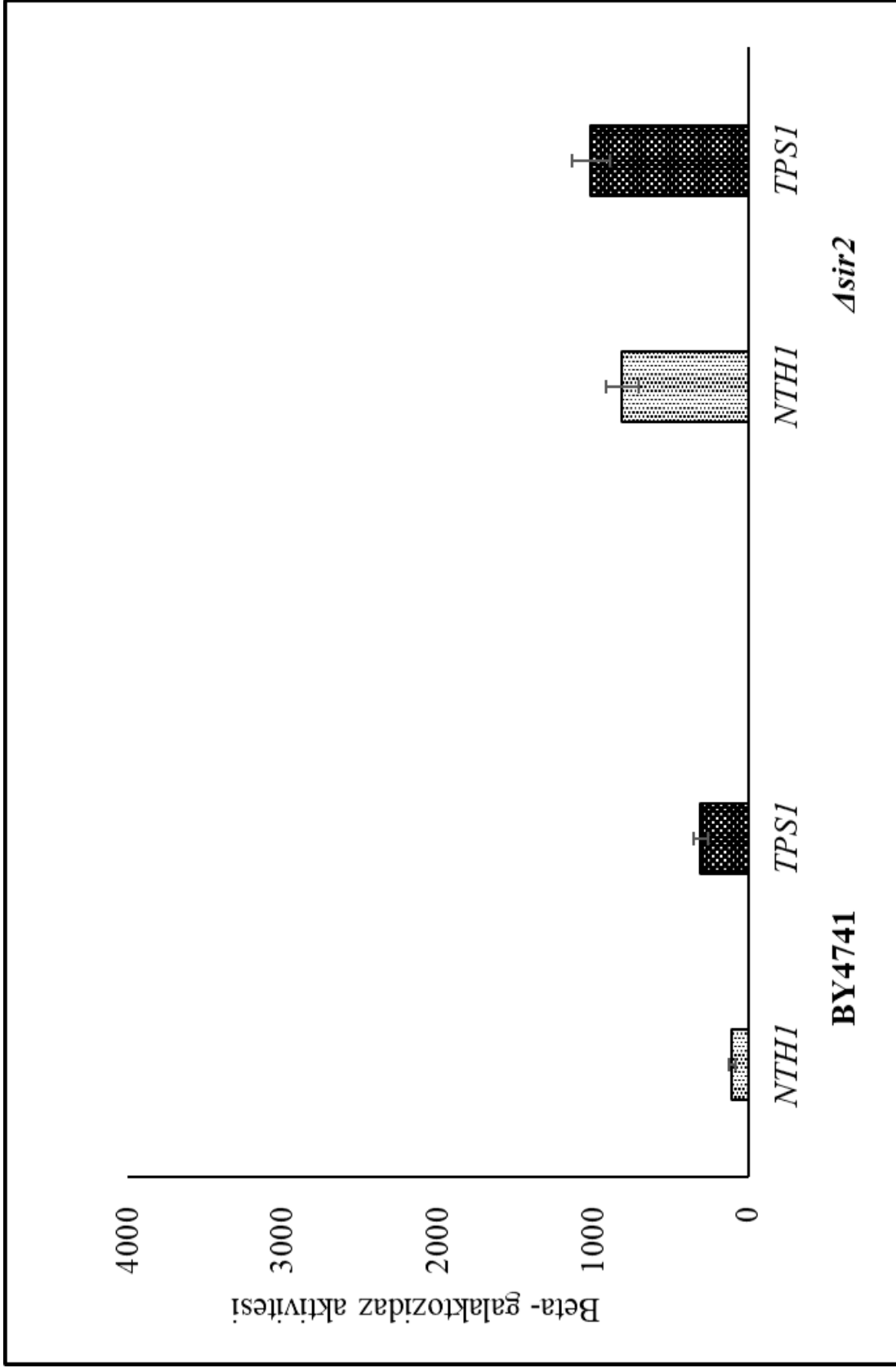
NTH1 ve *TPS1* trehaloz metabolizmasında görevli enzimleri kodlayan genler olup farklı stres koşullarında her iki genin de transkripsiyonları aktive edilmektedir (Parrou vd., 1999). Bu nedenle çalışmamızda Sir2 proteininin *NTH1* ve *TPS1* transkripsiyonuna olan etkisi normal üreme koşullarında ve azot açlığı ile oluşturulan besin stresi şartlarında belirlendi. Bu amaçla *NTH1-LacZ* ve *TPS1-LacZ* gen füzyonu içeren plazmitler, *SIR2* geni içermeyen ($\Delta sir2$) ve içeren (yaban tip) maya suşlarına transforme edildi. Her iki gen için kullanılan promotor bölgeleri transkripsiyonel regülasyon için gerekli olan STRE elementlerini içermektedir (Parrou vd., 1997).

Yaban tip ve $\Delta sir2$ mutant maya hücrelerinin normal üreme ortamında logaritmik aşamada belirlenen *NTH1* ve *TPS1* promotor aktivasyonları Şekil 14'te verildi. Yaban tip maya hücrelerinin stres ortamına aktarılmadan önce (logaritmik aşamada) belirlenen beta-galaktozidaz enzim aktivitesi *NTH1-lacZ* füzyonu için $107,5 \pm 20,1$ ünite ve *TPS1-lacZ* gen füzyonu için $308,9 \pm 15,2$ ünite olarak ölçüldü. Mutant maya hücrelerinin stres ortamına aktarılmadan önce belirlenen beta-galaktozidaz enzim aktivitesi ise *NTH1-lacZ* füzyonu için $812,7 \pm 102,6$ ünite ve *TPS1-lacZ* gen füzyonu için $1015,2 \pm 121,3$ ünite olarak hesaplandı. Normal üreme koşullarında yaban tip maya hücrelerinde belirlenen *TPS1* promotor aktivasyonunun *NTH1* promotor aktivasyonundan yaklaşık 3 kat fazla ($p < 0,05$) olmasına rağmen mutant maya hücrelerinde *NTH1* ve *TPS1* promotor aktivasyonları arasında anlamlı bir fark ($p > 0,05$) olmadığı belirlendi. Genel olarak mutant maya hücrelerinde belirlenen *NTH1* ve *TPS1* gen ekspresyonlarının yaban tip hücrelerinden daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Normal koşullarda *Δsir2* maya hücrelerinde belirlenen *NTH1* gen ekspresyonunun yaban tip maya hücrelerinden yaklaşık 7-8 kat fazla ($p < 0,05$), *TPS1* gen ekspresyonunun ise yaban tip maya hücrelerinden ortalama 3 kat daha fazla ($p < 0,05$) olduğu tespit edildi. Sir2 proteininin yokluğunda *NTH1* ve *TPS1* transkripsiyonunun artması Sir2 proteininin standart üreme koşullarında (%2 glikoz ve 30 °C) bu genlerin baskılanmasında görev aldığını göstermektedir.

Daha önce yapılan çalışmalarda Sir2 proteininin yokluğunda birçok stres direnç geninin pozitif olarak etkilendiği gösterilmiştir (Vendrell ve Posas, 2011). Sir2 proteini içermeyen maya hücrelerinde oksidatif stres direncinin ve kronolojik yaşam uzunluğunun logaritmik aşamada azalması ve post-dioksik ve durağan aşamada artması, Sir2 proteininin oksidatif stres direncini ve kronolojik yaşam uzunluğunu üreme aşamasına bağlı olarak düzenlediğini göstermektedir (Kang vd., 2014). Çalışmamızda da stres koşullarında aktive olması gereken *NTH1* ve *TPS1* genlerinin, Sir2 proteininin yokluğunda standart üreme koşullarında aktive oldukları belirlenmiştir.

Cyc8–Tup1 ko-represör kompleksi, glikoz ve oksijen kullanımı, ozmotik stres, DNA onarımı, mating, sporülasyon, mayoz ve flokülasyon gibi mayadaki birçok aşamanın gerçekteşmesinde rol alan yolaklarda görev almaktadır (Smith ve Johnson, 2000; Malave ve Dent, 2006). Komplekste yer alan Cyc8p ve Tup1 proteinlerinin DNA bağlama özelliği olmadığı için DNA bağlama faktörleri (α 2-Mcm1p, Crt1p, Mig1p, Rox1p, Sfl1p ve Nrg1 gibi) tarafından promotorda bulunan spesifik bağlanma bölgelerine getirilmesi (recruitment) gerekmektedir (Smith ve Johnson, 2000). Cyc8–Tup1 kompleksi ayrıca kromatin ile etkileşime girerek nükleozomların pozisyonlarını, histon asetilasyonunu ve histon varyantı Htz1 proteininin birikimini etkilemektedir (Chen vd., 2012; Gligoris vd., 2007). Daha önce yapılan çalışmalarda Tup1p ile Rpd3p, Hos1p, Hos2p (Class I HDAC) ve Hda1p (Class II HDAC) arasındaki genetik ve biyokimyasal etkileşimler gösterilmiştir (Watson vd., 2000; Davie vd., 2003). Bu histon deasetilazların silinmesi promotor bölgelerindeki histonların hiperasetilasyonuna neden olmuştur. Tup1p ile ilişkili histon deasetilazların, H2B, H3 ve H4 histonlarının N-terminal ucundan asetil gruplarının çıkarılmasından sorumlu olduğu ve Tup1p bağlanması ile histon deasetilasyonu arasında karşılıklı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (Flemming vd., 2014).



