

**APOPTOZ VE OTOFAJİ SİNYALLERİNİN TY1 VE TY2
PSEUDOVİRÜSLERİNDE GEN ANLATIMINA
ETKİLERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ**

Ceyda ÇOLAKOĞLU



**T.C
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**APOPTOZ VE OTOFAJİ SİNYALLERİNİN TY1 VE TY2
PSEUDOVİRÜSLERİNDE GEN ANLATIMINA ETKİLERİNİN MOLEKÜLER
ANALİZİ**

**Ceyda ÇOLAKOĞLU
0000-0002-7471-5071**

**Prof. Dr. Sezai TÜRKEKEL
(Danışman)**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**BURSA-2020
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ ONAYI

Ceyda olakoęlu tarafından hazırlanan “Apoptoz ve Otofaji Sinyallerinin Ty1 ve Ty2 Pseudovirüslerinde Gen Anlatımına Etkilerinin Moleküler Analizi” adlı tez çalışması aşığıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Sezai Türkel

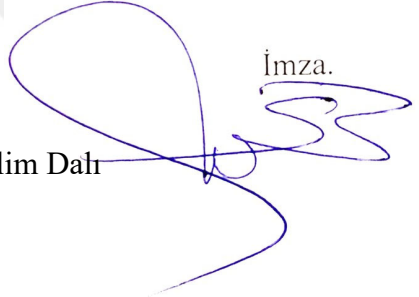
Başkan: Prof. Dr. Sezai TÜRKEİ
0000-0001-7128-6948
B.U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı


İmza.

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Figen ERSOY
0000-0003-2267-069X
B.U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı


İmza.

Üye: Doç.Dr. Bedia PALABIYIK
0000-0002-3395-3081
İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı


İmza.

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN
Enstitü Müdürü

16 / 07 / 2020

Bilimsel Etik Bildirim Sayfası

B.U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

16 / 07 / 2020

Ceyda ÇOLAKOĞLU

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

APOPTOZ VE OTOFAJİ SİNYALLERİNİN TY1 VE TY2 PSEUDOVİRÜSLERİNDE GEN ANLATIMINA ETKİLERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ

Ceyda ÇOLAKOĞLU

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sezai TÜRKEK

Saccharomyces cerevisiae retrotranspozonları incelemek için kullanılan GRAS bir mikroorganizmadır. *S. cerevisiae* genomunda Ty1-Ty5 olarak adlandırılan 5 çeşit retrotranspozon bulunur. Bu retrotranspozonlar retrovirüslere genomik açıdan benzedikleri için pseudovirüs olarak da bilinirler. Genomda sayıları sabittir ve TYA ve TYB olarak adlandırılan iki adet açık okuma çerçevesini sahiptir. TYA; VLP oluşumunu sağlarken, TYB; reverse transkriptaz, integras ve proteaz enzimini oluşturmaktadır. TYB'nin translasyonu TYA:TYB füzyon proteini olarak yapılır ve bu translasyon işlemi ribozomal çerçeve kayması ile gerçekleşir. Ty genomlarından hiçbir translasyon ve transkripsiyon faktörü kodlanmaz. Transkripsiyon ve translasyonları için tüm faktörleri virüslere benzer şekilde konak hücresi olan *S. cerevisiae*'nin faktörlerini kullanırlar. Bu nedenle mayayı etkileyen sinyallerin Ty elementlerini de etkilediği düşünülmektedir. Apoptoz programlı bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Otofaji ise protein bozunmasını indükleyen ve hücre dengesini sağlayan bir süreçtir. Üreme ortamında asetik asitle yaratılan apoptoz sinyali ve kafeinle yaratılan otofaji sinyallerinin *S. cerevisiae*'da çeşitli genlere olan etkisi bilinmektedir. Bu araştırmada; mayada deneysel olarak oluşturulan apoptoz ve otofaji sinyallerinin Ty1 ve Ty2'nin transkripsiyon ve ribozomal çerçeve kayması üzerindeki etkisi incelendi. Yapılan çalışmada; apoptoz ve otofaji sinyallerinin mutant suşlardaki Ty1 ve Ty2 elementlerinin transkripsiyonunu farklı oranlarda etkilendiği görüldü. Ty1 ve Ty2 elementlerinin transkripsiyonunun; apoptoz ve otofaji sinyali ile azaldığı belirlendi. Ty elementlerinde programlı ribozomal çerçeve kaymasının da selektif otofaji türleriyle %50 oranda azaldığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Otofaji, *S. cerevisiae*, Transkripsiyon, Ribozomal Çerçeve Kayması, Ty elementleri.

2020, XII + 65 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

MOLECULAR ANALYSIS OF THE APOPTOSIS AND AUTOPHAGY SIGNALS ON THE GENE EXPRESSIONS IN TY1 AND TY2 PSEUDOVIRUSES

Ceyda ÇOLAKOĞLU

Bursa Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Saccharomyces cerevisiae is a GRAS microorganisms used to study retrotranspozons. *S. cerevisiae* contains 5 different types of retrotransposon, known as Ty1-Ty5, in its genome. These retrotranspozons are also known as pseudoviruses because they are genomically similar to retroviruses. Their numbers are constant in the genome and have two open reading frames, called TYA and TYB. While TYA provides VLP formation, TYB forms reverse transcriptase, integrase and protease enzyme. The translation of TYB is done as TYA:TYB fusion protein, and this translational process occurs by ribosomal frameshift. There is no translation and transcription factors encoded from Ty genomes. All factors for transcription and translation use factors of *S. cerevisiae*, the host cell, similar to viruses. Therefore, the signals affecting yeast are thought to affect Ty elements as well. Apoptosis is a programmed cell death mechanism. Autophagy is a process that induces protein degradation and ensures cell balance. Apoptosis can be activated by acetic acid in yeast. Moreover, autophagy pathway can be activated by caffeine. Apoptosis and autophagy signals affects many different genes in *S. cerevisiae*. In this study, the effect of experimentally generated apoptosis and autophagy signals on transcription and ribosomal frameshift of Ty1 and Ty2 was studied in yeast. The study showed that apoptosis and autophagy signals affect the transcription of Ty1 and Ty2 pseudoviruses in mutant strains at different rates. Transcription of the Ty1 and Ty2 was determined to decrease with apoptosis and autophagy signaling. It was determined that ribosomal frameshift in Ty elements decreased by 50% with selective autophagy types.

Keywords: Apotosis, Autophagy, *S. cerevisiae*, Transcription, Ribosomal Frameshift, Ty elements.

2020, XII + 65 pages

TEŞEKKÜR

Başta, beni her daim destekleyen, tüm yanlışlarımda doğru yolu gösteren, beni bilgilendirmek, beni iyi bir akademisyen olarak yetiştirmek için hiçbir bilgisini esirgemeyen, zekasını, iyi kalpliliğini her zaman örnek ve rol model olarak aldığım, bölüm için sonsuz katkı sağlayan sayın bölüm başkanım ve danışmanım **Prof Dr. Sezai Türkel'e** ve yüksek lisans çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu tez araştırmasında kullandığımız Ty ekspresyon vektörlerini sağlayan değerli bilim insanları **Prof.Dr.P.J. Farabaugh, ve Prof.Dr. P. Lesage'a** sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak da benim her zaman iyi yerlerde olmamı isteyen ve beni mutlaka bir yerlerden izleyip gurur duyduğunu bildiğim sevgili babam **Orhan Çolakoğlu'ya**, gücüne, zekasına ve sevgisine hayran olduğum, hayata sıkı tutunmamı sağlayan sevgili annem **Hanife Çolakoğlu'ya**, dünyanın en zeki, en iyi ablaları olan ve benim hayatımı doğru şekilde yönlendirmemi sağlayan **Şeyma ve Şeyda Çolakoğlu'ya** ve son olarak hayatımda çok önemli bir yere sahip **Zeynel Bergel'e** teşekkür ederim.

Ceyda ÇOLAKOĞLU
16/ 07/ 2020

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLERİN DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nin Önemi ve Genom Yapısı	3
2.2. <i>S. cerevisiae</i> 'da Otofaji ve Kontrol Mekanizmaları.....	5
2.2.1. <i>S. cerevisiae</i> 'da mitofaji.....	7
2.3. <i>S. cerevisiae</i> 'da Apoptoz ve Kontrol Mekanizmaları	10
2.4. Ty Elementleri ve Genetik Özellikleri.....	13
2.4.1. Ty1'de transkripsiyonun kontrol mekanizmaları	18
2.4.2. Ty2'de transkripsiyonun kontrol mekanizmaları	20
2.5. Ty Elementlerinde Ribozomal Çerçeve Kayması	23
2.6. Ty Retrotranspozonlarının Temel Bilimler ve Viroloji İçin önemi	26
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	28
3.1. Araştırmada Kullanılan <i>S. cerevisiae</i> Suşları.....	28
3.2. Araştırmada Kullanılan Ty Gen Füzyonları ve Yapısal Özellikleri.....	28
3.3. <i>S. cerevisiae</i> Suşlarının Üretilmesi ve Transformasyonu	31
3.4. <i>S. cerevisiae</i> 'da Apoptoz ve Otofaji Koşullarının Oluşturulması.....	32
3.5. Ty Gen Füzyonlarında Transkripsiyon Aktivitesinin Tayini	33
4. BULGULAR.....	35
4.1. Apoptoz Uyarımının Ty Transkripsiyonuna Etkileri	35
4.2. Farklı Protein Kinazların Apoptotik Şartlarda Ty Transkripsiyonuna Etkileri.....	35
4.3. Tec1p ve Sgc1p'nin Apoptotik Şartlarda Ty Transkripsiyonuna Etkileri	37
4.4. Otofaji Uyarımının Ty Transkripsiyonuna Etkileri.....	40
4.5. Farklı protein Kinazların Otofaji Şartlarında Ty Transkripsiyonuna Etkileri.....	41
4.6. Tec1p ve Sgc1p'nin Otofaji Şartlarda Ty Transkripsiyonuna Etkileri	43
4.7. Mitofaji Uyarımının Ty Transkripsiyonuna Etkileri.....	44
4.8. Apoptoz ve Otofaji Koşullarının Ribozomal Çerçeve Kaymasına Etkileri.....	45
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	47
KAYNAKLAR DİZİNİ	51
EKLER.....	60
Ek 1: Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması.....	61
Ek 2: β - Galaktozidaz Aktivitesi Hesaplanması	63
ÖZGEÇMİŞ	64

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta, delesyon
g	Gravity (santrifuj birimi)
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
Σ	Sigma
%	Yüzde

Kisaltmalar	Açıklama
Arg	Arginin
Asp	Aspartik asit
ATG	Autophagy related gene
ATP	Adenosin tri fosfat
cAMP	Siklin adenosin monofosfat
CARD	Caspase activation and recruitment domains
CDK	Cycline dependent kinase
cDNA	Copy of their DNA
Cvt	Cytoplasm to vacuole targeting
DED	Death-effector domain
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dsDNA	Double Strand DNA
FS	Frameshift
Gag	Group specific antigen, virüs kapsit proteinini
GRAS	Generally Recognized as Safe
HIV	Human Immunodeficiency Virus
Kbp	Kilo base pair
LacZ	Beta-Galactozidaz geni
Leu	Lösin
LTR	Long Terminal Repeats
M	Molar
MAT	Mating type, <i>S. cerevisiae</i> 'da eşleşme tipi
Mbç	Mega baz çifti
MCA	Metakaspaz
Met	Metionin
mg	Miligram
mm	Milimetre
ml	Mililitre

Kısaltmalar	Açıklama
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
OD	Optical Density
ONPG	Orto Nitro Phenyl Galactoside
ORF	Open Reading Frame (Açık okuma Penceresi)
PEG	Polyetilen glikol
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PKA	Protein Kinaz A
Pol	Polimeraz
PRF	Programmed Ribosomal Frameshift
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reactive oxygen species
rRNA	Ribozomal RNA
RPM	Rotation per minute
RT	Reverse transkriptaz
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC- Ura	Urasil içermeyen sentetik tam üreme ortamı
Ser	Serin
SGD	Saccharomyces Genome Database
SDS	Sodyum dodesil sülfat
ssRNA	Single Strand RNA
TOR	Target of Rapamycin
tRNA	Taşıyıcı RNA
Ty	Transposon Yeast
URA,Ura	Uracil
VLP	Virüs-like particles
yAP	Yeast Aktivatör Protein
YE _p	Yeast Epizomal plazmit
YPK	Yeast Protein Kinase
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast extract Pepton Dextrose

ŞEKİLLERİN DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. <i>S. cerevisiae</i> haploid ve diploid hücreler için hücre döngüsü.....	5
Şekil 2.2. <i>S. cerevisiae</i> 'da otofajinin genel mekanizması.....	7
Şekil 2.3. Mitofajinin gelişimi ve mitofaji için gerekli faktörler.....	8
Şekil 2.4. <i>S. cerevisiae</i> 'da açlıkla uyarılan otofaji yolu.....	9
Şekil 2.5. <i>S. cerevisiae</i> 'da apoptoz uyarımı.....	12
Şekil 2.6. Apoptoz ve hücre döngüsünün birbiriyle olan bağlantısı.....	13
Şekil 2.7. <i>S. cerevisiae</i> 'da Ty1 elementinin elektron mikroskobu görüntüsü.....	14
Şekil 2.8. <i>S. cerevisiae</i> 'da bulunan retrotranspozonların genom yapısı.....	16
Şekil 2.9. Ty retrotranspozonlarının replikasyon döngüsü	17
Şekil 2.10. Ty1 promotor yapısı.....	21
Şekil 2.11. Ty2 transkripsiyonel kontrol elementleri.....	22
Şekil 2.12. Ty2-917 transkripsiyon kontrol bölgeleri.....	22
Şekil 2.13. Ty1 mRNA'sında ribozomal çerçeve kayması bölgesi.....	24
Şekil 2.14. Ty1 ve Ty2 elementlerinde çerçeve kayması mekanizması.....	25
Şekil 2.15. Ty1 ve Ty3'de çerçeve kayması bölgelerinin karşılaştırılması.....	25
Şekil 3.1. Ty-LacZ ekspresyon vektörlerinin genel yapısı plazmit yapısı.....	30

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. <i>S. cerevisiae</i> retrotranspozonlarının genomdaki sayıları.....	15
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşları ve özellikleri.....	29
Çizelge 4.1. Apoptoz koşullarının Ty1 ve Ty2’de gen ifadesine etkileri	35
Çizelge 4.2. Apoptoz koşullarında farklı protein kinazların Ty1’de gen ifadesine etkileri	36
Çizelge 4.3. Apoptoz koşullarında farklı protein kinazların Ty2’de gen ifadesine etkileri	37
Çizelge 4.4. Trankripsiyon faktörü Tec1p’nin Apoptoz koşullarında Ty1 ve Ty2’de gen ifadesine etkileri.....	38
Çizelge 4.5. Trankripsiyon faktörü Sgc1p’nin Apoptoz koşullarında Ty1 ve Ty2’de gen ifadesine etkileri	39
Çizelge 4.6. Apoptoz sinyalinin Ty2’de enhansır elementine etkileri.....	40
Çizelge 4.7. Otofaji uyarımının Ty elementlerinde gen ifadesine etkileri.....	40
Çizelge 4.8. Farklı protein kinazların otofaji koşullarında Ty1’de gen ifadesine etkileri	41
Çizelge 4.9. Farklı protein kinazların otofaji koşullarında Ty2’de gen ifadesine etkileri	42
Çizelge 4.10. Otofaji sinyalinin Ty2’de enhansır elementine etkileri.....	43
Çizelge 4.11. Tec1p ve Sgc1p’nin otofaji koşullarında Ty1 ve Ty2’de gen ifadesine etkileri.....	44
Çizelge 4.12. Mitofaji aktivasyonunun Ty1 ve Ty2’de gen ifadesine etkileri.	45
Çizelge 4.13. Apoptoz ve otofaji koşullarının Ty1’de ribozomal çerçeve kaymasına etkisi.....	46

1. GİRİŞ

Saccharomyces cerevisiae, tek hücreli bir ökaryottur ve tipik olarak ökaryotlarda bulunan membranlı organelleri içerir. Laboratuvar koşullarında, uygun şartlarda 90 dakikada bir bölünür. Tomurcuklanan maya *S. cerevisiae*, ökaryotik hücre biyolojisinde incelemeler için çok iyi bir model organizmadır (Duina ve ark. 2014).

LTR retrotranspozonları, sitoplazmik kapsidlerinde, reverse transkripsiyon ile RNA'larından cDNA oluştururlar ve retrovirüslerin evrimsel atalarıdır (Curcio ve ark. 2015). *S. cerevisiae*, tüm genom dizisi bilinen bir model organizma olduğundan retrotranspozonları incelemek için eşsiz bir fırsat sunmaktadır. Ty (Transposon Yeast) denilen bu elementler genomun % 1.5'ini oluştururlar (Grosshans ve ark. 2013). *S. cerevisiae*, genomu 5 farklı çeşitte retrotranspozon içermektedir. Bunlar Ty1-Ty5 olarak adlandırılır (Jordan ve McDonald 1999). Ty elementleri uzun terminal tekrar sekanslarına (LTR) göre ayırt edilirler ve bu bölgeler Ty1 ve Ty2 için delta, Ty3 için sigma, Ty4 için tau ve Ty5 için pseudo x olarak adlandırılır (Clare ve ark. 1988). Ty elementlerinde gen ifadesi transkripsiyon ve translasyon seviyesinde kontrol edilir. Translasyonel kontrol ribozomal çerçeve kayması ile kontrol edilir (Clare ve ark. 1988, Belcourt ve Farabaugh 1990). Ty transkripsiyonu promotör dizileri ve kontrol elementlerinde bulunduğu 5'LTR'de başlar ve 3' LTR'de sonlanır. 5' LTR'de tRNA^{met} için bağlanma bölgesi ve 3'LTR'de oligopürin bağlanma bölgesi içerir. Bunlar Ty elementlerinin replikasyonu için önemlidir (Youngren ve ark. 1988). Ty'lerin retrovirüslerden farkı *env* geni içermemeleridir (Boeke ve Sandmeyer 1991)

Ty elementleri iki adet açık okuma çerçevesi (ORF) içerir. Bunlar TYA ve TYB olarak adlandırılır ve retrovirüslere de bu açıdan benzerler. Bu ORF'ler retrovirüslerdeki gag ve pol bölgelerine homologdurlar. TYB ve TYA okuma bölgelerinde 38-44 bp kadar çakışık bir bölge bulunur (Clare ve ark. 1988, Belcourt ve Farabaugh 1990). TYB Ty elementlerinin replikasyonu için gereken katalitik proteinleri kodlar. Bunlar; proteaz, integras ve reverse transkriptazdır. TYA ise translasyon sonrası proteolitik olarak kesilerek hücre sitoplazmasında virüs benzeri parçacıkları (VLP) oluşturur (Curcio ve

ark. 2015). Ty elementlerinin genomda replikasyon döngüsünün retrovirüslerde olduğu gibi RNA aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiştir (Boeke ve ark. 1988).

Ty1 ve Ty2 yapısal olarak birbirlerine çok benzerler ve diğer Ty'lerden farklıdırlar. Bu TY'lerin genomları 6 kb uzunluğunda ve LTR bölgeleri ise 335 bp uzunluğundadır (Boeke ve ark. 1988, Mellor ve ark. 1985). Ty1'in transkripsiyonu haploid ve diploid hücreler arasında fark gösterir (Company ve Errede 1988). En çok çalışılan Ty'lerden olan Ty1; haploid genom başına 30 kopya, Ty2 10 kopya, Ty3 ise ve 4 kopya kadar bulunabilir. Kopya sayılarının bazı *S. cerevisiae* suşlarında ufak farklılıklar gösterdiği bilinmektedir.

S. cerevisiae programlı hücre ölümünü incelemek için avantajı olan bir model organizmadır (Gutierrez ve ark. 2010). Ty pseudovirüsleri transkripsiyon ve translasyonları için kullandıkları faktörleri konak hücreden kullandıkları için farklı hücresel streslerin Ty üzerine de etki etmesi beklenir. Daha önce apoptoz ve otofaji sinyallerinin Ty pseudovirüsleri üzerine etkisi araştırılmamıştır. Bu çalışmada apoptoz ve otofaji koşullarının Ty pseudovirüslerinin gen anlatımına etkisini incelemek amaçlandı. Bunun için Ty1 ve Ty2 elementlerinin promotor bölgelerini içeren raportör genler kullanıldı. Farklı mutant suşlar ile yapılan deneylerde bazı protein kinazların ve TY transkripsiyonunda yer alan transkripsiyon faktörlerinin apoptoz ve otofaji sinyallerine yanıt olarak Ty transkripsiyonunun kontrol edilmesinde gerekli olduğu bulundu. Protein kinazlar Tor1p ve Snf1p'in apoptoz sinyaline bağlı olarak Ty1 ve Ty2 transkripsiyonunun kontrol edilmesinde işlevleri olduğu tayin edildi. Ty1 ve Ty2'de promotor bölgesine bağlanan transkripsiyon faktörleri Tec1p ve Sgc1p'nin de apoptoz ve otofaji süreçlerinde Ty1 ve Ty2 elementlerinin transkripsiyonu için farklı derecelerde gerekli oldukları gösterildi. Ayrıca Ty1'de programlı ribozomal frameshift'in de apoptoz ve otofaji koşullarına bağlı olarak kontrol edildiği gösterildi. Elde edilen sonuçlar Ty1 ve Ty2 elementlerinde gen ifadesinin apoptoz ve otofaji sinyalleri ile farklı şekilde kontrol edildiğini göstermektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Saccharomyces cerevisiae*'nin Önemi ve Genom Yapısı

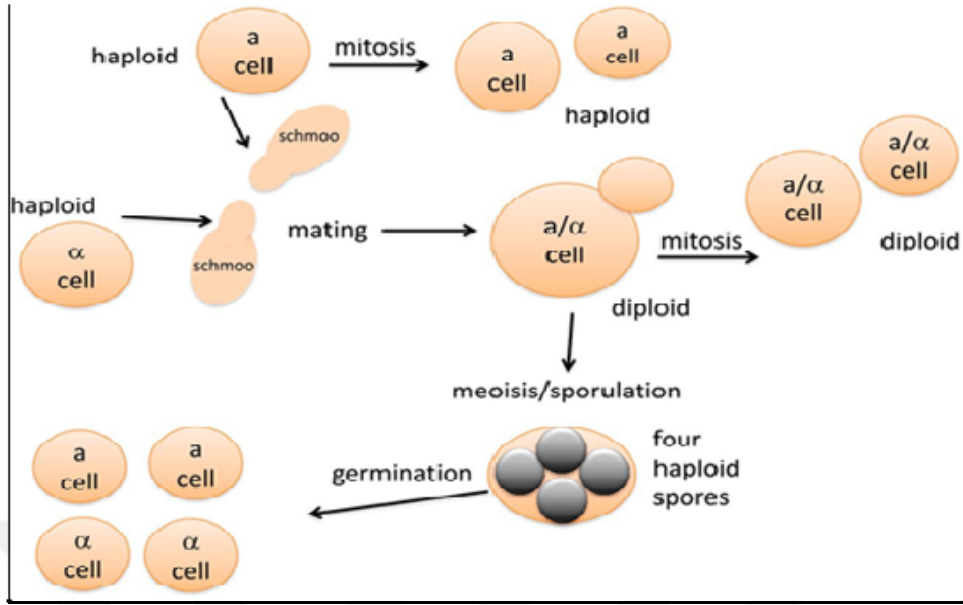
S. cerevisiae genomu sekanslanan ilk ökaryotik organizmadır. Bütün dünyada temel bilimlerde ve özellikle moleküler biyolojide çalışılan önemli bir organizmalardan biridir (Goffeau ve ark. 1996, Engel ve ark. 2014). *S. cerevisiae* genel olarak güvenli, GRAS, mikroorganizmalardan biridir. *S. cerevisiae* maya (yeast) kavramı ile özdeşleşmiştir. Maya denildiğinde genellikle de *S. cerevisiae* anlaşılır. Maya hücrelerinin çapı 5 µm'dir ve uygun petrilere ekildiğinde 3-4 gün sonra koloni oluşturabilirler. Maya stokları gliserolde -80 C'de sınırsız sürede depo edilebilir. Laboratuvarlarda kolay şekilde üretilir. Normal koşullarda yaban tip *S. cerevisiae* suşları 90 dakikada bir bölünür ve besiyerleri kolay şekilde temin edilebilir. Bu açıdan kullanım açısından oldukça avantaj taşımaktadır. Ayrıca genom boyutunun küçük olması, yaşam döngüsünün kontrol edilebilir olması da önemli avantajlarından (Goffeau ve ark. 1996). *S. cerevisiae*, birçok alanda önem taşımaktadır. Endüstriyel ve klinik çalışmalarda sık sık kullanılmaktadır. Örneğin klinikte antifungal ilaç tasarımı ve testleri için model organizma olarak kullanılmaktadır (Goffeau ve ark. 1996, Duina ve ark. 2014, Greig ve Leu 2009). *S. cerevisiae*'da temel moleküler biyoloji, biyokimya, genetik gibi alanlarda yapılan çalışmalar Nobel Tıp ve Fizyoloji, Nobel Kimya gibi farklı birçok alanda da Nobel ödülü alınmış temel çalışmalardır. Hücre döngüsü, telomer yapıları ve telomeraz işlevi, otofaji gibi temel hücresel süreçlerin moleküler bileşenleri, işleyiş ve kontrol mekanizmaları ilk kez *S. cerevisiae*'da tanımlanmıştır. Bu nedenle *S. cerevisiae* yüzyılın model organizması olarak da değerlendirilmiştir (Botstein ve Fink 2011).

S. cerevisiae genomu yaklaşık 12.068 kb uzunluktadır. Bu genomda 5885 protein kodlayan gen, 140 spesifik rRNA, 275 tRNA geni ve 16 kromozomu vardır (Anonim 2020a, Goffeau ve ark. 1996). XII. kromozomda bulunan rDNA tekrarları suşlar arasında kısa farklılıklar gösterebilir. Bu nedenle genom büyüklüğü literatürde yaklaşık olarak 12.068 kb şeklinde de verilmektedir. *S. cerevisiae*'da ayrıca 786 adet şüpheli ORF denen ORF vardır. Bunlar teknik olarak ORF'dirler fakat protein kodlama olasılığı

düşük olduğundan böyle adlandırılmıştır (Duina ve ark. 2014). Genomda ayrıca 2 mikron plazmiti, RNA virüsleri ve Ty elementleri bulunmaktadır. Protein kodlanan genlerinde intron çok azdır, intron bulunma sıklığı %4 oranındadır (Feldman 2012).

S. cerevisiae'nın en küçük 4 kromozomları; 1, 3, 6 ve 9. kromozomlardır ve bunların rekombinasyon frekansı genom ortalamasına göre fazladır. *S. cerevisiae*'da 3. kromozom hücrenin eşey tipini belirlemek için gerekli bilgileri içeren kromozomdur. Aynı zamanda *S. cerevisiae* III. kromozomu DNA ve kromozom araştırmaları tarihinde ilk sekanslanan ökaryotik kromozomdur. *S. cerevisiae* hücreleri haploid ya da diploid olabilirler. Haploid hücreler eşey tipi olarak MAT α , MAT α olabilirler. Diploid hücreler ise bu haploid hücrelerin eşleşmesi sonucu MAT α / α diploid hücrelerini oluştururlar. Diploid hücreler belirli stres koşulları altında spor oluşturabilirler (Şekil 2.1) (Feldman 2012, Duina ve ark. 2014). Haploid *S. cerevisiae* hücreleri aynı üreme ortamında olduklarında eşleşmek için a veya α faktörü salgılar. Bu faktörler salgılanıp zıt eşey tipindeki hücrede bulunan feromon reseptörlerine bağlanır ve hücre döngüsü G1 aşamasında durdurulur. Bu şekilde maya hücreleri hücre füzyonundan önce aynı hücre döngüsü aşamasında senkronize edilirler (Wilkinson ve ark. 1974, Feldman 2012). *S. cerevisiae* çok nadir olarak belirli fizyolojik koşullarda eşey tiplerini değiştirebilirler. Buna mating type switch (eşey dönüşümü) denir.

S. cerevisiae tek hücreli ökaryottur ve membrana bağlı organelleri içerir. Nükleus, endomembran sistemi, mitokondri gibi organellere sahiptir. *S. cerevisiae* hakkında tüm bilgiler SGD veri bankasında mevcuttur (Feldman 2012, Anonim 2020a). *S. cerevisiae* için her gen ürünü ve yapısı bu veri bankasında sunulur. Ayrıca YEASTRACT veri tabanında *S. cerevisiae*'nın transkripsiyon faktörleri gibi birçok bilgi elde edilebilir (Costanzo ve ark. 2014, Anonim 2020b).



Şekil 2.1. *S. cerevisiae* haploid ve diploid hücreler için hücre döngüsü (Duina ve ark. 2014).