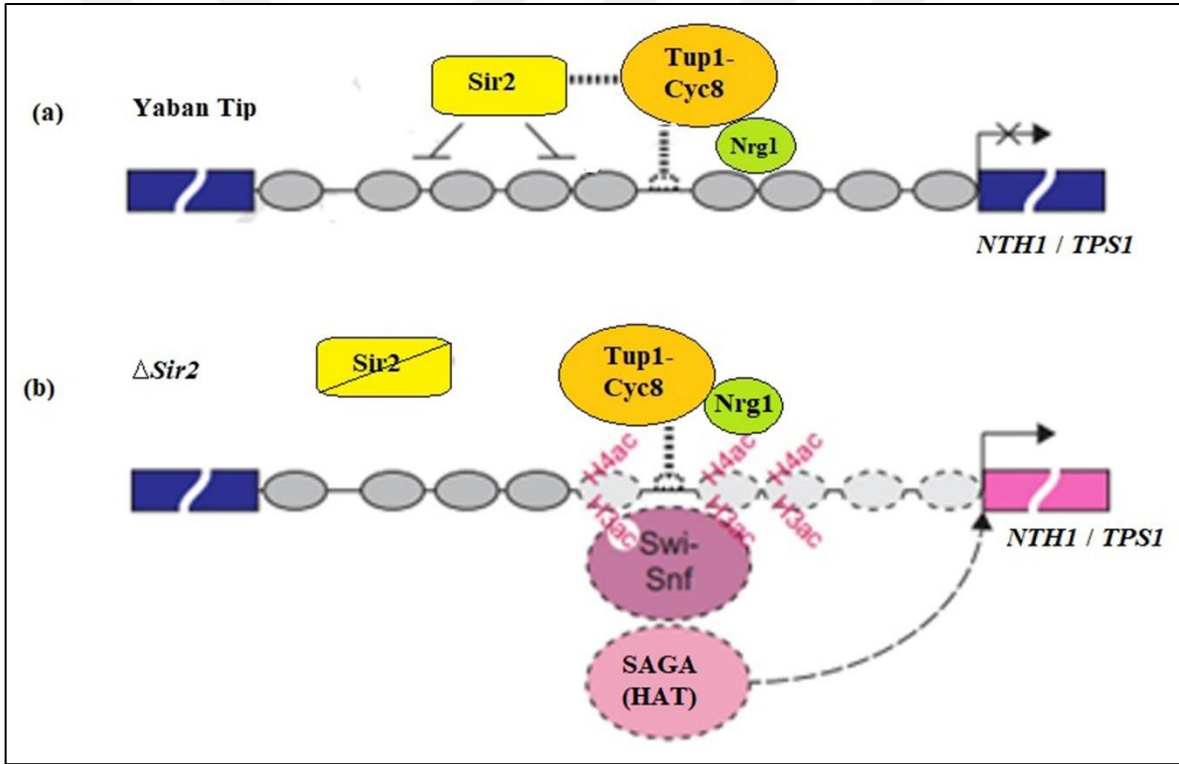
Şekil 13. Yaban tip ve mutant maya hücrelerinde normal üreme koşullarında belirlenen *NTH1* ve *TPS1* promotor aktivasyonu

Nrg1 ve Nrg2 proteinleri çinko-parmak yapısında (C_2H_2 zinc finger structure) DNA bağlanma proteinleri olup transkripsiyonel represyonda görev almaktadır (Park vd., 1999; Vyas vd, 2005). Karbon kaynağına duyarlı genlerin (carbon source-responsive genes) regülasyonunda Nrg1 ve Nrg2 proteinlerinin rolünü belirlemek için yapılan genomik ekspresyon analizinde, stres içermeyen ortamda glikoz varlığında çoğaltılan maya hücrelerinde, Nrg1 ve Nrg2p tarafından bastırılan genlerin büyük bir kısmının promotorlarında STRE ve STRE-benzeri DNA dizileri içerdiği ve bu genlerin stres koşullarına yanıt olarak düzenlendiği belirlenmiştir. *NTH1* ve *TPS1* genlerinin promotor bölgesinde Msn2/4 transkripsiyon faktörlerinin bağlanabilmesi için gerekli olan STRE (5'-CCCCT-3') dizileri bulunmaktadır (Goldberg vd., 2004). Genom-tabanlı lokasyon analizi sonucunda Nrg1 proteininin konsensus bağlanma dizisi 5'-GGaCCCT-3' olarak belirlenmiştir (Harbison vd., 2004). Daha önce yapılan *in silico* promotor analizinde *NTH1* promotor bölgesinde üç Nrg1 bağlanma bölgesinin bulunduğu ve bunlardan transkripsiyonel başlangıç bölgesinin -349 bp yukarısında bulunan üçüncü CCCT kutusunun Nrg1 represör proteininin öngörülen hedef dizisi olduğu belirlenmiştir (Turgut Genç ve Doğan, 2019). Ayrıca aynı çalışmada *NTH1* transkripsiyonunun standart üreme koşullarında ve azot açlığında değişmediği, yaban tip maya hücrelerinden yaklaşık 7 kat fazla olduğu gösterilmiştir.

Bu bilgiler doğrultusunda standart üreme koşullarında maya hücrelerinde bulunan Cyc8-Tup1 ko-represör kompleksi DNA bağlanma özelliği olan Nrg1 represör proteini aracılığıyla *NTH1* ve *TPS1* promotor bölgesine bağlanarak histon deasetilaz aktivitesine sahip Sir2 proteini aracılığıyla transkripsiyonu baskılamış olabilir (Şekil 15a). Bu nedenle çalışmamızda normal üreme koşullarında yaban tip maya hücrelerinde *NTH1* ve *TPS1* transkripsiyonunda baskılanma gözlenirken Δ *sir2* maya hücrelerinde Sir2 proteini olmadığından *NTH1* ve *TPS1* transkripsiyonu tam olarak baskılanamadığı için yüksek transkripsiyon gözlenmiş olabilir (Şekil 15b).

Daha önce yapılan çalışmada Tor1 proteininin Sir2 aktivitesini kontrol ederek *PMA1* (Plasma Membrane ATPase) gen ekspresyonunu regüle ettiği gösterilmiştir (Nimbadas vd., 2020). TOR sinyal yolağının inhibisyonu Sir2 aktivitesini artırmaktadır (Medvedik vd., 2007). Nikotinamidaz enzimi için kodlu *PNC1* geninin ekspresyonu kalori kısıtlamasında ve ısı şoku veya ozmotik şok gibi hafif stres koşullarında artmaktadır (Gallo vd., 2004). *PNC1* geninin aktivasyonu promotor bölgesinde bulunan STRE dizilerine Msn2/4 proteinlerinin

bağlanması ile gerçekleşir. Msn2/4 proteinlerinin nükleer lokalizasyonunun kontrolü PKA ve TOR sinyal yolağı ile sağlanmaktadır. TOR yolağının zayıf azot kaynağı veya rapamisin ile inhibisyonu Msn2/4 proteinlerinin nükleusa geçerek *PNC1* gen ekspresyonu aktive etmesine ve Pnc1 proteininin Sir2 protein aktivitesinin artırmasına neden olur. Yaban tip maya hücrelerinde gözlenen düşük *NTH1* ve *TPS1* transkripsiyonu daha önce yapılan çalışmalar ile paralellik göstermektedir. Sir2 proteini H3 ve H4 histon proteinlerinin amino ucunda bulunan lizin amino asitini deasetile ederek aktif kromatini inaktif hale geçirmektedir. *NTH1* ve *TPS1* promotorunda lokalize olan nükleozomların yapısındaki histonların deasetile edilememesinden dolayı promotor aktivasyonu $\Delta sir2$ maya hücrelerinde devam etmiş olabilir.



Şekil 14. Sir1 proteininin varlığında *NTH1* ve *TPS1* gen ekspresyon modeli.

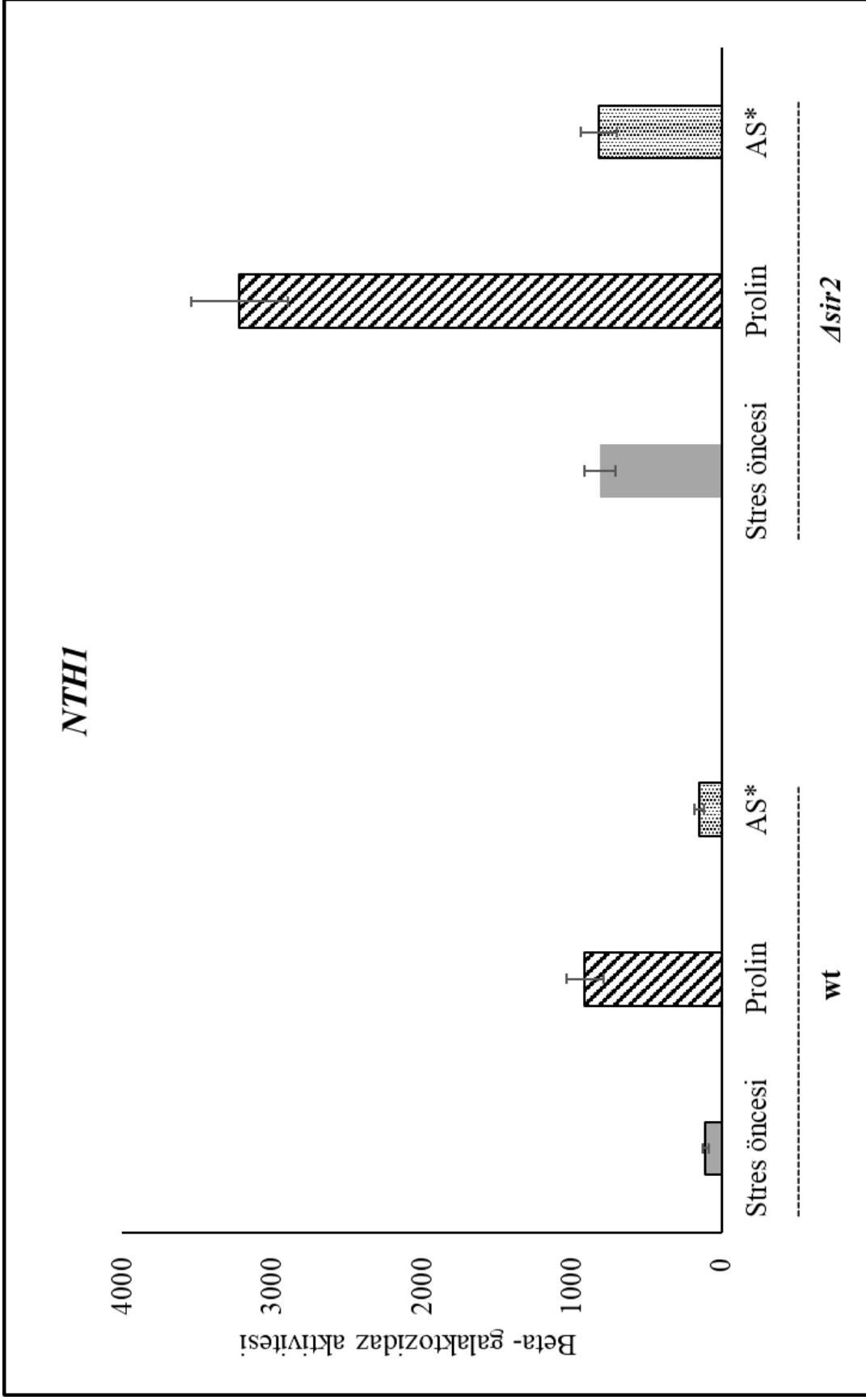
Fleming vd., 2014'ten modifiye edilmiştir