2.2. *S. cerevisiae*'da Otofaji ve Kontrol Mekanizmaları

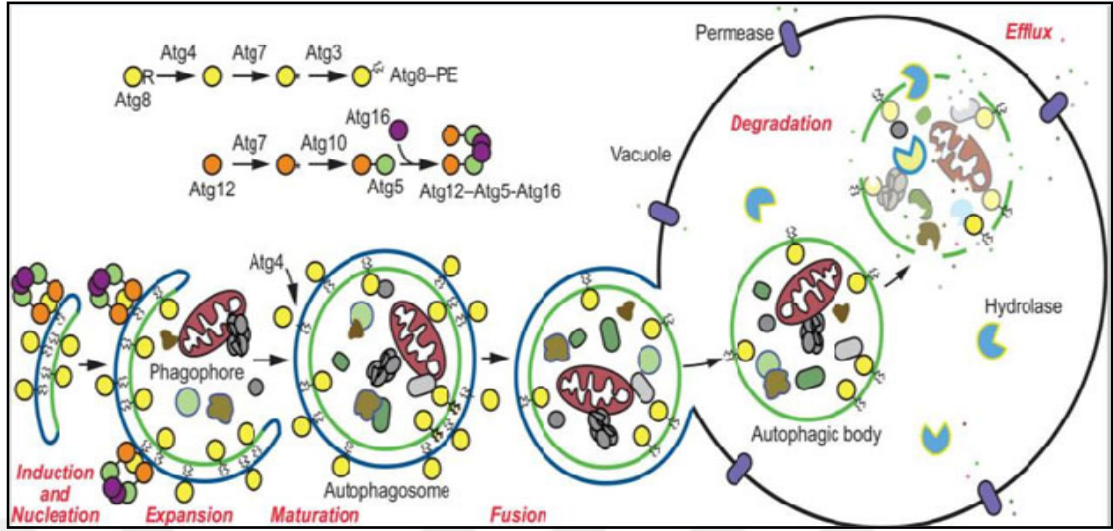
Otofaji terimi ilk defa Christian de Duve tarafından 1960'larda kullanılmıştır. Otofaji alanında moleküler düzeydeki araştırmalar ise 1990'lı yıllarda başlamıştır. Otofaji sinyalinin oluşumu ve ilgili süreçteki moleküler bileşenler *S. cerevisiae*'da ayrıntılı olarak özellikle Prof.Dr. Yohsiori Ohsumi tarafından yapılan çalışmalar ile aydınlatılmıştır (Ohsumi 2014). Bu çalışmaları sonucu Prof.Dr. Y. Ohsumi 2016'de Nobel Tıp ve Fizyoloji ödülüne layık görülmüştür. Günümüzde *S. cerevisiae*'da otofaji ile alakalı 40'tan fazla ATG (AuTophaGy related) geni ve işlevleri tanımlanmıştır (Torggler ve ark. 2017, Delorme-Axford ve Klionsky 2018).

Otofaji besin açlığı ile başlatılan ve protein bozunmasını indükleyen süreçtir (Noda ve Ohsumi 1998). Otofaji, hücre fizyolojisinin korunmasında çok önemli bir yere sahiptir. Otofajinin bir hayatta kalma mekanizması olduğu düşünülmektedir. Bu süreç, ökaryotlarda neredeyse tüm hücrelerde olabilir ve bazal düzeyde gerçekleşir. Fakat farklı koşullarda örneğin; açlık koşulları, organellerde hasar gibi durumlarda aktive olabilir. Otofajinin ayırt edici özelliği hücre sitoplazmasında çift membranlı otofagozom

oluşumudur. Otofagozom, bu sürecin son ürünüdür ve fagofor, otofagozomun öncüsüdür. Mayalarda otofagozom çapı 300- 900 nm arasında değişmektedir (Şekil 2.2) (Axford-Delorme ve ark. 2015, Karadağ 2016).

Otofajinin üç türü vardır. Bunlar; makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji olarak adlandırılırlar (Müller ve ark. 2015). Mikrotofaji ve makrotofaji arasında birtakım farklılıklar vardır. Mikrotofajide; tübüller, vakuolar membrandan lümeneye doğru giderler ve mikrotofajinin doğrudan Atg proteinlerini içermediği bilinmektedir. Bu süreçler içinde mikromitofaji, mikropexofaji gibi süreçleri de vardır. Mikrotofaji; seçici veya seçici olmayan türlere sahiptir (Axford-Delorme ve ark. 2015). Organeller, seçici olmayan otofaji ile organel hasarlanırsa ya da organel işlevinde herhangi bir sorun çıkarsa elimine edilebilirler. Örnek vermek gerekirse mayalar peroksizoma ihtiyaç duydukları bir durumdan tercih ettikleri karbon kaynağına aktarılsa peroksizomlar peksofaji süreci ile elimine edilir (Reggiori ve Klionsky 2013).

Otofajinin transkripsiyonel kontrolü farklı transkripsiyon faktörlerine bağlıdır. Bu faktörler sırasıyla Ume6p, Pho23p, Rph1p, Rim15p, Gcn4p, Gln3p, Gat1p ve Yap1p'dir. Ume6p; besin varlığında Atg8p promotorunda bağlanma bölgesine bağlanarak repressor görevi görür. *PHO23*'ün delesyonunun otofagozom oluşumunu arttırdığı ve ATG'leri upregüle ettiği görülmüştür. Rph1p histon demetilazdır. Rph1'in delesyonunun otofagozom oluşumunu arttırdığı görülmüştür. Rim15p, Ume6p ve Rph1p'i fosforile eder. Fosforilasyon sonucu bu faktörleri inhibe eder ve *ATG* genlerinin derepresyonunu sağlar. Ty1 için önemli olan transkripsiyon faktörü Gcn4p; açlık yaratıldığında aminopeptidazın verilmesinde ve ATG aracılı otofaji indüklemesinde görevlidir. Son olarak Yap1p; açlıkta *ATG15*'i pozitif düzenler ve bu faktör de lizisi kolaylaştırır (Delorme-Axford ve Klionsky 2018).

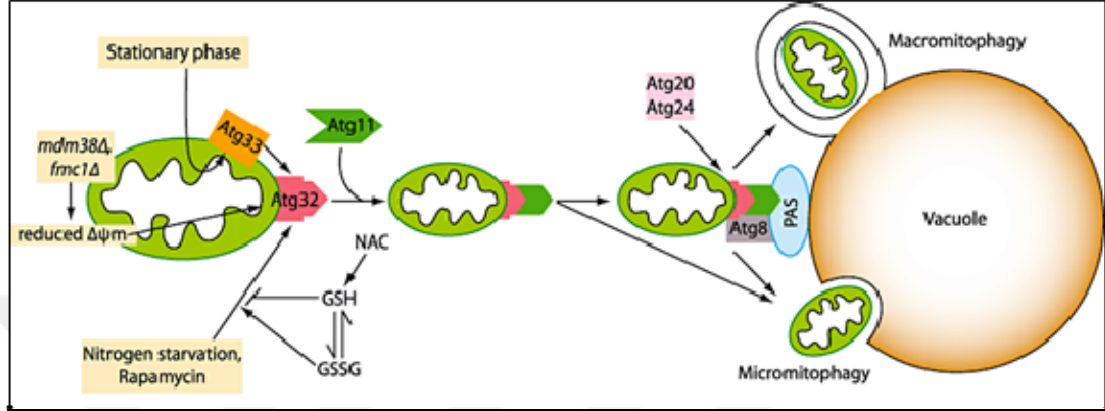


Şekil 2.2. *S. cerevisiae*'da otofajinin genel mekanizması. Şekilde otofajinin 4 temel aşaması gösterilmiştir. İlk aşamada fagofor indüksiyonu ve çekirdeklenmesi başlar. Sonraki aşamalarda fagofor büyümeye başlar ve otofagozom kapanıp formunu alır. Daha sonra otofagozom ve vokuol füzyonu gerçekleşir. Otofajik cisim oluşur ve otofaji gerçekleşir. Fagofor membranının elongation aşamasından önce Atg8p; Atg4p, Atg7p, Atg3p ile proteolitik olayları takiben Atg8-PE'ye dönüşür. Ayrıca membran uzaması için Atg12'nin şekilde görülen ubiquitin benzeri sisteme ihtiyacı vardır (Axford ve ark. 2015).

2.2.1. *S. cerevisiae*'da mitofaji

Mitokondri ökaryotik hücrelerin metabolik işlevlerinde çok fazla fonksiyonu olan çift membran yapısına sahip semiotonom bir organeldir. İç membran, dış membran ve matriksten oluşur (Mannelle ve ark. 1997). Sitrik asit döngüsü, yağ asitlerinin oksidasyonu gibi birçok hücresel işleve sahiptir. Otofaji üzerinden gidilirse mitofaji terimi ilk defa John Lemasters tarafından tanımlanmıştır (Lemasters 2005). Mitokondri organelindeki hasarlara karşı farklı bir otofaji olan mitofaji indüklenir. *S. cerevisia*'da mitofaji, fermente edilemeyen karbon kaynaklarından (gliserol laktat gibi) glukoz ortamına geçiş ile, Tor kinaz inhibitörü olan Rapamycin uygulaması ile veya azot açlığı sonucu TOR kinaz kompleksinin inhibisyonu ile sağlanabilir (Kanki ve ark. 2011, Kanki ve Klionsky 2008).

Hücre içinde düşük seviyede glutatyon bulunması da mitofajiyi engeller. Mitofaji başladığında Atg32p ve Atg11p bağlanır. Atg8p fagoforu düzenler ve bununla beraber mitofaji prosesi devam eder ve sonuçta mitokondri elimine edilir (Şekil 2.3) (Kanki ve Klionsky 2010).

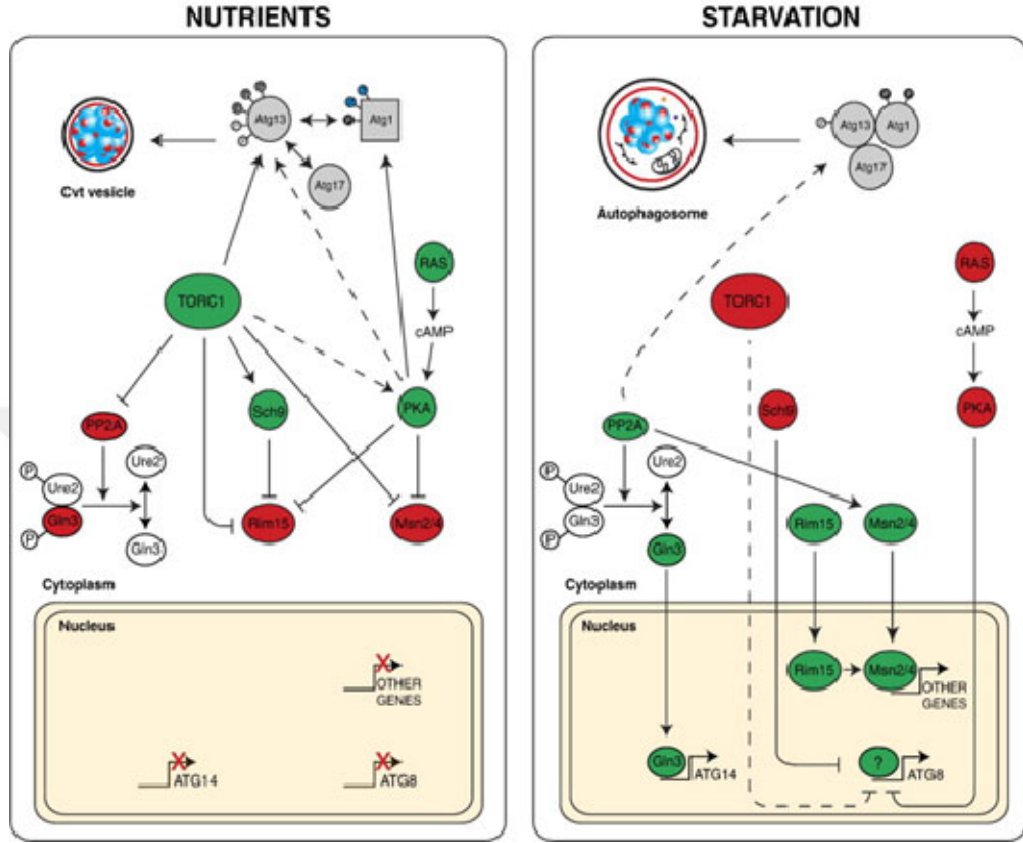


Şekil 2.3. Mitofajinin gelişimi ve mitofaji için gerekli faktörler (Kanki ve Klionsky 2010).

S. cerevisia'da yüksek cAMP konsantrasyonunun fazla olması otofajinin başlamasını baskılamaktadır. Açlık bu maya hücrelerinde yalnız otofajiyi indüklemeyi aynı zamanda hücreleri G1 fazının erken aşamalarında tutar. Bu durum memeli hücrelerine benzer. Target of Rapamycin (Tor1p) bir çeşit serin-threonin kinaz olup otofaji sinyal yolağında önemli bir paya sahiptir. Bu kinaz hücreleri stres koşullarında G1 aşamasında tutmasını sağlar (Noda ve Ohsumi 1998).

Besin varlığında Tor1 ve Ras/cAMP bağımlı PKA sinyal kaskadları aktif haldedirler. Bu halde Atg1p ve Atg13'ü hiperfosforile bir durumda tutulmaktadır. Bu durumda otofagozom yerine Cvt vezikülleri oluşur. Cvt yolu selektif otofajinin özel bir türüdür. Cvt yolunun; Ape1p; (aminopeptidaz 1), Ams1p; (α -mannozidaz 1) ve Ape4p; (aspartil aminopeptidazı) vokuollere taşıma görevi vardır. Bu enzimler daha sonra otofaji için kullanılmaktadır. Tor1p, ayrıca PP2A fosfotaz ailesine üyeleri negatif regüle ederken bir kinaz olan Sch9'u pozitif olarak regüle eder. Sonuç olarak nükleusta otofajide önemli işlevleri olan ATG8, ATG14 gibi ilgili genler baskılanır. Açlık durumunda ise PP2A aktif hale geçer ve bir çeşit stresle aktive edilen transkripsiyon faktörü olan Msn2/4p

aktif hale geçirir. Bu da nükleusta ilgili genlerin otofaji oluşumu için indüklenmesi sağlanır (Şekil 2.4) (Cobellero ve Reggiori 2009).



Şekil 2.4. *S. cerevisiae*'da açlıkla uyarılan otofaji yolu (Cobellero ve Reggiori 2009).

Bu araştırma deneysel olarak otofaji koşullarını oluşturmak için kafein kullanılmıştır. Kafein bir pürin analogudur ve yapılan çalışmalarda kafeinin belirli derecelerde kullanıldığında hücre ölüm mekanizmasını tetiklediği görülmüştür. Kafein kullanımı ile hücrede rapamicin verildiğinde çıkan etkilere benzer etkiler gözlenmiştir. Kafein ile Mpk1p fosforilasyonu gerçekleşmektedir. Tor1 kinaz kafeinin hedefidir. Aynı zamanda Pkc1p-Mpk1p kaskadını da aktive eder. Bu kaskad, Tor1p ile birlikte Ras/cAMP yolağını inhibe etmektedir ve otofajiye neden olmaktadır (Kuranda ve ark. 2006).

2.3. *S. cerevisiae*'da Apoptoz ve Kontrol Mekanizmaları

Apoptoz terimi ilk olarak 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından kullanılmıştır. Apoptoz bir programlı hücre ölümü mekanizmasıdır (Elmore 2007). Apoptoz olarak tanımladığımız bu mekanizma kaspazlar sayesinde gerçekleşir. Bu sistein proteazlar, memelilerde inaktif zimojen olarak bulunmaktadır (Alnemri ve ark. 1996, Reed 2000). Kaspazlar x-Glu-X-Asp konsensüs dizisinde aspartik asitten sonra substratları keser (Lavrik ve ark. 2005). Apoptoz insanlarda zarar görmüş hücreleri ortadan kaldırmak, embriyogenez sürecinde doku ve organ gelişiminin tamamlanması gibi birçok hücrel fonksiyona sahiptir. Apoptoz mekanizmasının hasarlanması kanser, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığa neden olur (D'arcy 2019)

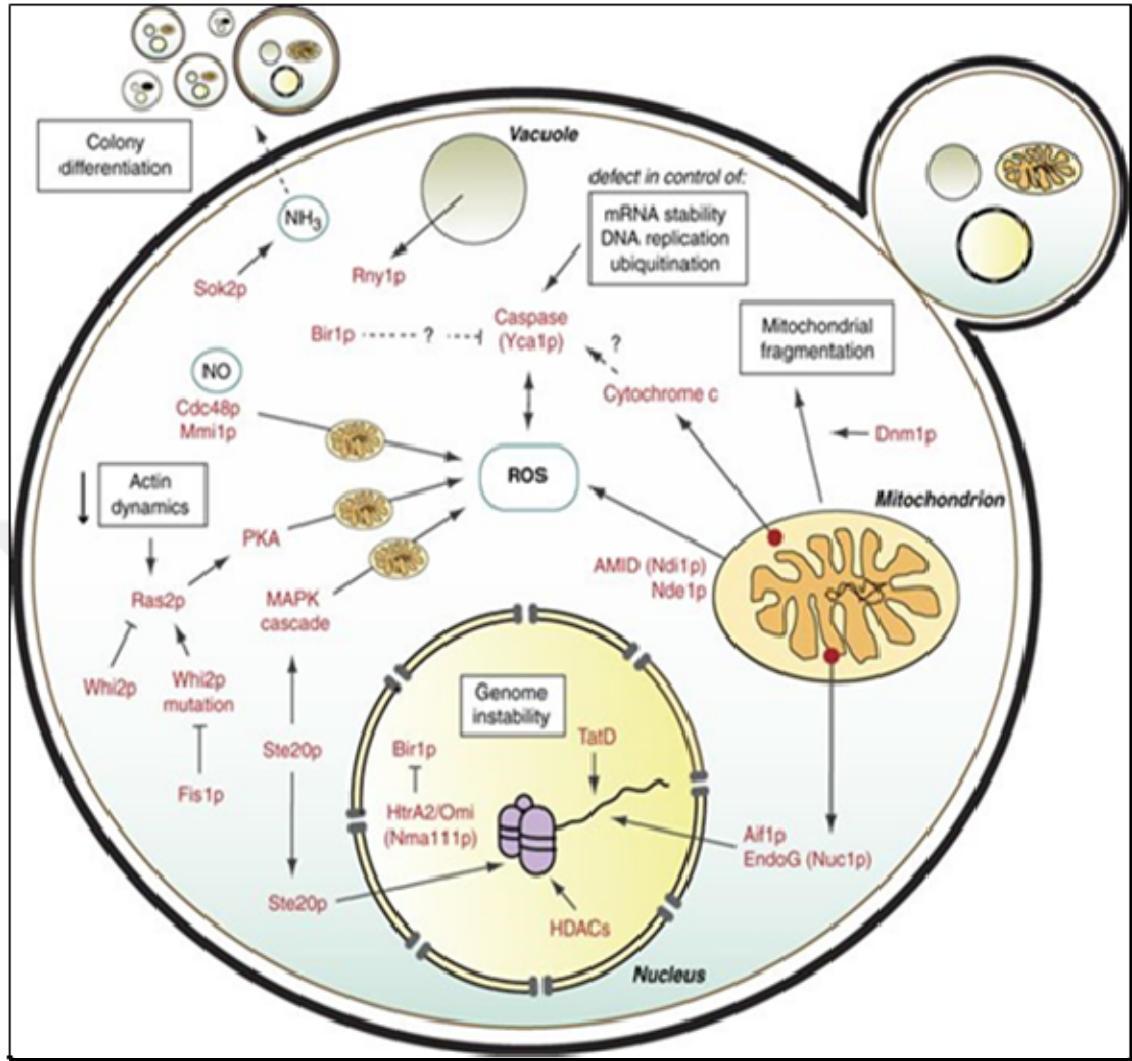
Apoptoz bütün ökaryotlarda korunmuş bir hücrel süreçtir (D'arcy 2019). *S. cerevisiae*'da da apoptoz süreci bulunmakta olup koloni oluşumu sonucunda yaşlı hücrelerde sıklıkla görülür (Jürgensmeier ve ark. 1997, Madeo ve ark. 2004, Stolz ve ark. 2011). *S. cerevisiae* genom analizinde kaspaz benzeri bir protein bulunmuştur ve bunlara metakaspazlar denilmiştir (Madeo ve ark. 2002). Metakaspazların da apoptotik uyarıyla beraber kaspaz benzeri proteolitik bir işlev üstlendiği görülmüştür. (Madeo ve ark. 2002, Mazzoni ve Falcone 2008). Maya metakaspazı Yca1p insandaki kaspazlardan farklı olarak substratları arginin ve lizinden sonra keserler (Wong ve ark. 2012). Yca1p, CARD ve DED domainlerini içermezler ve N-terminal domainlerinin prion benzeri işleve sahip domain olduğu öngörülmektedir (Lee ve ark. 2010). Yca1p'nin *S. cerevisiae*'da azalmasının ise hücrel ölümü azalttığı da görülmüştür (Madeo ve ark. 2002). Yca1p'nin prodomaini Asn/Gln açısından zengindir (Wong ve ark. 2012).

S. cerevisia'da da apoptozda bilinen ortak aşamalar gerçekleşir; DNA'nın parçalanması, kromatinlerin yoğunlaşması, fosfatidilserinlerin plazma membranına geçmesi, sitokrom c salınması, apoptotik cisimler içinde fragmentlerin oluşması ve mitokondri degradasyonunu içerirler (Madeo ve ark. 1997, Madeo ve ark 2002, Fannjiang ve ark. 2004, Koren 2006). Farklı koşullarla *S. cerevisiae*'de deneysel apoptoz uyarılabilir. Bunlar; maya üreme ortamına subletal seviyede hidrojen peroksit, asetik asit, valproik

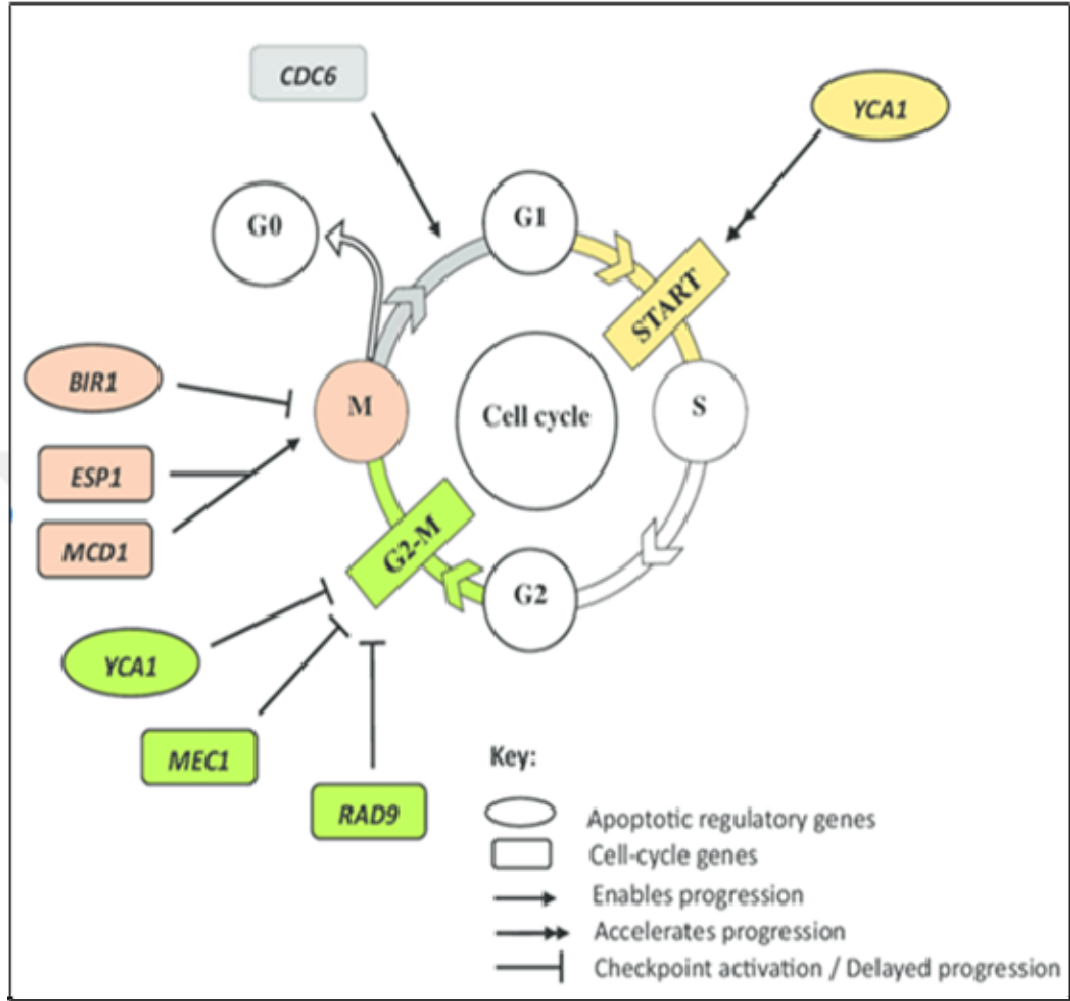
asit, arsenik gibi maddelerin ilave edilmesi veya çok yüksek molaritede sodyum klorür (1.5 M gibi) ile hiperozmotik stres oluşturulmasıdır (Mazzoni ve Falcone 2008).

Asetik asit, *S. cerevisiae*'de alkol fermentasyonunun son ürünü olarak bilinmektedir. Asetik asit maya tarafından metabolize edilememektedir ve hücrenin içine girdiğinde hücre içindeki pH'ı hücre dışındaki pH'dan daha düşük hale getirmektedir. Bu durumda pH düştüğü için, hücre içinde bir asidifikasyon ve anyon kümelenmesi oluşmaktadır. Sonuç olarak hücrenin metabolik aktivesi durmaktadır. Yapılan deneylerde asetik asidin *S. cerevisiae*'de apoptozu uyardığı bulunmuştur (Ludivico ve ark. 2001). Bu tez araştırmasında da kullanılan maya suşlarında apoptoz sürecini uyarmak için daha önceden tayin edilen seviyede asetik asit kullanılmıştır. *S. cerevisiae*'da asetik asite bağlı apoptoz süreci aquagliseroporin kanalı olan Fps1p'nin algılaması ile başlar. Hücre içine alınan asetik asit; asetat ve hidrojen iyonlarına ayrılır. Artan hidrojen iyonu, hücre içindeki pH'ı düşürür. Asitlik arttığından Pma1p'nin aktivasyonu indüklenir. Diğer yandan hidrojen iyon artışı, ROS birikimine neden olur. Mitokondriden sitokrom C salınımı ve bu da Yca1p bağımlı kaspaz veya Yca1p bağımsız kaspaz aktivasyonuna neden olur (Şekil 2.5). Bu süreç sonunda *S. cerevisiae*'da apoptoz gerçekleşir (Giannattasio ve ark. 2013).

S. cerevisiae'de hücre döngüsü ve apoptoz da birbiriyle bağlantılıdır. Yca1p, G1-S geçişini hızlandırılmış olarak, G2-M geçişini ise yavaşlatılmış şekilde uyarır. Bu bağlantılı proses ise şu şekilde ilerler: *S. cerevisiae*'de hücrel bir DNA hasarı oluştuğunda, bu hasarı onarmak ve bu onarım için zaman da kazanmak için hücrel DNA hasarı yanıt yolları Mec1p ve Rad9p gibi kontrol noktaları kinazları uyarır. Bu kinazlar, onarım için hücre döngüsünü belirli noktada tutabilen kinazlardır (Şekil 2.6). Başka bir kaspaz benzeri proteaz da Esp1p'dir. Bu proteaz da Mcd1p'nin kromatinden ayrılmasını sağlar. Ayrıca bu proteaz, hücrenin metafazdan anafaza geçişinde rol oynamaktadır. Apoptotik uyarı geldiğinde Esp1p, Mcd1p'nin ayrılmasını sağlar ve bu faktör nükleusa apoptozu uyarmak için gider (Şekil 2.6). Cdc6p tarafından CDK aktivitesi inhibe edilir. Cdc6p tarafından da bir mitotik yıkım engellenmiş olur. (Azzopardi ve ark. 2017)



Şekil 2.5. *S. cerevisiae*'da apoptoz uyarımı (Gutierrez ve ark. 2010)

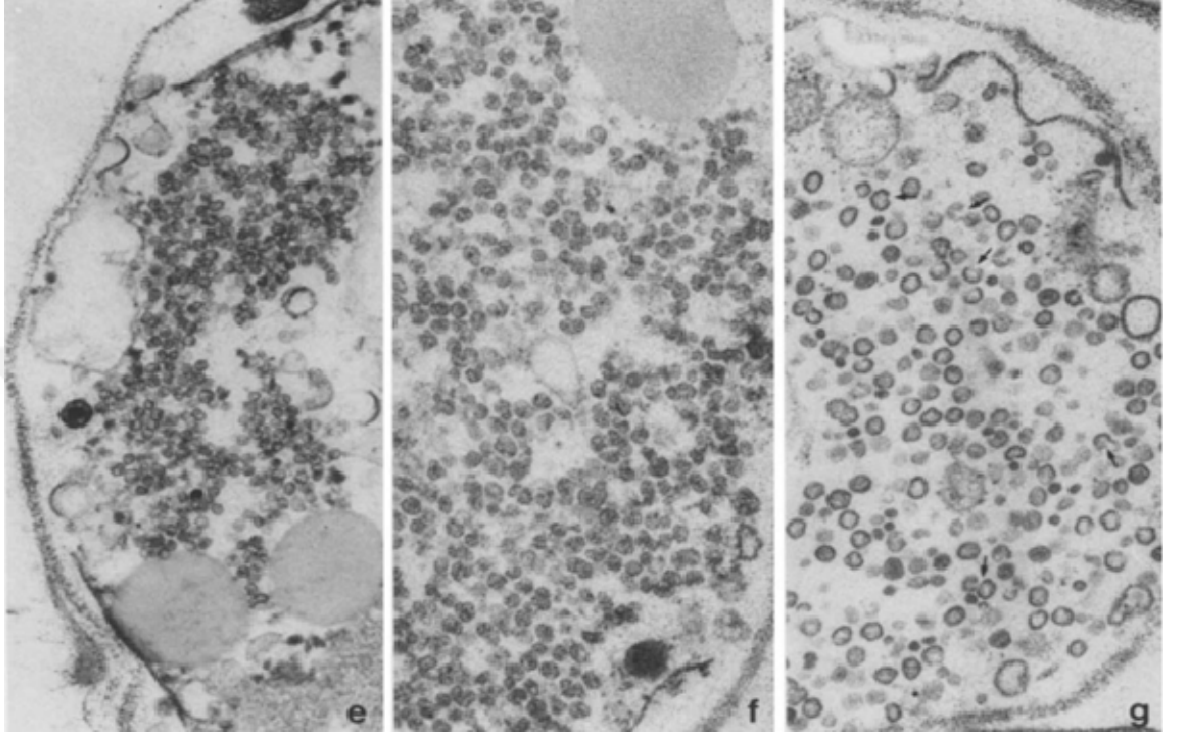


Şekil 2.6. Apoptoz ve hücre döngüsünün birbiriyle olan bağlantısı (Azzopardi ve ark. 2017)

2.4. Ty Elementleri ve Genetik Özellikleri

S. cerevisiae, retrotranspozonları çalışmak için en uygun organizmalardan biridir. Genetik yapısında Ty (Transposon yeast) olarak adlandırılan retrotranspozonlara sahiptir (Curcio ve ark. 1990). Ty'ler maya genomu boyunca farklı kromozomlarda yayılmış durumda bulunmaktadır ve retrovirüslerle birçok açıdan benzerlik göstermektedirler (Clare ve Farabaugh 1985). Maya sitoplazmasında virüs benzeri parçalar (VLP) oluştururler (Şekil 2.7). Ty elementleri *S. cerevisiae* genomunda RNA

aracılığıyla yer değiştirmektedirler (Boeke ve ark. 1985, Curcio ve ark. 1990). Her ne kadar retrovirüslere benzerliği ve evrimsel olarak ataları olduğu bilinse de retrovirüsler gibi hastalık yapıcı değildirler. Env geni içermemektedirler.