4.3. Sir2 Proteininin Stres Koşullarında *NTH1* ve *TPS1* Gen Ekspresyonlarına Etkisi

Yaban tip ve $\Delta sir2$ mutant maya hücrelerinin stres koşullarında *NTH1* ve *TPS1* promotor aktivasyonlarını belirlemek için logaritmik olarak çoğalmakta olan *NTH1*-LacZ ve

TPS1-lacZ gen füzyonu içeren yaban tip ve *Δsir2* maya hücreleri prolin içeren üreme ortamına geçirildi. Promotor aktivitelerinin yalnızca azot kökenli besin açlığı kaynaklı olması için üreme ortamı taze hazırlandı ve glikoz ilave edildi. Ayrıca kontrol olarak maya hücreleri güçlü azot kaynağı (amonyum sülfat) içeren taze üreme ortamına geçirildi. Zayıf ve kuvvetli azot kaynağı içeren üreme ortamlarında yaban tip ve *Δsir2* maya hücrelerinin en az bir hücre döngüsünü tamamlayabilmesi için 4 saat inkübe edildi ve beta-galaktozidaz enzim aktiviteleri belirlendi.

Yaban tip ve *Δsir2* mutant maya hücrelerinin stres ortamında belirlenen *NTH1* promotor aktivasyonu Şekil 16'da verildi. Yaban tip maya hücrelerinin zayıf azot kaynağı içeren üreme ortamında belirlenen beta-galaktozidaz enzim aktivitesi $912,8 \pm 124,3$ ünite ve kuvvetli azot kaynağı içeren üreme ortamında belirlenen beta-galaktozidaz enzim aktivitesi $151,3 \pm 28,2$ ünite olarak ölçüldü. Mutant maya hücrelerinde ise *NTH1* promotor aktivasyonu zayıf azot kaynağı içeren ortamda $3217,8 \pm 325,8$ ünite ve kuvvetli azot kaynağı içeren ortamda $819,5 \pm 121,5$ ünite olarak hesaplandı. Ekspansiyonel olarak çoğalmakta olan maya hücreleri stres içeren ortama aktarıldığında *NTH1* promotor aktivasyonunun yaban tip maya hücrelerinde 8 kat ($p < 0,05$) ve *Δsir2* mutant maya hücrelerin 4 kat ($p < 0,05$) arttığı tespit edildi. Ancak ekspansiyonel olarak üremekte olan yaban tip ve mutant maya hücreleri stres içermeyen taze üreme ortamına geçirildiğinde *NTH1* promotor aktivasyonunun yaban tip ($151,3 \pm 28,2$) ve mutant ($819,5 \pm 121,5$) maya hücrelerinde değişmediği ($p > 0,05$) belirlendi. Ayrıca stres koşullarında *Δsir2* mutant maya hücrelerinde belirlenen *NTH1* promotor aktivasyonunun yaban tip maya hücrelerinde belirlenen promotor aktivasyonundan yaklaşık 4 kat fazla ($p < 0,05$) olduğu tespit edildi. Normal üreme koşullarında ve stres ortamında *Δsir2* mutant maya hücrelerinde *NTH1* promotor aktivasyonunun yaban tip maya hücrelerinden daha yüksek olması, Sir2 proteininin *NTH1* gen aktivitesinin sessizleştirilmesinde görev aldığını göstermektedir.



Şekil 15. Yaban tip ve mutant maya hücrelerinde azot açlığında belirlenen *NTH1* promotor aktivasyonu

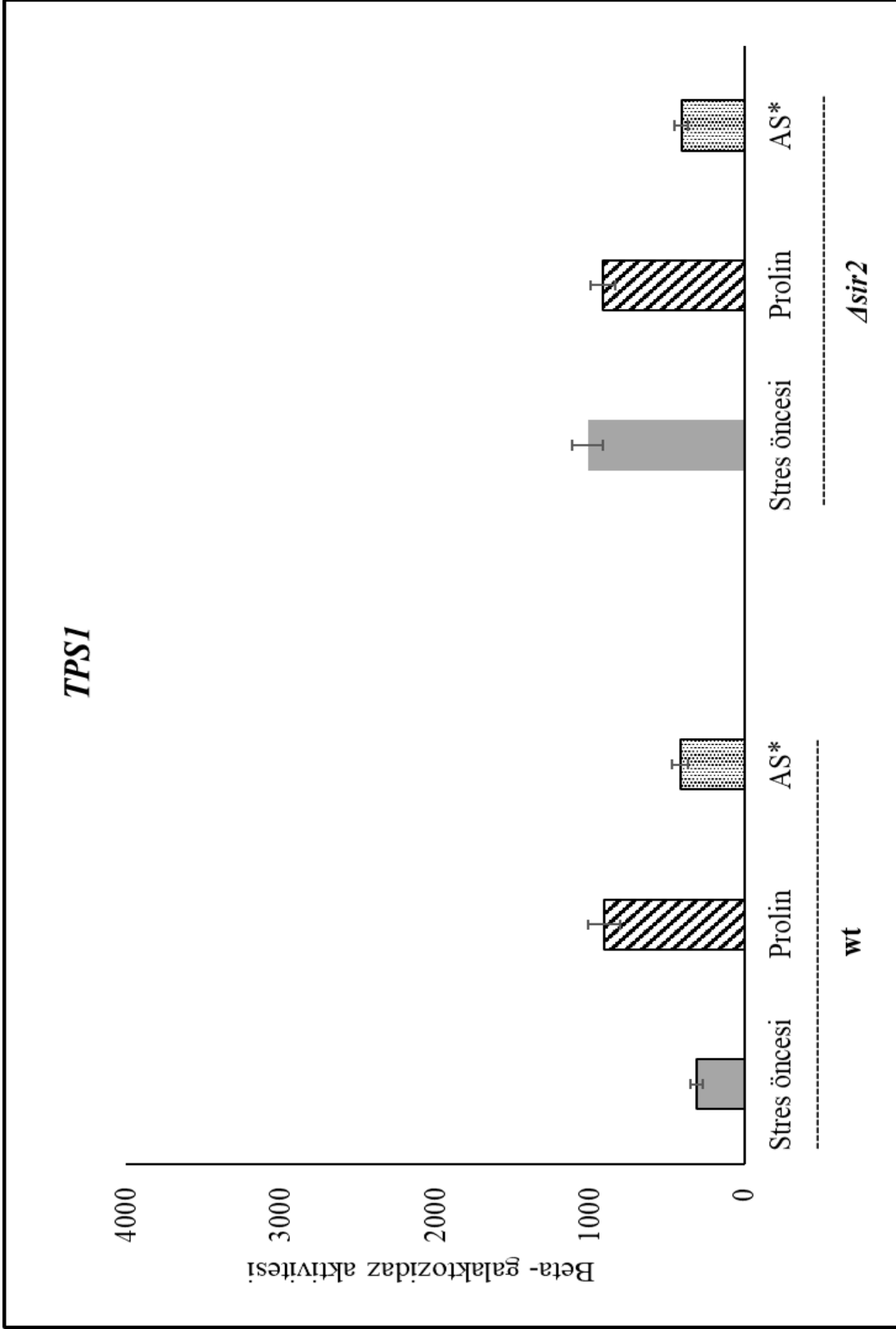
NTH1 transkripsiyonu Msn2/4 proteinlerinin *NTH1* promotorunda bulunan STRE dizilerine bağlanmasıyla aktive edilmektedir. Msn2/4 transkripsiyon faktörlerinin aktiviteleri ise cAMP/PKA ve TOR sinyal yolları ile kontrol edilmektedir. Güçlü azot kaynağında TOR sinyal yolağı aktif hale geçerek Msn2/4 transkripsiyon faktörlerinin sitoplazmaya geçmesi ve inaktif halde tutulmasını sağlar. Zayıf azot kaynağının varlığında Tor1 kinaz inaktifleşerek daha önce fosforlanmış Msn2/4 proteinlerinin Protein fosfatase II (PPIIA) tarafından defosforile edilmesine neden olur. Msn2/4 proteinleri nükleusa geçerek *NTH1* promotorunda bulunan STRE dizilerine bağlanarak transkripsiyonu aktive eder. Bu aktivasyon için *NTH1* promotorunda lokalize olan histon proteinlerinin histon asetilazlar tarafından asetillenmesi gerektiği, asetilasyon miktarının artmasına paralel olarak gen aktivitesinin de arttığı düşünülebilir. Bu nedenle, stres koşullarında Sir2 histon deasetilaz aktivitesi içermeyen maya hücrelerinde *NTH1* promotor aktivitesinde artış gerçekleşmiş olabilir. Daha önce yapılan *in silico* promotor analizinde *NTH1* promotorunda lokalize olan STRE dizilerinin nükleozomlar tarafından kapatıldığı belirlenmiştir (Turgut Genç ve Doğan, 2019). Msn2/4 proteinlerinin STRE dizilerine bağlanabilmesi için histon asetilasyonu gerekmektedir. *NTH1* gen aktivasyonunun histon deasetilaz enzim aktivitesinin olmadığı koşullarda ve stres koşullarında yüksek oranda arttığı belirlenmiştir. Bu durum *NTH1* gen aktivasyonunun histon asetilasyonuna paralel olarak arttığını göstermektedir.