Şekil 2.7. *S. cerevisiae*'da Ty1 elementinin elektron mikroskobu görüntüsü. Oklar normal maya hücrelerindeki düzensiz parçacıkları göstermektedir (Müller ve ark. 1987).

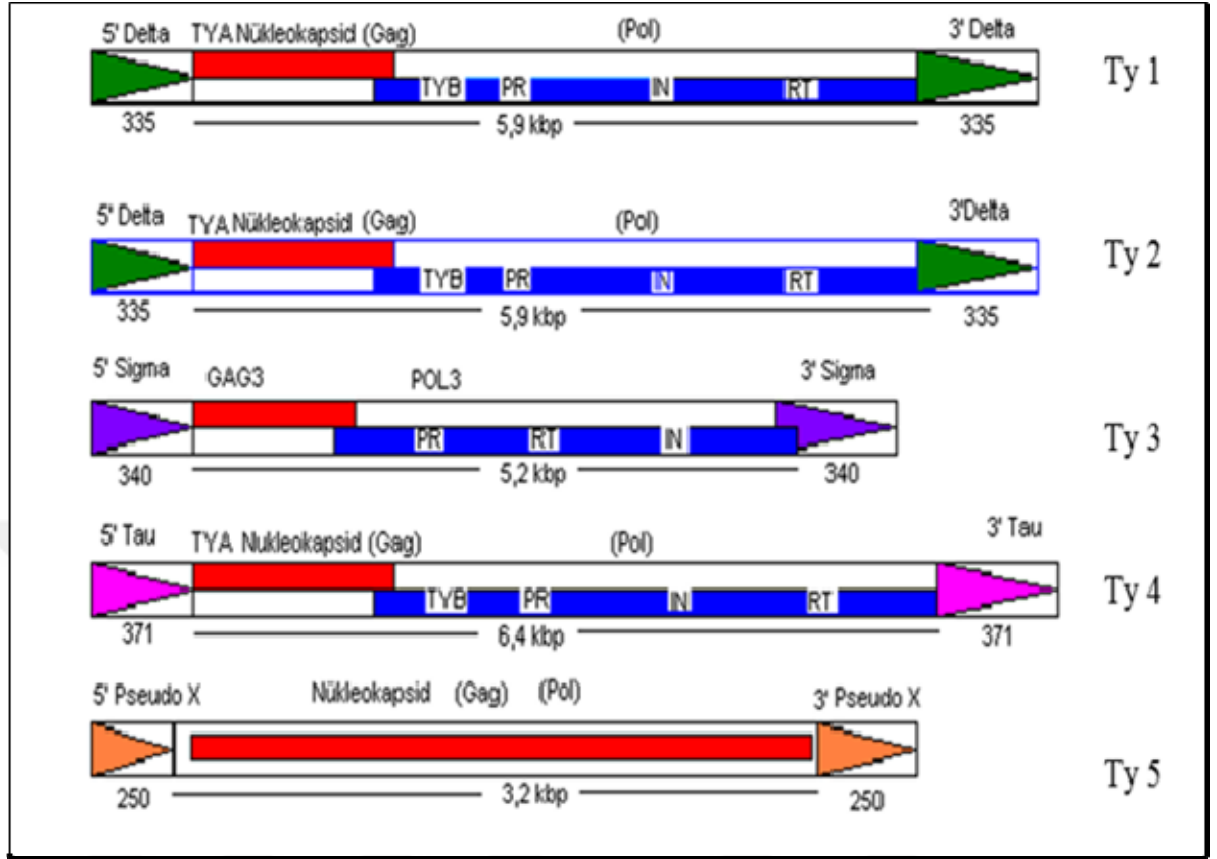
S. cerevisiae, genomunda 5 çeşit retrotranspozon bulunmaktadır. Bu retrotranspozonlar Ty1, Ty2, Ty3, Ty4 ve Ty5 olarak adlandırılırlar. Ty'ler yapısal olarak birbirlerine çok benzemektedirler, özellikle Ty1 ve Ty2 yapısal olarak neredeyse aynıdır. Fakat integrazları arasında küçük bir fark görülmektedir. Bu retrotranspozon ailesi LTR'lerine göre ayrılmakta ve karakterize edilmektedirler. Ty1 ve Ty2'nin genom büyüklüğü 6kb, LTR'leri ise 334 bp'den oluşmaktadır ve delta olarak adlandırılmaktadır. RNA genom büyüklüğü de 5.6 kb uzunluğundadır. Ty3 genomu 5.4 kb uzunluğundadır ve LTR'leri sigma olarak, Ty4 genom uzunluğu 6.3 kb'dir ve LTR'leri tau olarak, Ty5 genom uzunluğu 3.2kb'dir ve LTR'leri omega olarak adlandırılmaktadır (Cameron ve ark. 1979, Warmington ve ark. 1985, Krastanova ve ark. 2005).

Ty elementlerinin maya kromozomlarındaki insersiyonlarının birçoğu tekli (solo) LTR'ler şeklinde gerçekleşir. Bu tekli elementler farklı Ty'ler arasında LTR-LTR bölgeleri arasındaki homolog rekombinasyon sonucu oluşmaktadır (Kinsey ve Sandmeyer 1991). Ty elementlerinin tam uzunlukta ve tekli LTR'lerinin *S. cerevisiae* genomundaki kopya sayıları da bilinmektedir (Çizelge 2.1). Genomdaki kopya sayıları *S. cerevisiae* suşuna göre düşük sayıda farklılık göstermekle birlikte Ty1 çok kopyalı element diğerleri ise düşük kopya sayılı elementler olarak bilinmektedir. Ty1, haploid genomda 30-32 kopyadır ve Ty1 insersiyon için genin promotorundaki AT açısından zengin bölgeleri tercih etmektedir. Ty2 haploid genomda 10 kopya olarak bulunur. Ty3 ise genom başına 4 kopya içermektedir (Krastanova ve ark. 2005). Ty3 İnsersiyon için tRNA kodlama sekanslarının 16-19 bp upstream bölgesini tercih etmektedirler (Kinsey ve Sandmeyer 1991). Ty1 ve Ty2 arasında birtakım farklılıklar vardır. Örneğin Ty1 transpozisyonu *FUS3* geninden etkilenirken Ty2 bu genden daha az etkilenir. Ayrıca komşu genleri farklı şekillerde etkilerler (Terziyska 2003).

Çizelge 2.1. *S. cerevisiae* retrotranspozonlarının genomdaki sayıları (Jordan ve Mcdonald 1999).

Ty elementi grubu	Tam uzunluktaki Ty elementi sayısı	Tekli LTR bölgelerinin sayısı
TY1 ve TY1/2	32	185
TY2	13	21
TY3	2	39
TY4	3	29
TY5	1	6

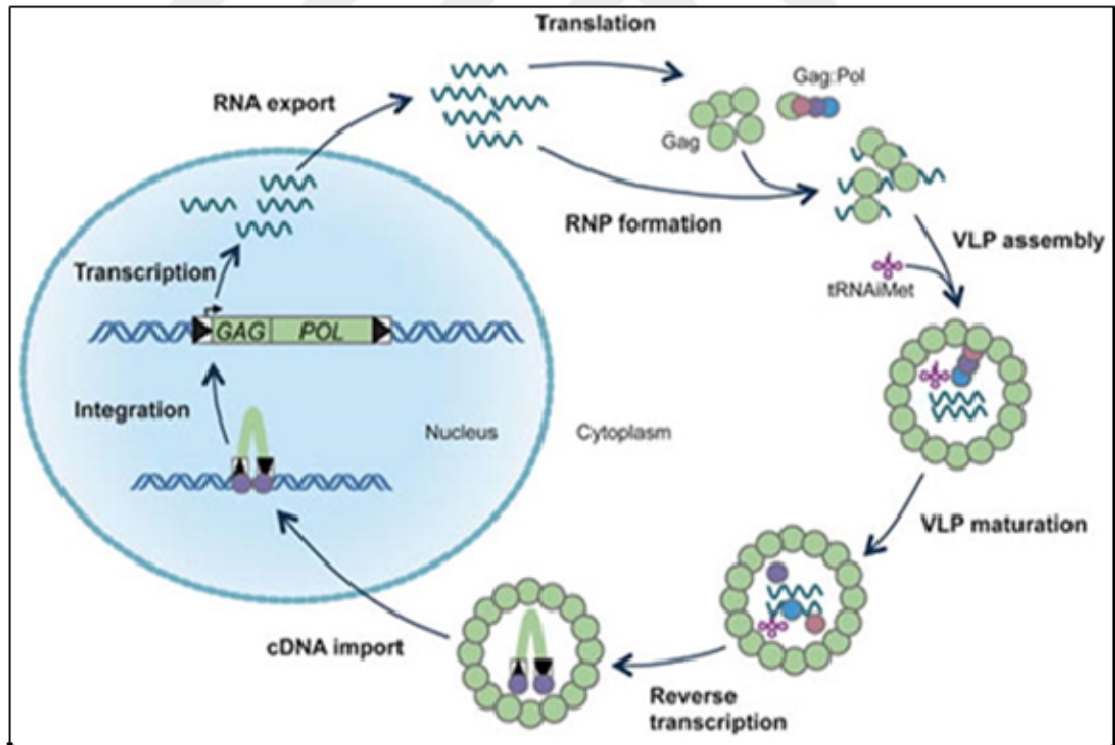
Ty elementlerin hepsi heterojen dizilere sahiptir. Bu diziler Sınıf 1 ve Sınıf 2 olarak ayrılırlar. Araştırmalar sonucunda Sınıf 1 ve Sınıf 2 için homolog olmayan bölgeler bulunmuştur. Sınıf 1; Ty1-15 olarak ve Sınıf 2; Ty1-17 olarak adlandırılmaktadır. TYA-15 ve TYA-17 açık okuma çerçevesi sekanslarında birtakım farklılıklar vardır.



Şekil 2.8. *S. cerevisia*'da bulunan retrotranspozonların genom yapısı (Bayram 2003, Farabaugh 1995).

Ty genomu iki adet ORF içermektedir. Bunlar TYA ve TYB olarak adlandırılırlar ve retrovirüslerdeki gag ve pol genlerine benzemektedirler (Cameron ve ark. 1979, Jordan ve McDonald 1999, Krastanova ve ark. 2005). TYA gag ile TYB ise pol ile homoloji göstermektedir. Ty retrotranspozonları genomda RNA Pol-II tarafından transkribe edilmektedirler. TYA;VLP oluşması için gerekli TYB; proteaz, integras ve reverse transkriptazı kodlar (Youngren ve ark. 1988, Farabaugh ve ark. 1993b,). TYB'nin translasyonu TYA:TYB füzyonu şeklinde yapılmaktadır. Bu füzyon proteini, ribozomal çerçeve kayması ile meydana gelir (Belcourt ve Farabaugh 1990). Ty elementlerinde TYA-TYB kodlama bölgelerinin kesişiminde korunmuş 14 nükleotidlik bir sekans vardır. Bu sekans ribozomal çerçeve kaymasının normal seviyede gerçekleşmesi için gerekli olan dizidir (Belcourt ve Farabaugh 1990).

Ty elementlerinin replike olması 2 şekilde gerçekleşebilmektedir. İlk olarak mitotik döngünün S fazında integre olarak bulundukları kromozom DNA'sı ile çoğalabilir. Alternatif olarak Ty genomunun VLP'ler aracılığıyla genoma integre olduğu süreç ile gerçekleşebilir (Krastanova ve ark. 2005). Bu süreç nükleustaki transkripsiyon ile başlamaktadır. Ty genomu tek transkript olarak nükleusta RNA Pol-II tarafından transkribe edilir. Ty mRNA'ları diğer hücresel mRNA'lar gibi polyA kuyruğu taşır. Transkribe edilen mRNA, nükleustan sitoplazmaya export edilir. Bu süreci takiben sitoplazmada translasyon gerçekleşir ve TYA (Gag), ve TYA-TYB (Gag-Pol) füzyon proteini transle edilmiş olur. VLP'ler TYA'nin proteolitik olarak daha küçük birimlere kesilmesi ile oluşturulur. TYA-TYB polipeptidinin proteolitik kesimi sonucu ise proteaz, reverse transkriptaz ve integras oluşur. VLP içine 2 adet mRNA, bir adet metRNA, proteaz, reverse transkriptaz ve integras paketlenir. Reverse transkriptaz ile mRNA cDNA'ya dönüştürülür ve Ty, genoma tekrar integre olur (Şekil 2.9)(Curcio ve ark. 2015).



Şekil 2.9. Ty retrotranspozonlarının replikasyon döngüsü (Curcio ve ark. 2015)

2.4.1. Ty1'de Transkripsiyonun Kontrol Mekanizmaları

Ty1 retroranspozonları, yapısal olarak retroviral provirüslerle homologdurlar. Yapılan ilk çalışmalarla karakterize edilen Ty1 elementlerinden biri de Ty1-H3'tür. 5' ve 3' uçlarda direkt tekrar dizileri (LTR) içerir. Ty1 LTR'leri delta olarak adlandırılmaktadır. Ty1 genomunda TYA ve TYA-TYB olarak 2 adet açık okuma çerçevesi (ORF) vardır ve bu ORF'ler 38 nükleotitik kısmı çakışmaktadır (Curcio ve ark. 2015).

Ty1 retrotranspozonunun maya genomunda insersiyonu birkaç faktörün kontrolü altındadır. Bunlar eşleşme tipi ve invaziv/filament büyüme MAP kinaz yolağıdır. Çiftleşme tipi kontrolde daha önce de bahsettiğimiz haploid, diploid hücrelerde ifade seviyesiyle bağlantılıdır. Ty1 transpozonunun ifadesi haploid hücrelerde diploide göre daha fazladır. $\alpha 1/\alpha 2$ heterodimerik represör protein Ty1 transkripsiyonunu diploid hücrelerde önemli derecede baskılar. Bu represör proteinin Ty1'de kodlama bölgesinde yer alan 815-927 bç konumunda yer alır (Errede ve ark. 198, Jiang 2002). Ty1 transkripsiyonu invaziv büyüme için de gerekli olan Ste11, Ste7 ve kss1 kinazları ve Ste12, Tec1 transkripsiyon faktörleri tarafından da kontrol edilmektedir (Jiang 2002).

Ty1 transkripsiyonu promotor bölgesi olan 5' LTR'de yer alan U3- R bölgesinde başlar ve 3'LTR'nin R-U5 bölgesinde sonlanır. RNA POL-II tarafından Ty1 genomundan yapılan bu tek transkript 5640 nükleotidlik polyA içeren mRNA'dır. RNA sentezini başlatan transkripsiyon başlama noktası 5' LTR'da TPyGA denilen sekansta lokalize olmuştur (Curcio ve ark. 2015, Krastanova ve ark. 2005). Ty1 promotor bölgesi olan 5' LTR'da T1 ve T2 olarak adlandırılan ve transkripsiyon başlama noktasının yukarısında yer alan iki TATA kutusu transkripsiyon için gereklidir. Eğer aynı anda bu bölgelerde mutasyonlar gerçekleşirse Ty1 transkripsiyonu gerçekleşemez. Ty1 mRNA'sı poliA kuruğu da içeren polyA⁺ mRNA'dır (Yu ve Elder 1989). Ty1'de kodlama bölgesi 3' ucunda bulunan AAUAAA dizisinin transkripsiyonun sonlanması için gerekli olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca *S. cerevisiae*'da sonlanma için gerekli olan bazı sekanslar bulunmuştur.

Ty1 transkripsiyonu birçok transkripsiyon faktörü tarafından kontrol edilir. Bu faktörlerin Ty1 promotorunda bağlandığı sekanslar da bilinmektedir. Bunlar; Ste12, Tye7, Tec1, Mcm1, Rap1, Tea1/Ibfl, Gcn4, Gcr1, Mot3'dür. Ayrıca Ty1 transkripsiyonunda kromotin yapısını değiştiren faktörler olan Swi/Snf, SAGA ve ISWI gibi faktörler de yer alır. SAGA; SPT/Ada/GCN5'ten oluşan bir komplekstir ve bir histon asetiltransferaz kompleksidir (Curcio ve ark. 2015). Bu faktörlerden bazılarının moleküler özellikleri ve işlevleri aşağıda özetlendiği gibidir ve şematik olarak Ty1 promotorundaki konumları da Şekil 2.10'da verilmiştir. .

Ste12: MAPK sinyal yolağı tarafından aktive edilir, psödohifsel ve invaziv büyüme için gerekli olan genleri aktive etmektedir ve Tec1p ile bağlantılı bir transkripsiyon faktörüdür. *S. cerevisiae*'da Ty1 transkripsiyonu için STE7 ve STE12 gen ürünleri gerekmektedir. Ty1'de bu gen ürünlerine ait aktivatör sekansı bulunmuştur (395-401 bç konumu). Yapılan deneylerde STE7 ve STE12 geni mutasyonu olduğunda Ty1 transkripsiyonunun azaldığı görülmüştür (Company ve ark. 1988). Bu sekanslar transkripsiyon düzenleme bölgesindedir (Errede ve ark. 1987).

Sgc1 (Tye7): Serin açısından zengin bir proteindir ve glikolitik genler için de gerekli bir transkripsiyon faktörüdür. Adenilik nükleotitlerin tükenmesine yanıt olarak oluşan Ty1 aktivasyonu için gerekli bir aktivatördür. Ty1 promotorunda 3 adet Tye7 bağlanma bölgesi bulunmaktadır (463-468, 661-666 ve 727-732 bç konumları) (Servant ve ark. 2012).

Tec1: Filemantasyon ve Ty1 transkripsiyonu için gerekli transkripsiyon faktörüdür. Ty1'de 418-422 bç konumundaki sekansa bağlanır. Ste12p ve Tec1p birlikte çalışmaktadır (Lalaoux ve ark. 1990).

Mcm1: Feromon yanıtında yer alan transkripsiyon faktörüdür ve hipoksiye cevap olarak sitozolde bulunur. Ty1'de Mcm1 için bağlanma bölgesi 833-848 bç konumunda yer alır ve Ty ekspresyonu için gereklidir (Yu ve Fassler 1993, Curcio ve ark. 2015).

Rap1: *S. cerevisiae*'da çok bol bulunan çok işlevi olan represör aktivatör proteindir. DNA bağlayıcı transkripsiyon faktörüdür. Ty1'in düzenleyici bölgesinde Rap1p'ye ait bağlanma yerleri bulunmuştur (911-923 bç konumunda). Ty1 gen ekspresyonunda önemli yere sahiptir. Ayrıca Mcm1 ile Rap1p'nin kompleks oluşturduğu çalışmalarca gösterilmiştir (Gray ve Fassler 1993).

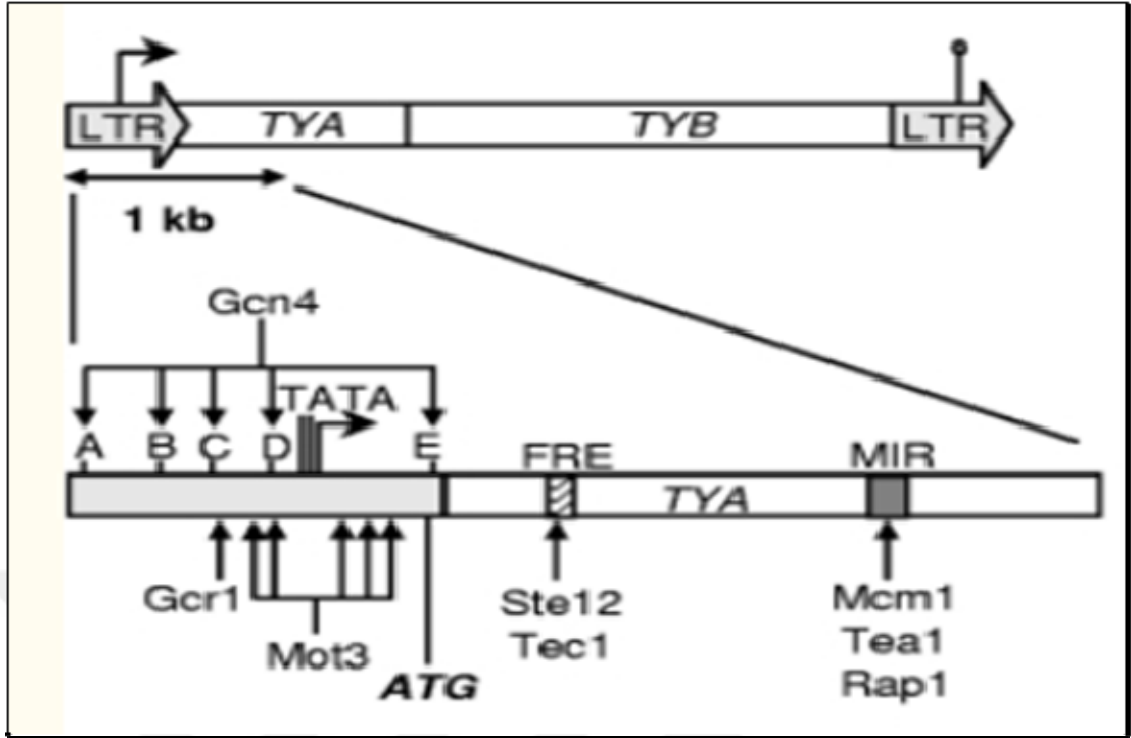
Tea1/Ibf1: Tea1; enchansır aktivatörü ve enchancır aracılı Ty1 transkripsiyonu için gereklidir. Tea1'in Ty1 genomunda kısmen palindromik bir dizi olan CGGN_xCCG dizisine bağlandığı ve bu dizinin enchansır bölgesinde yer aldığı gösterilmiştir. Bağlanma bölgesinin ise Rap1p ve Mcm1p'nin yanında olduğu gösterilmiştir (884-899 bç konumunda) (Gray ve Fassler 1996).

Gcn4: Aminoasit açlığına göre düzenlenen transkripsiyon aktivatörüdür. Gcn4p ekspresyonu hem transkripsiyon hem de translasyonel seviyelerinde iyi şekilde düzenlenir. Ty1 elementlerinde 5 adet Gcn4 bağlanma bölgesi bulunmuştur (12-17, 79-84, 98-103, 155-160 ve 318-323 bç konumunda) ve Ty1 transkripsiyonunu aktive etmektedir. Gcn4, Swi/Snf ve SAGA ile etkileşime girmektedir. Gcn4'ün bu kompleksler ile birlikte Ty1 transkripsiyonunu kontrol etmektedir (Morillon ve ark. 2002).

Mot3: Hiperozmotik stresle gerekli genleri aktive eden transkripsiyonel represördür. Gcn4, Gcr1, Ste12 ve Tec1 Ty1 transkripsiyonu için aktiavatör iken Mot3p bir represördür. Ty1 promotorunda birçok bağlanma yeri belirlenmiştir (Servant ve ark. 2008, Curcio ve ark. 2015).

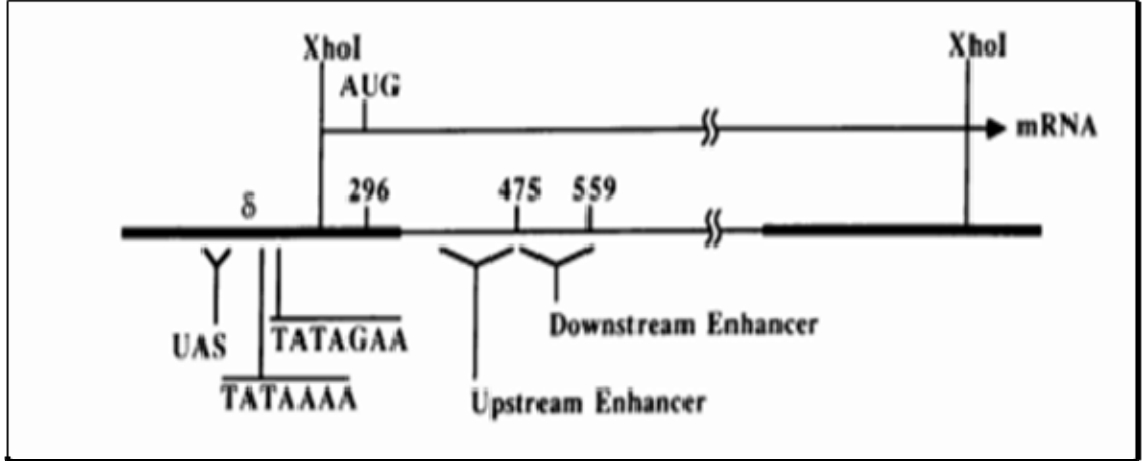
2.4.2. Ty2'de Transkripsiyonun Kontrol Mekanizmaları

Ty2'nin genetik yapısı Ty1'e oldukça benzemektedir. Genom yapıları büyük oranda homoloji göstermektedir. Genom büyüklüğü 6kbç'dir ve LTR'leri 334 nükleotitten oluşur. LTR bölgeleri delta olarak adlandırılır. Birçok maya suşunda haploid genom başına 10 kopya olarak bulunur (Krastanova ve ark. 2005)



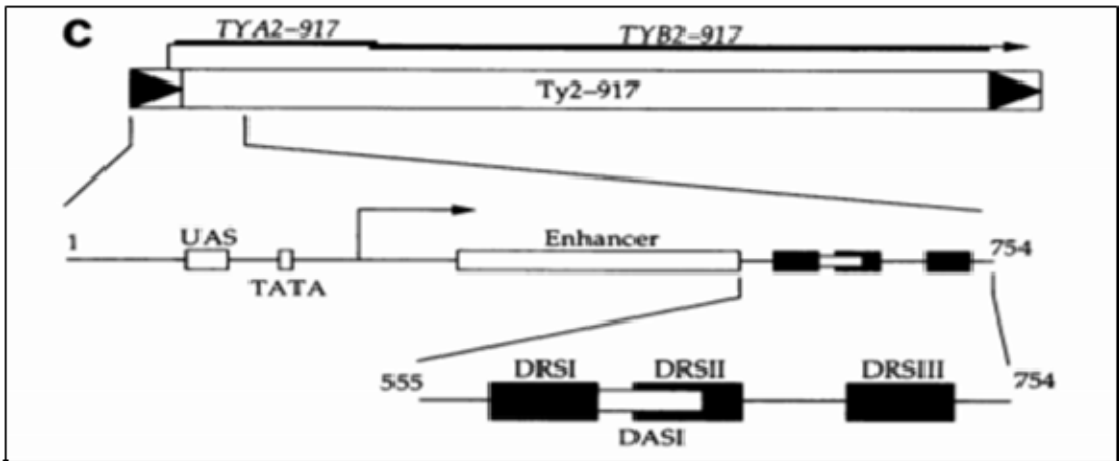
Şekil 2.10. Ty1 promotor yapısı (Servant ve ark. 2008).

Ty2 transkripsiyonu 5' LTR'de 240 bp'lık kısımda başlar ve 3'LTR'de 285 bp'lık kısımda sonlanır. Ty2 transkripsiyonu için gerekli olan düzenleyici faktörlerin yapılan çalışmalarla; UAS (Upstream Activation Sequence), TATA kutusu ve kodlama bölgesinde yer alan enhancer bölgesi ile yine kodlama bölgesinde yer alan negatif düzenleyici bölgeler olduğu gösterilmiştir (Farabaugh ve ark. 1989, Türkel 1994). Ty2'de transkripsiyon kontrol bölgeleri Şekil 2.11 ve Şekil 2.12'de verilmiştir. Ty2 de TATA dizisi, transkripsiyon başlama noktasına 74 bp uzaklıkta yer almaktadır. UAS sekansında birden çok transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi yer alır ve Ty2 için maksimum transkripsiyonu sağlamaktadır (Liao ve ark.1987, Farabaugh ve ark. 1993a).