Yaban tip ve $\Delta sir2$ mutant maya hücrelerinin stres ortamında belirlenen *TPS1* promotor aktivasyonu ise Şekil 17’de verildi. Yaban tip maya hücrelerinin zayıf azot kaynağı içeren üreme ortamında belirlenen beta-galaktozidaz enzim aktivitesi $905,6 \pm 104,6$ ünite ve kuvvetli azot kaynağı içeren üreme ortamında belirlenen beta-galaktozidaz enzim aktivitesi $417,1 \pm 52,3$ ünite olarak ölçüldü. Zayıf azot kaynağı içeren ortamda $\Delta sir2$ mutant maya hücrelerinde beta-galaktozidaz enzim aktivitesi $917,3 \pm 80,5$ ünite ve kuvvetli azot kaynağı içeren ortamda $408,7 \pm 45,9$ ünite olarak hesaplandı. Eksponensiyel olarak çoğalmakta olan maya hücreleri besin stresi içeren ortama aktarıldığında *TPS1* promotor aktivasyonunun yaban tip maya hücrelerinde yaklaşık 3 kat ($p < 0,05$) arttığı ancak $\Delta sir2$ mutant maya hücrelerinde anlamlı bir değişim olmadığı tespit edildi. Benzer şekilde maya hücreleri stres içermeyen taze üreme ortamına geçirildiğinde *TPS1* promotor aktivasyonunun yaban tip ($417,1 \pm 52,3$) ve mutant ($408,7 \pm 45,9$) maya hücrelerinde değişmediği belirlendi ($p > 0,05$). Ayrıca stres koşullarında $\Delta sir2$ mutant maya hücrelerinde belirlenen *TPS1* promotor aktivasyonunun yaban tip maya hücrelerinde belirlenen promotor aktivasyonu ile aynı

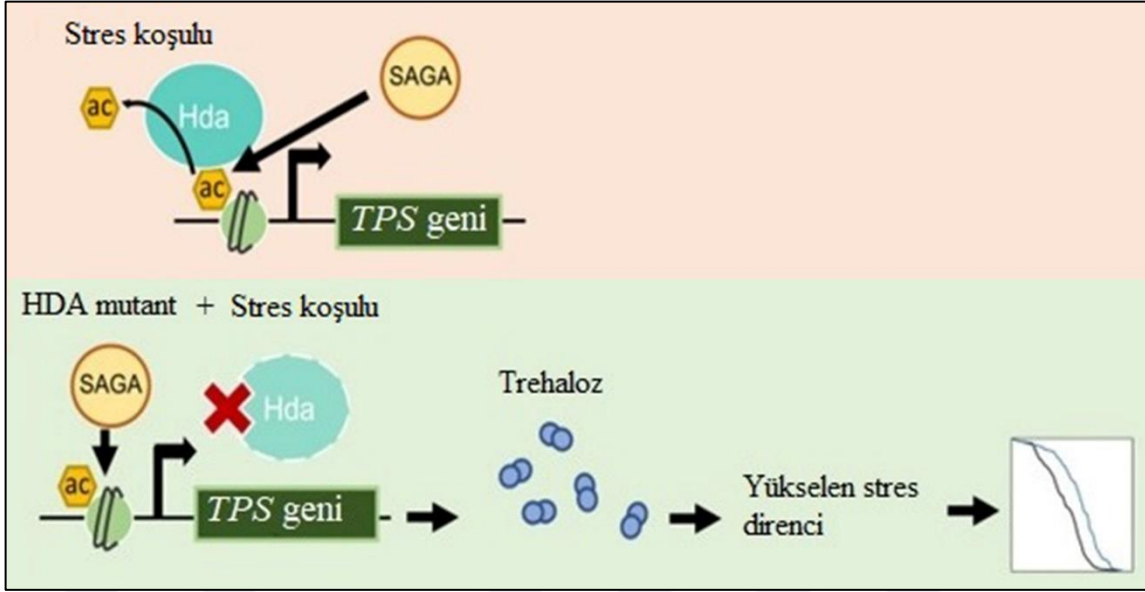
seviyede olduğu tespit edildi. *Δsir2* mutant maya hücrelerinde *TPS1* promotor aktivasyonu normal üreme koşullarında yaban tip maya hücrelerinden daha yüksek olmasına rağmen stres ortamında promotor aktivitesinde artış gözlenmemesi, Sir2 proteininin *TPS1* gen aktivitesinin hem sessizleştirilmesinde hem de aktivasyonunda görev aldığını göstermektedir.

Hda1, Hda2 ve Hda3 proteinleri histon lizin deasetilaz ailesinin ikinci sınıfında (Class-II) yer alan HDA kompleksinin alt üniteleri olup Hda1 katalitik alt üniteyi Hda2 ve Hda3 yardımcı faktörleri (accessary factors) oluşturmaktadır (Parra, 2015). *Δhda1* ve *Δhda2* maya suşlarında yaşam uzunluğu artmaktadır (Yu vd., 2021). HDA kompleksi H3 histon proteininde asetillenmiş lizinini deasetile ederek gen inaktivasyonuna neden olmaktadır. *Δhda1* ve *DDR* (DNA Damage Repair) mutant suşlarının (*Δrad50* ve *Δsgs1*) transkriptomik analizlerinin karşılaştırılmasında yalnızca glikojen ve trehaloz yolaklarının önemli ölçüde her üç mutant maya suşunda da yukarı doğru düzenlendiği (up-regulation) tespit edilmiştir. HDA kompleksinin inaktivasyonunun, trehaloz gen ekspresyonunun ve stres koşullarında biriktirilen trehaloz miktarının artmasına neden olduğu ve *Δhda1* maya hücrelerinde gözlenen yaşam süresinin artışında ise glikojenden ziyade trehaloz metabolizmasının daha etkin olduğu gösterilmiştir (Yu vd., 2021). Hda1 proteinin yokluğunda genotoksik direnç oluşmaktadır. İlginç olarak genotoksik stres uygulamasında Hda1 proteinin *TPS1* ve *TPS2* promotorlarına getirilmesinin de (Hda1p recruitment) arttığı belirlenmiştir (Şekil 18).

Histon deasetilazların asetillenmiş histonlara afinitesi asetillenmemiş histonlardan çok daha yüksektir. Bu nedenle genotoksik stres sırasında HDA kompleksinin ilgili promotorlara getirilmesinde gözlenen artışın nedeni histon asetiltransferazların ilgili promotorlara getirilmesi ve dolayısıyla histon asetilasyon seviyelerinin artmasından kaynaklanmaktadır (Yu vd., 2021). Çalışmamızda stres koşullarında *Δsir2* mutant maya hücrelerinde *TPS1* promotor aktivasyonunun değişmemesinin nedeni transkripsiyonel aktivasyon için (*NTH1* promotor aktivasyonunun tersine) HDAC aktivitesine ihtiyaç duymasından kaynaklanıyor olabilir. Sir2 proteini yokluğunda asetilasyon miktarı belirli bir seviyede tutulmadığından hiperasetilasyon gerçekleşmesi sonucu *TPS1* gen aktivasyonu gerçekleşmemiş olabilir.



Şekil 16. Yaban tip ve mutant maya hücrelerinin azot açlığında belirlenen *TPSI* promotor aktivasyonu



Şekil 17. HDA aracılı trehaloz metabolizmasının baskılanması ve bunun maya yaşlanması üzerindeki etkisi.

Yu vd., 2021'den modifiye edilmiştir.

Glikoz, galaktoz vb. farklı fermentatif karbon kaynaklarını kullanabilen *S. cerevisiae* maya türü glikozu öncelikli karbon kaynağı olarak tercih etmektedir. Glikoz varlığında alternatif karbon kaynaklarının kullanımında görevli olan genlerin tamamı baskılanmaktadır ve bu durum mayalarda glikoz baskılanması (Glucose Repression) olarak adlandırılmaktadır. *S. cerevisiae* maya türünde *SUC2* geni sukrozun hidrolizinden sorumlu invertaz enzimini kodlamakta ve bu genin ekspresyonu da glikoz baskılanmasına uğramaktadır. Maya hücreleri tarafından kullanılan karbon kaynağı ve miktarı *SUC2* geninin transkripsiyonel regülasyonunda önemli bir role sahipken, azot kaynağı ya da miktarının etkisi olmadığı bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamızda kontrol amaçlı olarak *SUC2* promotorunu taşıyan plazmit kullanılmıştır. *SUC2-LacZ* gen füzyonu içeren yaban tip ve *Δsir2* maya hücrelerinde standart üreme koşullarında ve stres koşullarında ölçülen beta-galaktozidaz enzim aktiviteleri Tablo 1'de verildi. Farklı azot kaynaklarının *SUC2* promotor aktivasyonunda etkili olmadığı, *NTH1-LacZ* ve *TPS1-LacZ* gen füzyonlarında beta-galaktozidaz aktivitelerinin stres kökenli promotor aktivasyonu sonucu gerçekleştiğini göstermektedir.

Tablo 1

Yaban tip ve *Δsir2* maya hücrelerinde *SUC2* promotor aktivasyonu

Üreme koşulları	Beta- galaktozidaz aktivitesi \pm SD*	
	BY4741	<i>Δsir2</i>
Stres öncesi	5,3 \pm 0,3	0,2 \pm 0,001101
Prolin	24,3 \pm 1,2	49,6 \pm 6,7
Amonyum sülfat	57,5 \pm 17,8	32,6 \pm 5,6

* beta-galaktozidaz ünitesi nmol ONPG/dak/mg protein; \pm SD: standart sapma

4.4. Sir2 Proteininin Hücre İçi Trehaloz ve Glikojen Birikimine Etkisi

S. cerevisiae maya hücrelerinde trehaloz ve glikojen iki önemli glikoz deposudur. Maya hücrelerinin fizyolojik durumu, üreme aşamaları ve üreme ortamlarına göre trehaloz ve glikojenin hücredeki miktarları değişkenlik göstermektedir. Trehaloz ve glikojen mayalarda enerji yedeği olarak görev yapar ve glikolitik yolda düzenleyici olarak rol oynar (Thevelein ve Hohmann, 1995). Maya hücreleri trehaloz ve glikojeni standart üreme koşullarında ve glikoz varlığında logaritmik safhanın sonunda biriktiren farklı stres koşullarında üreme fazından bağımsız olarak sentezlemektedir (François ve Parrou, 2001). Stres koşulları sona erdiğinde ise biriktirilen trehalozu nötral trehalaz enzimi ile yıkarak enerji kaynağı olarak kullanmaktadır. Glikojen ve trehaloz metabolizması hücre döngüsüne bağlı olarak düzenlenmekte olup, birçok faktör tarafından kontrol edilmektedir. Çalışmanın bu bölümünde Sir2 proteininin hücre içinde biriktirilen trehaloz ve glikojen miktarına olan etkisi belirlendi. Yaban tip ve *Δsir2* mutant maya hücreleri glikoz içeren üreme ortamında logaritmik aşamaya kadar çoğaltılarak hücrelerin biriktirdiği trehaloz ve glikojen miktarı enzimatik olarak belirlendi. Maya hücrelerinin yaş ağırlıklarına göre trehaloz ve glikojen miktarı hesaplanarak mg hücre yaş ağırlığında ölçülen mikrogram glikoz (μ g glikoz/mg hücre yaş ağırlığı) olarak verildi.

Yaban tip ve *Δsir2* mutant maya hücrelerinin standart üreme koşullarında logaritmik aşamada biriktirdiği trehaloz ve glikojen miktarı Şekil 19'da verildi. Yaban tip maya hücrelerinin logaritmik aşamada belirlenen trehaloz miktarı 428,0 \pm 102,3 μ g glikoz/mg hücre yaş ağırlığı ve glikojen miktarı 4183,5 \pm 24,5 μ g glikoz/mg hücre yaş ağırlığı olarak

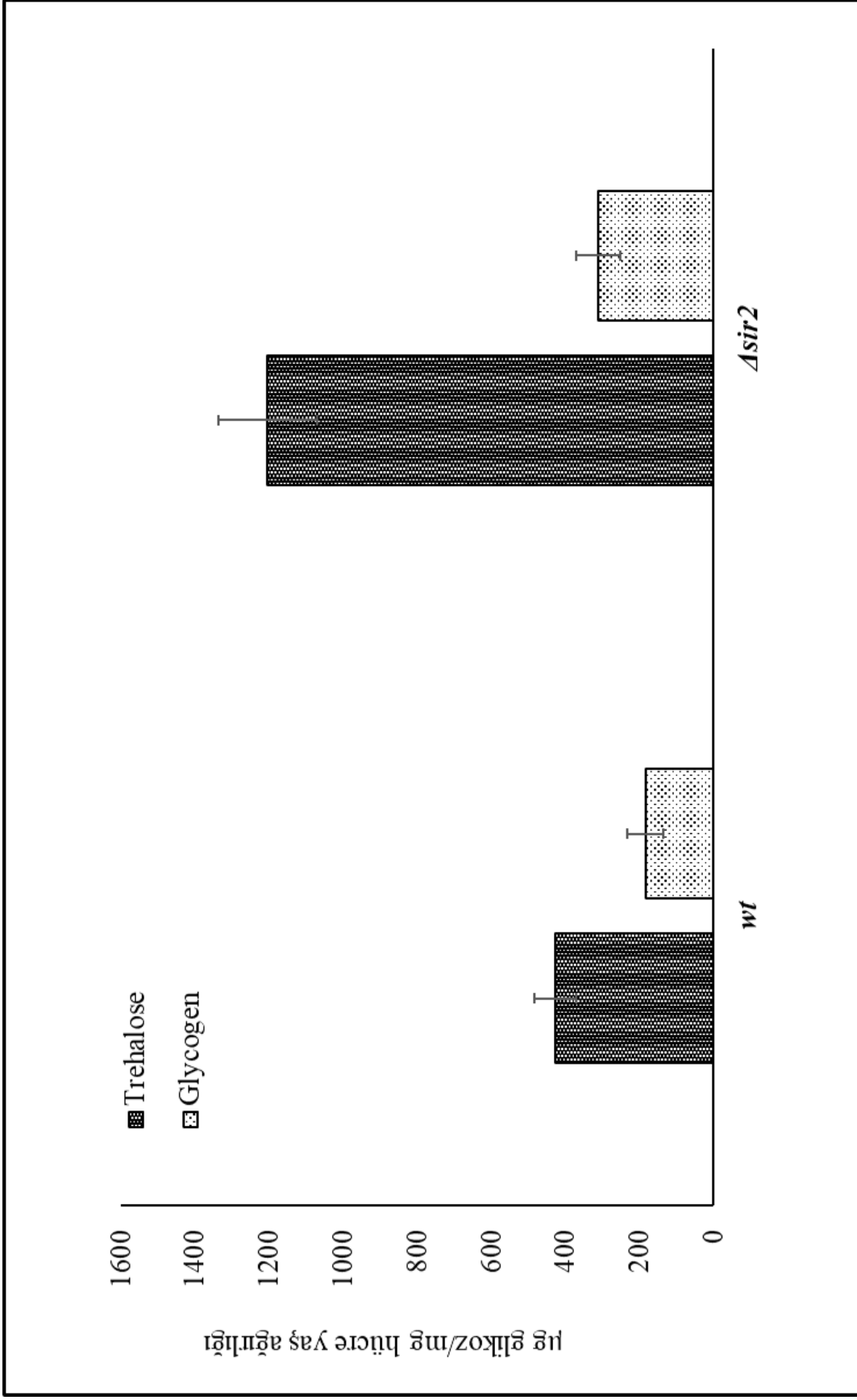
belirlendi. Sir2 proteinin yokluğunda (*Δsir2*) maya hücrelerinin biriktirdiği trehaloz miktarı $1327,2 \pm 256,3$ µg glikoz/mg hücre yaş ağırlığı ve glikojen miktarı $524,9 \pm 65,3245$ µg glikoz/mg hücre yaş ağırlığı olarak hesaplandı. Normal üreme koşullarında yaban tip ve mutant maya hücrelerinde belirlenen trehaloz miktarının glikojen miktarından 2 kat fazla olduğu belirlendi ($p < 0,05$). Sir2 proteininin yokluğunda hücre içi trehaloz ve glikojen akümülyasyonunun ortalama 3 kat arttığı tespit edildi ($p < 0,05$). Maya hücreleri glikoz varlığında logaritmik aşamanın sonunda trehaloz ve glikojen biriktirmektedir. Çalışmamızda trehaloz ve glikojen birikimi logaritmik aşamanın ortalarında belirlendiği için yaban tip maya hücrelerinde trehaloz ve glikojen birikiminin düşük seviyede olması beklenen sonuçtur. Ancak *Δsir2* mutant maya hücrelerinde *NTH1* ve *TPS1* promotor aktivasyonuna paralel olarak depo karbonhidrat birikiminin de arttığı gözlenmiştir.