Şekil 2.11. Ty2 transkripsiyonel kontrol elementleri (Liao ve ark. 1987).

Ty2’de başlangıç nükleotidine göre (+1. nt e göre) 5’-555-754-3’ bç aralığında yer alan ve DRS1, DRS2 ve DRS3 (Downstream Repression Sites) olarak adlandırılan 3 adet represör bölgesi bulunmaktadır (Şekil 2.12). Bunlar negatif kontrol bölgeleri olup Ty2’de transkripsiyonun baskılanmasına neden olurlar. Ancak bu bölgelere bağlanan represör proteinler henüz tanımlanmamıştır (Turkel ve Farabaugh 1993, Liao ve ark. 1987). Viral genomlarda genom yapılarının kompakt olması, promotor bölgelerinin de buna bağlı olarak kısa olması dolayısıyla kodlama bölgesinde de transkripsiyon kontrol elementlerini olması normal olarak görülen bir durumdur.



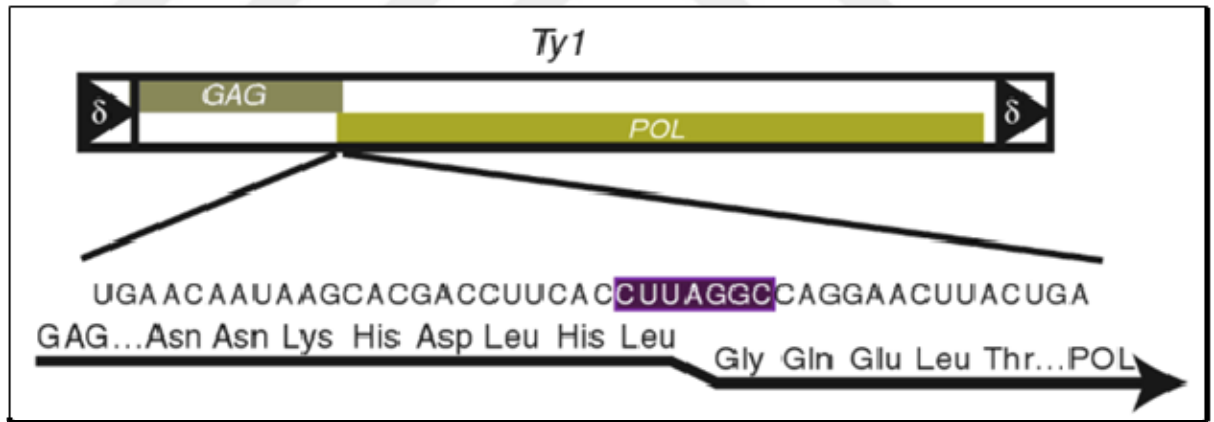
Şekil 2.12. Ty2-917 transkripsiyon kontrol bölgeleri (Türkel ve Farabaugh 1993).

Ty2'de enhancer ve UAS bölgeine bağlanıp Ty2 transkripsiyonunu aktive eden en önemli faktör Gcr1p'dir. Gcr1p *S. cerevisiae*'da çok sayıda gen ifadesinin aktivasyonundan da sorumludur (Lopez ve Baker 2000). *GCR1* geni delesyonu olan mayada Ty2 transkripsiyonu 100 kat azalmıştır (Türkel ve ark. 1997). Ty2 transkripsiyonu için birkaç transkripsiyon faktörü daha tanımlanmıştır. Bunlardan SNF2, SNF5 ve SNF6; faktörleri Snf/Swi kompleksinin altbirimleridir. Snf/Swi bütün ökaryotlarda korunmuş kromatin modifiye edici faktör olup hedef kromozom bölgelerinde nükleozom yerleşimini kontrol eder. Ty2 transkripsiyonu SNF2, SNF5 ve SNF6 mutasyonları sonucu da önemli ölçüde azalmaktadır (Happel ve ark. 1991). Ayrıca bir çeşit histon asetil transferaz enzimi olan SAGA kompleksinin de Ty2 transkripsiyonunun kontrolünde yer aldığı bilinmektedir (Türkel ve Yenice 2006). Genel olarak değerlendirildiğinde Ty2 de transkripsiyon hem belirli bölgelere spesifik olarak bağlanan transkripsiyon faktörleri ve hem de kromatin yapısını değiştiren faktörler tarafından kontrol edilmektedir.

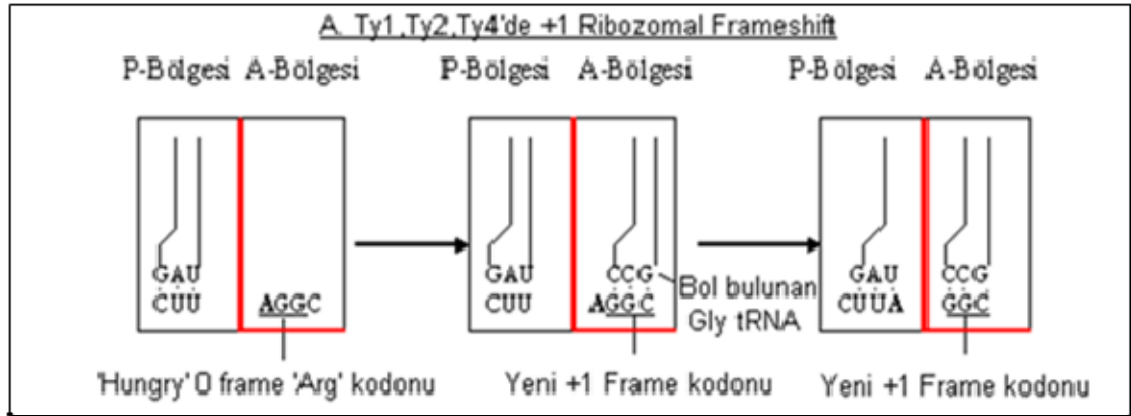
2.5. Ty Elementlerinde Ribozomal Çerçeve Kayması

Programlı ribozomal çerçeve kayması (PRF) mekanizması; özellikle retrovirüsler tarafından kullanılan ve aynı mRNA'dan farklı oranlarda peptid kodlanmasını sağlayan mekanizmadır (Lawler ve ark. 2001, Farabaugh 1995). PRF bazı ökaryotik genlerde de görülmektedir, bunlardan birisi de telomeraz alt biriminin kodlandığı *EST3* genidir (Morris ve Lundblad 1997). Retrovirüslerde Pol genleri, Gag-Pol füzyon proteinleri olarak transle olmaktadır (Dinman ve ark 1991). Retroviral mRNA'da Gag-Pol polipeptidi kodlama bölgesinin kesişim bölgesinde (frameshift site olarak adlandırılır) ribozomal çerçeve kaymasının gerçekleşebilmesi için birkaç nükleotitlik bir dizi içermektedir. (Lawler ve ark. 2001). Bu bölge Ty1 ve Ty2 elementlerinde TYA ve TYB açık okuma çerçevesi 38 bp'lik kısımda çakışmaktadır (Clare ve ark. 1988, Belcourt ve Farabaugh 1990). Bu 38 nt'lik sekansda Ty1 ve Ty2'de çerçeve kayması için gerekli ana nükleotidlerin ise 7 nükleotitlik oluşan CUU-AGG-C dizisidir (Şekil 2.13). Bu CUU-AGG-C sekansında herhangi bir değişiklik yapıldığında çerçeve kaymasının çok büyük oranda azaldığı gösterilmiştir. Ty1 ve Ty2'de çerçeve kaymasının etkin bir

şekilde gerçekleşmesi için bu nükleotid dizisine ek olarak translasyon sırasında bu kodonları tanıyan spesifik tRNA'ların da gerekli olduğu bulunmuştur. Ty1 veya Ty2 mRNA'sının translasyonu sırasında çerçeve kaymasının olduğu sekansda translasyon elongasyonu sırasında bu kodonların okunması sırasında ribozomlarda tRNA bağlanmasındaki gecikme dolayısıyla ribozomların +1 nükleotidlik kayması ile okuma çerçevesinde değişiklik olur. Kodon okunmasındaki gecikmenin moleküler nedeni ise ilgili tRNA konsantrasyonunun düşük olmasıdır. Bu tRNA'nın AGG kodonunu tanıyan tRNA-Arg olduğu bulunmuştur. AGG kodonuna tRNA'nın bağlanamaması dolayısıyla oluşan gecikme sırasında tRNA-Leu CUU kodonundan yeni çerçevede UUA kodonuna kayar ve translasyon yeni çerçevede Pol polipeptidinin translasyonu ile devam eder (Şekil 2.14). Dolayısıyla Ty1 ve Ty2'de Gag-Pol kesşim bölgesinde normal translasyon çerçevesi CUU-AGG-C iken tRNA'nın +1 nükleotid kayması sonucu UUA-GGC olarak gerçekleşir. GGC kodonu glisin amino asidi kodonudur. Bu durumda Gag-Pol füzyonunun translasyonu da TYB (POL) geni kodlama bölgesi sonundaki stop kodona kadar devam eder (Şekil 2.13) (Belcourt ve Farabaugh 1990).



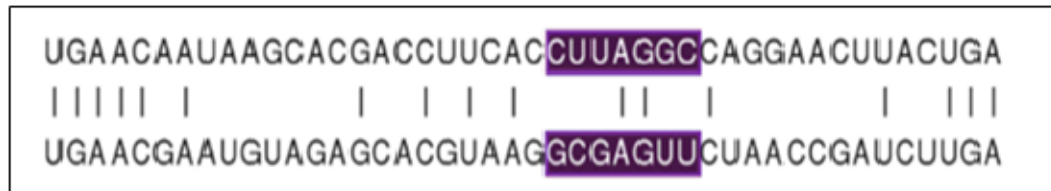
Şekil 2.13. Ty1 mRNA'sında ribozomal çerçeve kayması bölgesi. Ana nükleotidler (Core sequence) mor ile gösterilmiştir (Farabaugh 2010)



Şekil 2.14. Ty1 ve Ty2 elementlerinde çerçeve kayması mekanizması (Bayram 2013'a göre Belcourt ve Farabaugh 1990).

Ribozomal çerçeve kayması oranı farklı mRNA'larda farklı oranlarda gerçekleşir. Bu oran maya suşlarına göre de değişiklik gösterir. Ty1'de PRF %25-40 kadar olabilir. Diğer ifade ile translasyon sırasında Gag-Pol kesişim bölgesindeki frameshift kodonlarında her 100 ribozomdan 75'i keyma gerçekleşmeden translasyona devam ederek translasyonu Gag kodlama bölgesi stop kodonunda durdurur ve sadece Gag polipeptidi sentezlenir. Ancak translasyon yapan ribozomlardan 25'i ise kodon okuma çerçevesini değiştirerek Gag-Pol füzyon peptidini sentezler (Farabaugh 2010). Ribozomal çerçeve kayması oranı Ty3 için %4-5 kadardır (Farabaugh ve ark. 1993, Türkel 2016).

Ty3 ribozomal çerçeve kayması için gerekli dizi ise Ty1'den farklı olarak GCG-AGU-U dizisidir (Şekil 2.15). Ty3 ribozomal çerçeve kayması moleküler mekanizması farklıdır ve hücrel sinyallere bağlı olarak da kontrol edilir (Türkel 2016).



Şekil 2.15. Ty1 ve Ty3'de çerçeve kayması bölgelerinin karşılaştırılması (Farabaugh 2010).

2.6. Ty Retrotranspozonlarının Temel Bilimler ve Viroloji İçin önemi

Transpozonlar konak organizmanın genomunda yer değiştiren hareketli DNA parçalarıdır. İlk olarak mısır bitkisinde B. McClintock tarafından yapılan çalışmalarla bulunmuştur (McClintock 1950, Voytas 1996). Ökaryotik DNA transpozonları DNA aracılı ve RNA aracılı olarak iki sınıfa ayrılmaktadırlar (Marco ve Marin 2009).

S. cerevisiae retrotranspozonları RNA aracılı olarak genomda yer değiştirirler. Bu elementler retrovirüslerde gen ifadesi ve genom replikasyonunun moleküler prensiplerini analiz etmek için model moleküler sistemler olarak kullanılmaktadır. Retrovirüslerde ve hücrel genlerde de görülen programlı ribozomal çerçeve kaymasının moleküler prensipleri büyük oranda Ty'ler kullanılarak ortaya çıkarılmıştır (Farabaugh 1996). Ayrıca retrovirüslerde genomik RNA'nın (gRNA) replikasyonu ve bundan oluşan cDNA'nın integrasyon aracılığı ile nükleer por kompleksinden geçişi ve genomda kromozomal integrasyonu da yine model retroviral sistemler olarak Ty elementleri kullanılarak açıklanmıştır (Sultana ve ark. 2017).

Ökaryotik retrotranspozonlar retrovirüslerin evrimsel ataları olarak değerlendirilmektedir (Curcio ve ark. 2015). Bu yüzden retrotranspozonlarla yapılan çalışmalar, retrovirüslerin sahip olduğu mekanizmaları aydınlatmak için oldukça önem taşımaktadır. Ty3 genom organizasyonu HIV virüsüne benzemektedir. Ancak HIV'den farklı olarak Ty3'de Env polipeptidini kodlayan gen bölgesi bulunmamaktadır. Ty3'te yapılacak çalışmalar retroviral Env geninin evrimini çalışmak için kullanılabilir (Hayward 2017, Cristofari ve ark. 1999). Ayrıca Ty3 genomundan kodlanan revers transkriptaz enzimi omurgalıların da sahip olduğu reverse transkriptaz enzimine yapısal olarak benzerlik de gösterir. Ty'de yapılan çalışmalar omurgalı retrovirallerin enzimlerinin evrimini anlamak için önemlidir (Bona ve ark. 2013).

Retrovirüsler genom replikasyonları için büyük ölçüde konak olarak bulundukları ökaryotik hücreye bağlıdır. Ty retrotranspozonlarının *S. cerevisiae*'da replikasyonu için gerekli olan bütün faktörlerin birçoğu genom çapında yapılan çalışmalarla aydınlatılmıştır (Risler ve ark. 2012). Bu çalışmalar retroviral replikasyon için konak

hücrelerde hangi transkripsiyonel ve translasyonel faktörlerin gerekli olduğu konusunda tedaviye yönelik ön bilgiler de sağlayabilir. Ty retrotranspozonları herhangi bir hastalık yapıcı özelliklerinin olmaması, *S. cerevisiae*'nin GRAS organizma olması ve genetik çalışmalardaki üstünlüğü ile birlikte retroviral araştırmalar için iyi bir model sistem oluşturmaktadır.