Ozmotik stres, oksidatif stres, ısı stresi ve metal stresi gibi çeşitli stres şartları ile glikoz açlığı gibi besin eksikliklerinde *TPS1* ve *NTH1* transkripsiyonu aktive olmaktadır (Eleutherio vd., 2015). Bu nedenle çalışmamızda maya hücrelerinin azot açlığında trehaloz ve glikojen birikimleri belirlendi. Logaritmik olarak kuvvetli azot kaynağında çoğalmakta olan yaban tip maya hücrelerinin trehaloz akümülyasyonu zayıf azot kaynağına (prolin) geçirildiğinde $1291,1 \pm 212,5$ µg glikoz/mg hücre yaş ağırlığı ve kuvvetli azot kaynağına (Amonyum sülfat) geçirildiğinde $508,8 \pm 95,3$ µg glikoz/mg hücre yaş ağırlığı olarak belirlendi. Mutant maya hücrelerinin trehaloz akümülyasyonu ise zayıf azot kaynağında $3104,8 \pm 325,8$ µg glikoz/mg hücre yaş ağırlığı ve kuvvetli azot kaynağında $980,2 \pm 121,5$ µg glikoz/mg hücre yaş ağırlığı olarak ölçüldü (Şekil 20). Benzer şekilde logaritmik olarak çoğalmakta olan yaban tip maya hücrelerinin glikojen akümülyasyonu zayıf azot kaynağında $4717,5 \pm 382,7$ µg glikoz/mg hücre yaş ağırlığı ve kuvvetli azot kaynağında $336,9 \pm 45,6$ µg glikoz/mg hücre yaş ağırlığı olarak belirlendi. Mutant maya hücrelerinin glikojen birikimi ise zayıf azot kaynağında $8541,9 \pm 502,6$ µg glikoz/mg hücre yaş ağırlığı ve kuvvetli azot kaynağında $824,6 \pm 98,3$ µg glikoz/mg hücre yaş ağırlığı olarak tespit edildi (Şekil 21).

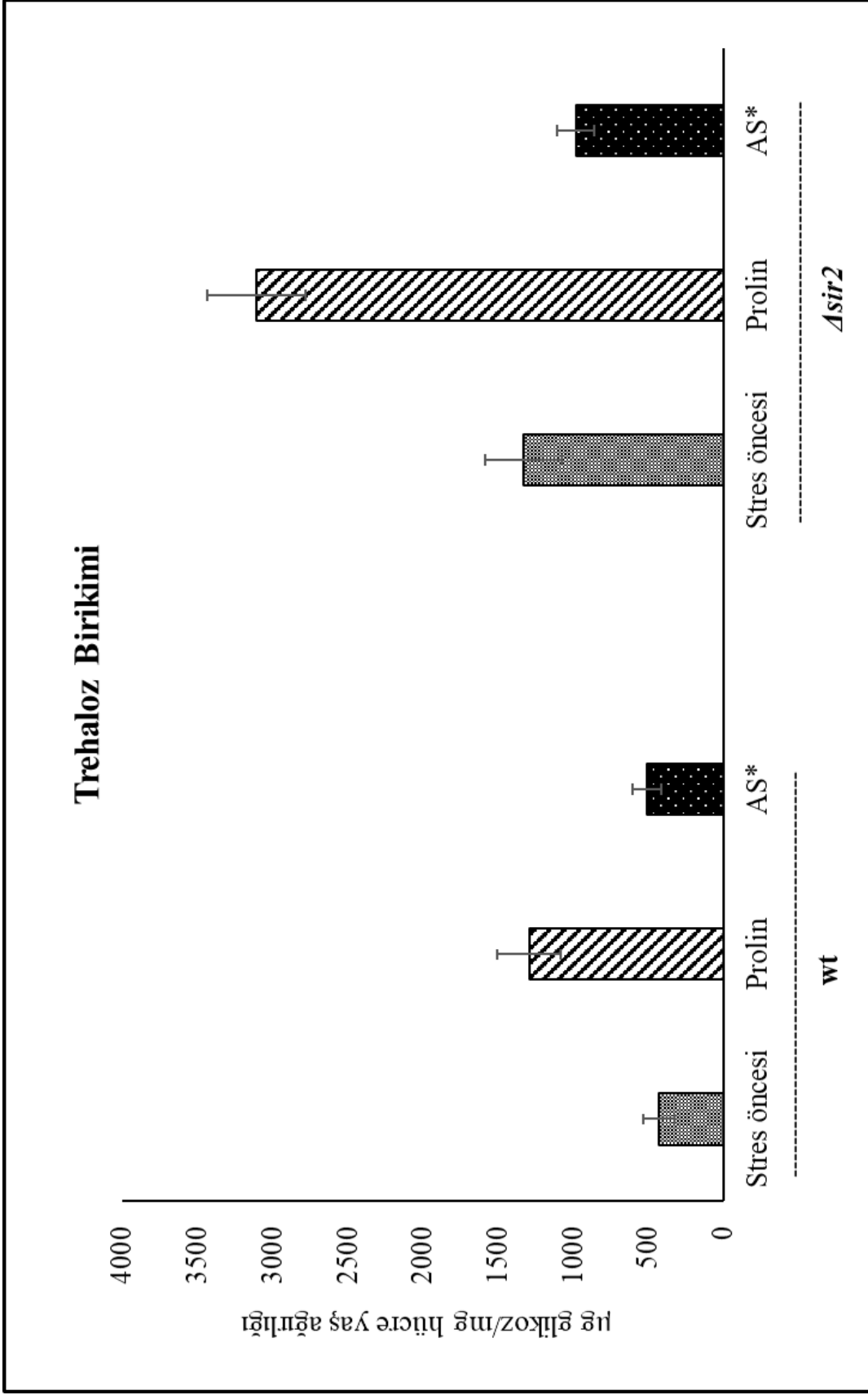
Logaritmik olarak kuvvetli azot kaynağında çoğaltılan yaban tip ve mutant maya hücreleri kuvvetli azot kaynağı içeren ortama geçirildiğinde maya hücrelerinin biriktirdiği trehaloz ve glikojen miktarında anlamlı bir değişim olmadığı gözlemlendi. Ancak maya hücreleri taze zayıf azot kaynağı içeren ortama geçirildiğinde, trehaloz miktarının yaban tip ve mutant maya hücrelerinde yaklaşık 2-3 kat ($p < 0,05$) arttığı, glikojen miktarının ise yaban

tip maya hücrelerinde 25 kat ($p<0,05$) mutant maya hücrelerinde 16 kat ($p<0,05$) attığı tespit edildi. Stres koşullarında maya hücrelerinin biriktirdiği glikojen miktarının trehaloz miktarından fazla olduğu gözlemlendi. Sir2 proteini yokluğunda trehaloz ve glikojen birikiminin hem standart üreme ortamında hem de stres koşullarında 2 kat daha yüksek olduğu belirlendi ($p<0,05$).

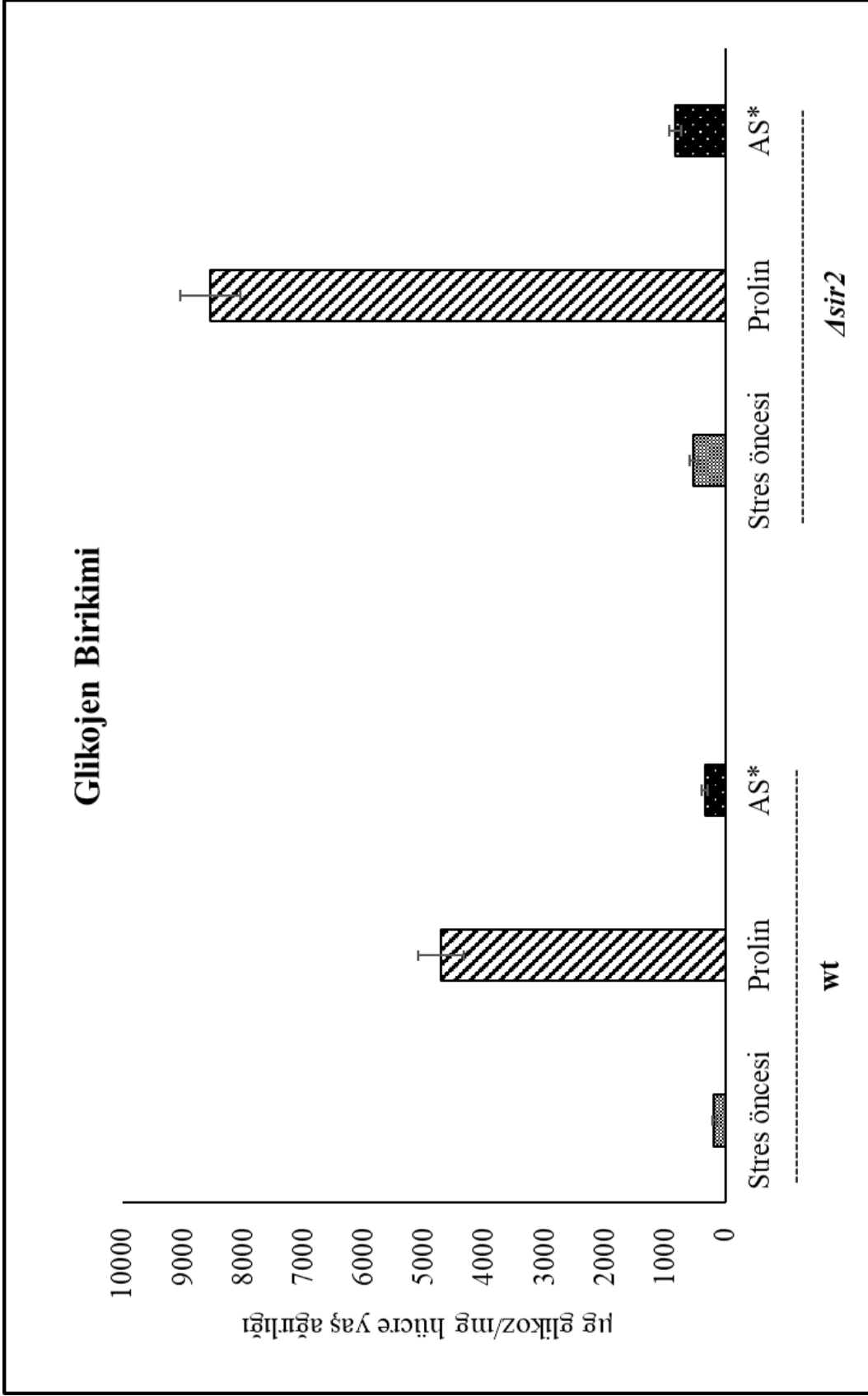
Genel olarak Sir2 proteini yokluğunda maya hücrelerinin trehaloz ve glikojen birikimlerinde artış tespit edildi. Trehaloz sentezi için gerekli olan Tps1p sentezlendiğinde aktif iken, yıkımı için gerekli olan Nth1p stres koşulları sonlanana kadar inaktif olarak beklemektedir. Bu nedenle mutant maya hücrelerinde trehaloz birikimi yüksek gözlenmiş olabilir. Ancak glikojen sentezi ve yıkımı için gerekli olan genler farklı zamanlarda transkripsiyona uğramaktadır. Sir2 proteini yokluğunda glikojen birikiminin artması, glikojen sentezi için gerekli olan genlerin transkripsiyonunun regülasyonunda da Sir2 proteinin rolü olduğunu göstermektedir. Bu nedenle ilerdeki çalışmalarda $\Delta sir2$ mutant maya hücrelerinde glikojen sentezinden ve yıkımından sorumlu genlerin promotor aktivasyonlarının belirlenmesi uygun olacaktır.



Şekil 18. Yaban tip ve $\Delta sir2$ mutant maya hücrelerinin standart üreme koşullarında trehaloz ve glikojen birikimi



Şekil 19. Yaban tip ve $\Delta sir2$ mutant maya hücrelerinin azot açlığında trehaloz birikimi



Şekil 20. Yaban tip ve $\Delta sir2$ mutant maya hücrelerinin azot açlığında glikojen birikimi

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Tamamlanan tez çalışmasında, histon deasetilaz enzim aktivitesine sahip olan Sir2 proteininin, normal üreme koşullarında *NTH1* ve *TPS1* gen aktivitesinin baskılanması için gerekli olduğu belirlenmiştir. Sir2 proteininin Nrg1-Tup1/Cyc8 aracılığıyla *NTH1* ve *TPS1* transkripsiyonunu baskıladığı düşünülmektedir. Bu nedenle ilerideki çalışmalarda *NTH1* ve *TPS1* promotor aktivitelerinin $\Delta tup1$ ve $\Delta cyc8$ maya hücrelerinde belirlenmesi bu sonucun desteklenmesi için uygun olacaktır. İlave olarak, diğer sirtuin proteinleri (Hst1, Hst2, Hst3 ve Hst4) için ve histon deasetilaz enzim aktivitesine sahip proteinleri (Hda1 gibi) kodlayan genlerin mutasyonunu taşıyan maya hücrelerinde ($\Delta hst1 \Delta hst2 \Delta hst3 \Delta hst4 \Delta hda1$) *NTH1* ve *TPS1* promotor aktivitelerinin belirlenmesi uygun olacaktır.

Çalışmamızda ayrıca, azot açlığı ile oluşturulan besin stresi koşullarında *NTH1* promotor aktivitesinin yaban tip maya hücrelerinden daha yüksek olduğu, *TPS1* promotor aktivitesinin ise aynı seviyede kaldığı gözlemlendi. Elde edilen bu sonuç, histon deasetilaz aktivitesinin *TPS1* gen ekspresyonunun aktive edilmesinde ve susturulmasında ortam koşullarına bağlı olarak gerekli olduğunu göstermektedir. Elde edilen bu sonuçların desteklenmesi için stres koşullarında diğer histon deasetilaz enzim aktivitesine sahip proteinlerin yokluğunda *NTH1* ve *TPS1* promotor aktivitelerinin belirlenmesi uygun olacaktır.

Daha önceki çalışmalara paralel olarak, çalışmamızda da Sir2 proteini yokluğunda trehaloz ve glikojen birikiminin normal üreme koşullarında ve besin açlık stresinde arttığı gözlemlenmiştir. Diğer sirtuin ailesinde histon deasetilaz enzim aktivitesine sahip proteinlerin yokluğunda da trehaloz ve glikojen birikiminin belirlenmesi, elde edilen sonuçların yorumlanması için gereklidir.

KAYNAKÇA

- Argüelles, C., Maicas, S. ve Guirao-Abad, J.P. (2016). “Yeast trehalases: Two enzymes, one catalytic mission”. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1860 (10), 2249–2254.
- Brachmann, C.B., Sherman, J.M., Devine, S.E., Cameron, E.E., Pillus, L. ve Boeke, J.D. (1995). “The *SIR2* gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability”. *Genes and Development*, 9 (23), 2888–2902. DOI:10.1101/gad.9.23.2888.
- Chen, K., Wilson, M.A., Hirsch, C., Watson, A., Liang S., Lu, Y., Li, W. ve Dent, S.Y. (2012). “Stabilization of the promoter nucleosomes in nucleosome-free regions by the yeast Cyc8–Tup1 corepressor”. *Genome Research*, 23(2), 312–322. DOI:10.1101/gr.141952.112.
- Davie, J.K., Edmondson, D.G., Coco, C.B. ve Dent, S.Y. (2003). “Tup1-Ssn6 interacts with multiple class I histone deacetylases *in vivo*”. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (50) 50158–50162. DOI: 10.1074/jbc.M309753200.
- Eldeen, S.K.N., El-Magd, M.A., Khamis, A., Ibrahim, W.M., Afrah F. ve Salama, A.F. (2018). “Anticancer effect of trehalose by modulating oxidative stress, apoptosis and autophagy”. *Arabian Journal of Medical Sciences*, 1(2): 1-3.
- Eleutherio, E., Panek, A., De Mesquita, J.F., Trevisol, E. ve Magalhães, R. (2015). “Revisiting yeast trehalose metabolism”. *Current Genetics*, 61 (3), 263–274. DOI: 10.1007/s00294-014-0450-1.
- Fabrizio, P. ve Longo, V.D., (2003) “The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*”. *Aging Cell*, 2 (2): 73–81. DOI: 10.1046/j.1474-9728.2003.00033.x
- Feldmann, H. (Ed) (2012). *Yeast: Molecular and Cell Biology*. Wiley-Balckbell, Germany. (s. 2).
- Flemming, A.B., Beggs, S., Church, M., Tsukihashi, Y. ve Pennings, S. (2014). “The yeast Cyc8–Tup1 complex cooperates with Hda1p and Rpd3p histone deacetylases to robustly repress transcription of the subtelomeric *FLO1* gene”. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*, 1839 (11), 1242–1255. DOI:10.1016/j.bbagr.2014.07.022.
- François, J. ve Parrou, J.L. (2001). “Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”. *FEMS Microbiology Reviews*. 25 (1), 125–145. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00574.x>.

- Gallo, C.M., Smith, D.L., ve Smith, J.S. (2004). “Nicotinamide clearance by Pnc1 directly regulates Sir2-mediated silencing and longevity”. *Molecular and Cellular Biology*, 24 (3), 1301–1312. DOI: 10.1128/MCB.24.3.1301-1312.2004.
- Gligoris, T., Thireos, G. ve Tzamarias, D. (2007). “The Tup1 corepressor directs Htz1 deposition at a specific promoter nucleosome marking the *GALI* gene for rapid activation”. *Molecular and Cellular Biology*, 27 (11), 4198–4205. DOI: 10.1128/MCB.00238-07.
- 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.
- Goldstein, A. ve Lampen, J.O., (1975). “Beta-D-fructofuranoside fructohydrolase from yeast”. *Methods in Enzymology*, 42, 504-511. DOI: 10.1016/0076-6879(75)42159-0.
- Ha, C.W., Huh, W. (2010). “Rapamycin increases rDNA stability by enhancing association of Sir2 with rDNA in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Nucleic Acids Research*, 39(4), 1336–1350. DOI:10.1093/nar/gkq895
- Hahn, J.S. ve Thiele, D.J. (2004). “Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor under glucose starvation conditions by Snf1 protein kinase”. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (7),5169-76. DOI:10.1074/jbc.M311005200.
- Harbison, C.T., Gordon, D.B., Lee, T.I., Rinaldi, N.J., Macisaac, K.D., Danford, T.W., Hannett, N.M., Tagne, J.B., Reynolds, D.B., Yoo, J., Jennings, E.G., Zeitlinger, J., Pokholok, D.K., Kellis, M., Rolfe, P.A., Takusagawa, K.T., Lander, E.S., Gifford, D.K., Fraenkel, E. ve Young, R.A. (2004). “Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome”. *Nature*, 431(7004), 99-104, DOI: 10.1038/nature02800.
- Herman, P.K. ve Ramachandran, V. (2011). “Antagonistic interactions between the cAMP-dependent protein kinase and TOR signaling pathways modulate cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Genetics*, 187 (2), 414-454. DOI: 10.1534/genetics.110.123372.
- Hohmann, S. ve Mager, W. (2003). *Yeast Stress Response*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, pp. 1-8. ISBN 3-540-43926-9.
- Houtkooper, R.H., Pirinen, E. ve Auwerx, J. (2012). “Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 225–238.

- Kaeberlein M., Powers R.W., Steffen K.K., Westman E.A., Hu D., Dang N., Kerr E.O., Kirkland K.T., Fields S. ve Kennedy B.K. (2005). “Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients”. *Science*, 310 (5751), 1193-1196. DOI: 10.1126/science.1115535.
- Kandror, O., Bretschneider, N., Kreydin, E., Cavalieri, D. ve Goldberg, A.L., (2004). “Yeast adapt to near-freezing temperatures by *STRE/Msn2,4*-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones”. *Molecular Cell*, 13(6), 771–781. DOI: 10.1016/s1097-2765(04)00148-0.
- Kang, W.K., Kim, Y.H., Kim, B.S. ve Kim J.Y., (2014). “Growth Phase-dependent roles of Sir2 in oxidative stress resistance and chronological lifespan in yeast”. *The Journal of Microbiology*, 52 (8), 652–658. DOI: 10.1007/s12275-014-4173-2.
- Katewa, S.D. ve Kapahi, P. (2010). “Dietary restriction and aging”. *Aging Cell*, 9(2),105–112. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00552.x>.
- Kim, B., Lee Y., Choia, H., and Huh, W.K., (2021). “The trehalose-6-phosphate phosphatase Tps2 regulates *ATG8* transcription and autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Autophagy*, 17(4), 1013-1027.
- Klosinska, M.M., Crutchfield, C.A., Bradley, P.H., Rabinowitz, J.D. ve Broach, J.R. (2011). “Yeast cells can access distinct quiescent states”. *Genes Development*, 25 (4), 336-349. DOI: 10.1101/gad.2011311.
- Kourtis, N. ve Tavernarakis, N., (2011) “Cellular stress response pathways and aging: intricate molecular relationships”. *EMBO Journal*, 30 (13), 2520–2531. DOI: 10.1038/emboj.2011.162.
- Kyryakov, P., Beach, A.,Richard, V.R., Burstein M.T., Leonov A., Levy S. ve Titorenko, V.I. (2012). “Caloric restriction extends yeast chronological lifespan by altering a pattern of age-related changes in trehalose concentration”. *Frontiers in Physiology*. 3, 256. DOI: 10.3389/fphys.2012.00256.
- Li, M., Petteys, B.J., McClure, J.M., Valsakumar, V., Bekiranov, S., Frank, E.L. ve Smith, J.S. (2010). “Thiamine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by the NAD⁺-dependent histone deacetylase Hst1”. *Molecular and Cellular Biology*, 30 (13), 3329–3341. <https://doi.org/10.1128/MCB.01590-09>.
- Longo, V.D., Shadel, G.S., Kaeberlein, M. ve Kennedy, B., (2012) “Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Cell Metabolism*, 16 (1), 18-31. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.06.002.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. ve Randall, R.J. (1951). “Protein measurement with the folin phenol reagent”. *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1), 265-275.
- 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.
- Malave, T.M. ve Dent, S.Y. (2006). “Transcriptional repression by Tup1-Ssn6”. *Biochemistry and Cell Biology*, 84 (4), 437–443. DOI: 10.1139/o06-073.
- Medvedik, O., Lamming, D.W., Kim, K.D. ve Sinclair, D.A. (2007). “*MSN2* and *MSN4* link calorie restriction and TOR to sirtuin-mediated lifespan extension in *Saccharomyces cerevisiae*”. *PLoS Biology*, 5 (10), e261. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050261.
- Nussbaum, I., Weindling, E., Jubran, R., Cohen, A. ve Bar-Nun, S. (2014). “Deteriorated stress response in stationary-phase yeast: Sir2 and Yap1 are essential for Hsf1 activation by heat shock and oxidative stress, respectively”. *PLOS ONE*, 9 (10), e111505. DOI: 10.1371/journal.pone.0111505.
- Park, S.H., Koh, S.S., Chun, J.H., Hwang, H.J. ve Kang, H.S. (1999). “Nrg1 is a transcriptional repressor for glucose repression of *STAI* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Molecular and Cellular Biology*, 19 (3), 2044-2050. DOI: 10.1128/MCB.19.3.2044.
- Parra, M. (2015). “Class IIa HDACs – New insights into their functions in physiology and pathology”. *The FEBS Journal*, 282 (9), 1736–1744 DOI: 10.1111/febs.13061.
- Parrou J.L., Jules M., Beltran G. ve François J.M. (2005). “Acid trehalase in yeast and filamentous fungi: Localization, regulation and physiological function”. *FEMS Yeast Research*, 5, 503- 511.
- Parrou, J.L., Enjalbert, B., Plourde, L., Bauche, A., Gonzalez, B. ve François, J.M. (1999). “Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Yeast*, 15 (3), 191-203.
- 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(1), 186- 188. DOI: 10.1006/abio.1997.2138.
- Petzold, E.W., Himmelreich, U., Mylonakis, E., Rude, T., Toffaletti, D., Cox, G. M., Miller, J.L. ve Perfect, J.R. (2006). “Characterization and regulation of the trehalose synthesis pathway and its importance in the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*”. *Infection and Immunity*, 74 (10), 5877–5887. DOI:10.1128/IAI.00624-06.

- Powers, R.W., Kaeberlein, M., Caldwell, S.D., Kennedy, B.K., Fields, S. (2006). “Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling”. *Genes and Development*, 20 (2),174-184. DOI: 10.1101/gad.1381406
- Qin, K.W., Han, C.F., Zhang, H., Li, T.L., Li, N. ve Cao, X.T. (2017). “NAD (+) dependent deacetylase Sirtuin 5 rescues the innate inflammatory response of endotoxin tolerant macrophages by promoting acetylation of p65”. *Journal of Autoimmun*, 81, 120–129. DOI: 10.1016/j.jaut.2017.04.006.
- Rohde, J.R. ve Cardenas, M.E. (2003). “The Tor pathway regulates gene expression by linking nutrient sensing to histone acetylation”. *Molecular and Cellular Biology*, 23 (2), 629-635. DOI:10.1128/MCB.23.2.629-635.2003.
- Saccharomyces* Genome Database (2022, 06 Şubat). Erişim adresi: <https://www.yeastgenome.org/locus/S000002408/protein>.
- Santos,J., Fernanda Leitão-Correia, F., Sousa, M.J. ve Leão, C. (2015). “Dietary restriction and nutrient balance in aging”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-10. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/4010357>.
- Schmidt, A., Kunz, J. ve Hall, M.N. (1996). “TOR2 is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (24), 13780– 13785. DOI: 10.1073/pnas.93.24.13780.
- Smith, R.L. ve Johnson, A.D. (2000). “Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes”. *Trends in Biochemical Sciences*, 25 (7), 325–330. DOI:10.1016/s0968-0004(00)01592-9.
- Ter Schure, E.G., Van Riel, N.A. ve Verrips, C.T. (2000). “The Role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*”. *FEMS Microbiology Reviews*, 24 (1), 67-83. DOI:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00533.x.
- Thevelein, J.M. 1992. “The Ras-adenylate cyclase pathway and cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 62 (1-2), 109-130. DOI: 10.1007/BF00584466.
- Thevelein, J.M. ve Hohmann, S. (1995). “Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast”. *Trends in Biochemical Sciences*, 20 (1), 3-10. DOI: 10.1016/s0968-0004(00)88938-0.
- Trevisol, E.T., Panek, A.D., De Mesquita, J.F. ve Eleutherio, E.C. (2014). “Regulation of the yeast trehalose-synthase complex by cyclic AMPdependent phosphorylation”.

Biochimica et Biophysica Acta, 1840 (6), 1646–1650.
DOI:10.1016/j.bbagen.2013.12.010.

- Turgut Genç, T. ve Doğan G. (2019). “Effect of Nrg1 repressor on *NTH1* transcription and molecular docking of Nrg1 on *NTH1* promoter”. *Makara Journal of Science*, 23 (3), 115-124. DOI: 10.7454/mss.v23i3.11259.
- Türkel, S., Turgut, T., López, M.C., Uemura, H. ve Baker, H.V. (2003). “Mutations in *GCR1* affect *SUC2* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Molecular Genetics and Genomics*, 268 (6), 825-831. DOI: 10.1007/s00438-003-0808-4.
- Vellai, T, Takacs-Vellai, K, Zhang, Y, Kovacs, A.L, Orosz, L. ve Müller, F. (2003). “Genetics: Influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*”. *Nature*, 426 (6967), 620.
- Vendrell, A. ve Posas, F. (2011) “Sir2 plays a key role in cell fate determination upon SAPK activation”. *Aging*, 3 (12), 1163-1167. DOI:10.18632/aging.100419.
- Vyas, V.K., Berkey, C.D., Miyao T. ve Carlson, M. (2005). “Repressors Nrg1 and Nrg2 regulate a set of stress-responsive genes in *Saccharomyces cerevisiae*”. *ASM Journals, Eukaryotic Cell*, 4 (11), 1882-1891. <https://doi.org/10.1128/EC.4.11.1882-1891.2005>.
- Vyas, V.K., Kuchin, S. ve Carlson, M. (2001). “Interaction of the repressors Nrg1 and Nrg2 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Genetics*, 158 (2), 563-572.
- Watson, A.D., Edmondson, D.G., Bone, J.R., Mukai, Y., Yu, Y., Du, W., Stillman, D.J. ve Roth, S.Y. (2000). “Ssn6-Tup1 interacts with class I histone deacetylases required for repression”. *Genes Development*, 14 (21), 2737–2744. DOI: 10.1101/gad.829100.
- Wera, S., De Schrijver, E., Geyskens, I., Nwaka, S. ve Thevelein, J.M., (1999). “Opposite roles of trehalase activity in heat-shock recovery and heat-shock survival in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Biochemistry Journal*, 343, 621-626.
- Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N. (2006). “TOR signaling in growth and metabolism”. *Cell*, 124 (3), 471-484. DOI: 10.1016/j.cell.2006.01.016.
- Xie, J., Pierce, M., Gailus-Durner, V., Wagner, M., Winter, E. ve Vershon, A.K. (1999). “Sum1 and Hst1 repress middle sporulation-specific gene expression during mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*”. *The EMBO Journal*, 18, 6448–6454. DOI: 10.1093/emboj/18.22.6448.
- Yu, R., Cao, X., Sun, L., Zhu, J., Wasko, B.M., Liu, W., Crutcher, E., Liu H., 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 (1981). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22257-2>.