3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Araştırmada Kullanılan *S. cerevisiae* Suşları

Araştırmamızda kullanılan *S. cerevisiae* suşları ve genotipleri çizelgede belirtilmiştir. Bu maya suşları EUROSCARF maya koleksiyonundan satın alınmıştır. Genetik yapıları tamamen bilinmektedir. Yaban tip suş olarak kullanılan BY4741 suşunda araştırmada incelenen apoptoz ve otofaji sinyal yolları ile ilgili herhangi bir mutasyon rapor edilmemiştir. Bu nedenle elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde BY4741 (lab kodu YST124) esas alınmıştır. Mutant *S. cerevisiae* suşları da BY4741 ile izogenik olup belirtilen mutasyonlar dışında mutasyon içermemektedirler. Mutant maya suşlarında kanMX4 geni varlığı bu maya suşlarının genotipinin (G418) içeren üreme ortamlarında dirençliliği ile teyid edilmiştir. EUROSCARF'tan satın alınan maya suşları ilgili YPD petrilerinde (Yeast Extract Peptone Dextrose) 30 C'de 2-3 gün üretilerek taze kültür hazırlandı. Bu kültürlerden uzun süreli depolama için 1 ml, steril %20'lik gliserol tüplerine örnek alınarak -80 C'de derin dondurucuda saklandı. Rutin kullanımlar için YPD petrilerindeki maya örnekleri kullanıldı. Bu örnekler araştırma süresince +4 C'de buzdolabında depolandı.

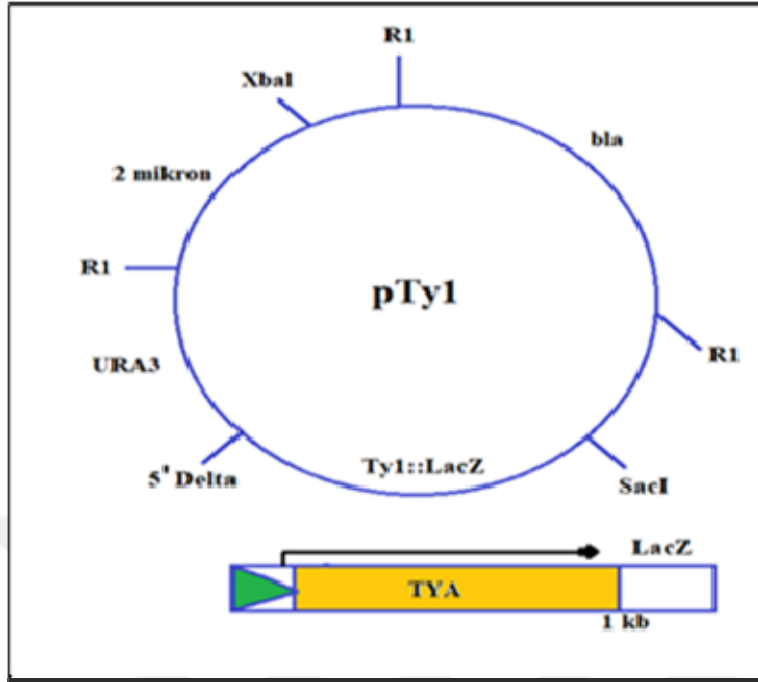
3.2. Araştırmada Kullanılan Ty Gen Füzyonları ve Yapısal Özellikleri

Araştırmamızda apoptoz ve otofaji sinyallerinin Ty1 ve Ty2 transkripsiyonuna etkilerini incelemek için Ty-LacZ raportör gen füzyonları kullanıldı. Bu gen füzyonları seçilebilir markör gen olarak URA3 içeren 2 mikron temelli YEplazmitleri üzerine daha önce yapılan çalışmalarla klonlanmıştır. Klonlama sonrası ilgili Ty elementlerinin promotor bölgelerinin doğru yönde (5'-3' yönünde) ve Ty kodlama bölgesi ile LacZ geninin de uygun translasyonel çerçevede olduğu sekanslama ile doğrulanmıştır. Bu gen füzyonları Ty1-144-LacZ, Ty2-754-LacZ, Ty2-555-LacZ, pENC, Ty1-FS-LacZ, Ty1-FF-LacZ, olarak adlandırılmış olup yapısal özellikleri kısaca aşağıda ilgili kaynaklarda verilerek açıklanmıştır.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşları ve özellikleri

ST Lab Kodu	Genotipi ve ilgili mutasyonlar	EUROSCARF kodu
YST124	MATa, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0. (yaban tip)	Y00000 (BY4741)
YST155	MATa, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0, YJR066w::kanMX4 (tor1 mutanlığı)	Y06864
YST159	MATa, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0, YDR477w::kanMX4 (snf1 mutanlığı)	Y14311
YST230	MATa, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0, YDR283c::kanMX4 (gcn2 mutanlığı)	Y 03642
YST265	MATa, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0, YBR083w::kanMX4 (tec1 mutanlığı)	Y07155
YST289	MATa, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0, YOR344c::kanMX4 (sgc1 mutanlığı)	Y01641

Ty1-144-LacZ olarak adlandırılan gen füzyonunununda Ty1'in 16 kromozomda bulunan kopyasının promotor bölgesi yer almaktadır. Bu vektörde Ty1'in ilk 1571 bp uzunluğundaki kısmı bulunmaktadır. Bu Ty1 bölgesi bu elementin bilinen bütün kontrol bölgelerini içermektedir (Morillon ve ark. 2002).



Şekil 3.1. Ty-LacZ ekspresyon vektörlerinin genel yapısı plazmit yapısı.

Ty2-754 plazmidi, Ty2 genomunun ilk 754 nükleotitini içermektedir (Farabaugh ve ark. 1989). Ty2 ilk 754 nükleotitlik kısmında; Upstream aktivasyon sekansı, TATA kutusu, enhancer bölgesi ve negatif düzenleyici bölge bulunmaktadır. Ty2-555-LacZ plazmitinde ise Ty2'nin negatif düzenleyici bölgesi delesyonla yok edilmiştir ve Ty2'nin ilk 555 nükleotidlik bölgesini içerir (Farabaugh ve ark. 1993, Türkel ve Farabaugh 1993). pENC plazmitinde ise Ty2 enhancer bölgesi, TATA kutusunun upstream bölgesine alınmıştır.

Ty1-FS plazmidi de 2 mm-URA3 plasmit yapısını içeren YE_p vektörüdür. Bu vektörde Ty1 elementlerinde çerçeve kayması için gerekli olan 7 nükleotidlik bölge E. coli LacZ geni 5' ucuna klonlanmıştır. Bu vektörden yapılan transkriptin LacZ'nin translasyonu için programlı çerçeve kayması gerçekleşmesi gerekir. Ty1-FF plazmiti de Ty1-FS vektöründen türevlenmiştir. Ancak bu vektörde LacZ transkriptinin translasyonu için çerçeve kayması gerekmez (Belcourt ve Farabaugh, 1990).

3.3. *S. cerevisiae* Suşlarının Üretilmesi ve Transformasyonu

Araştırmamızda kullanılan gen füzyonlarını içeren YE_p vektörlerinin Çizelge 3.1’de verilen maya suşlarına lityum asetat-polietilen glikol tekniği daha önce açıklandığı şekilde uygulanarak transformasyonları yapıldı (Gietz ve ark. 1995). Transformasyon için çizelge 3.1’de verilen maya suşları önce 5 ml YPD sıvı besiyerinde normal koşullar olarak adlandırdığımız 30 C’de 140 devir/dk hızda karıştırmalı inkubatörde 18-20 saat üretilerek ön kültürler elde edildi. Bu önkültürlerden 500 µl alınarak bu kez 25 ml’lik YPD besiyerine ekim yapıldı ve normal koşullarda logaritmik aşamaya kadar üretildi. Logaritmik aşamaya gelen kültürler masaüstü santrifüjde 1600rpm’de 5 dk çöktürüldü. Sıvı faz atılıp maya pelletleri 25 ml steril saf suda süspanse edildi ve aynı koşullarda tekrar çöktürüldü ve sıvı faz atıldı. Maya pelletleri bu kez 1 ml 0.1 M lityum asetat çözeltisinde süspanse edildi ve mikrofuj tüplerine alınarak tekrar 12500 rpm’de 1 dk çöktürüldü. Sıvı faz atıldı, maya pelletleri bu kez 500 ml 0.1 M lityum asetat çözeltisinde süspanse edilerek transformasyonda kullanılacak olan stok maya süspansiyonları elde edildi. Bu maya süspansiyonlarından herbir plazmit için taze mikrofuj tüplerine 50’şer µl alınarak tekrar çöktürüldü. Elde edilen maya pelletlerine sırasıyla aşağıda verilen miktarlarda çözelti ve plazmit DNA’sı eklendi ve vorteks ile homojen sıvı elde edilinceye kadar karıştırıldı.

240 µl PEG (%50’lik stoktan)

36 µl 1 M LiAOc (taze stok)

6 µl denatüre Herring sperm DNA’sı

4-5 µl (1-2 µg) plazmid DNA’sı

64 µl dsH₂O

Transformasyon karışımı önce 30 C’de etüvde 30 dk, daha sonra da 42 C’de 20 dk inkübe edildi. Bu süre sonunda transformasyon karışımları 12500 rpm’de 1 dk santrifüj yapıldı. Sıvı faz atıldı, maya pellet 500 µl steril saf su ile yavaşça süspanse edildi. Elde edilen transformasyon süspansiyonundan 100 µl alınarak SC-Ura+%2 dekstrozu petrilere steril cam bagetler ile yayma ekimi yapıldı. Petriler transformant kolonilerin gelişimi için 30 C etüvde 3-4 gün bekletildi. Gelişen kolonilerden steril kürdanla örnekler alınarak Sc-Ura+%2 dekstrozu petrilere yaklaşık olarak 0.5x0.5 cm

ebatlarında her bir plasmit için 6-8 adet pasaj yapıldı. Pasaj yapılan petriler tekrar 30° C etüvde 3-4 gün bırakıldı. Kolonilerden tekrar seçici ortama pasaj yapılması daha stabil transformants kolonilerin gelişimini sağlamaktadır. Ayrıca petride bulunan pasajlar transformantlardan sıvı kültürlerle ekim yapılabilmesi için daha fazla transformant maya hücresi sağlar.

3.4. *S. cerevisiae*'da Apoptoz ve Otofaji Koşullarının Oluşturulması

Bölüm 3.3'de açıklandığı şekilde elde edilen ve LacZ raportör plazmitlerini içeren transformant maya suşları apoptoz ve otofaji sinyallerinin Ty'lerde gen ifadesine etkilerini tayin etmek için aşağıda açıklandığı şekilde kullanıldı.

Transformant maya suşları önce 2'şerli olarak 5 ml Sc-Ura+%2 dekstroz içeren sıvı kültürlerde normal koşullarda 1 gece üretilerek stok sıvı kültürler elde edildi. Bu sıvı kültürler kullanılarak 10 ml'lik Sc-Ura+%2 dekstroz içeren besiyerlerine son konsantrasyonları OD600=0.2 olacak şekilde ekim yapıldı ve normal koşullarda sıvı kültürlerin logaritmik aşamaya kadar üremesi beklendi. Logaritmik aşama kültürleri 5'er ml'lik iki kısma bölündü. Bir bölümü tekrar normal koşullarda ürmeye bırakıldı. Diğer 5'lik kısma ise apoptoz sinyalini oluşturmak için son üreme ortamındaki konsantrasyonu 60 mM olacak şekilde pH=3 olan stok asetik asitten 200 µl ilave edildi. Bu kültürler de normal üreme koşullarında 5 saat (iki hücre bölünmesi süresi kadar) karıştırılmalı inkübatörde üretildi. Üreme süresi sonunda maya kültürleri masa üstü santrifüjde 1600 rpm'de 5 dk çöktürüldü. Sıvı faz atıldı. Maya pelletleri 1 ml steril saf suda suspanse edildi ve mikrofuj tüplerine aktarıldı ve tekrar 12500 rpm'de 1 dk çöktürüldü. Sıvı faz atıldı. Maya pelletleri bu kez 200 µl β-galaktozidaz süspansiyon çözeltisi (break buffer) ile suspnase edildi. Bu maya süspansiyonları direk olarak aşağıda açıklandığı şekilde b-galaktozidaz enzim tayini için kullanıldı. Direkt olarak kullanılamayacak durumlar da bu stok süspansiyonlar -80 C'de derin dondurucuda depolandı.

Maya hücrelerinde otofaji koşullarını oluşturmak için transformants maya suşları yukarıda açıklandığı şekilde üretildi. Sadece asetik asit yerine otofaji koşullarını

oluşturmak için üreme ortamlarına son konsantrasyonları 8 mM olacak şekilde steril Kafein çözeltisi ilave edildi (Kuranda ve ark 2006).

S. cerevisiae transformantlarında mitofaji koşullarını oluşturmak için Ty-LacZ gen füzyonlarını içeren maya suşları önce tek karbon kaynağı olarak %3 gliserol içeren 10 ml Sc-Ura üreme ortamında standart şartlarda logaritmik aşamaya kadar üretildi. Logaritmik aşamada bu kez maya kültürleri 5'er ml'lik iki kısma bölündü. Bir takımı aynı koşullarda üremeye bırakıldı. Maya kültürlerinin diğer 5'er ml'lik kısımlara ise stok %20 dekstrozdaki son konsantrasyonları %2 olacak şekilde dekstroz ilave edildi ve standart şartlarda 5 saat üremeye bırakıldı. Maya kültürlerinin üreme periyotları sonunda yukarıda açıklandığı şekilde çöktürülerek β -galaktozidaz aktivitesi tayini için hazırlandı.

3.5. Ty Gen Füzyonlarında Transkripsiyon Aktivitesinin Tayini

Bölüm 3.4'de açıklandığı şekilde normal ortamda veya apoptoz/otofaji/mitofaji sinyalleri aktive edilmiş ortamda üretilmiş maya suşlarında LacZ gen füzyonlarından yapılan β -galaktozidaz enzim aktivitelerinin tayini için daha önce tanımlanan standart yöntem uygulandı (Rose ve ark. 1981, Guarentee 1981).

Elde edilen maya süspansiyonlarına 20 μ l %0.1 SDS, ve 20 μ l saf kloroform konuldu, en üst hızda 1 dk vorteklenerek maya hücrelerinin permeabilized edilmesi sağlandı. Bu şekilde elde edilen maya süspansiyonları maya hücre lizatları olarak adlandırılır. Bu lizatlar kullanılarak β -galaktozidaz aktiviteleri tayin edildi. β -galaktozidaz tayini için 3'lü 10x100 mm'lik test tüpler hazırlandı. Bu test tüplerine 980 μ l Z-Buffer ve 20 μ l maya lizatı ilave edildi ve yavaşça karıştırıldı. Deney tüpleri 30 °C'lik su banyosunda 3 dakika bekletildi. Daha sonra bu test tüplerine beta galaktozidaz enziminin substratı olan orto-Nitrophenyl- β -galactoside (ONPG) çözeltisinden 200 μ l ilave edildi, hafifçe karıştırılarak tekrar 30 °C'deki su banyosunda bırakıldı ve reaksiyon başlangıç zamanında kronometre başlatıldı. Test tüplerinde reaksiyon sonucu açık sarı tonda renk oluştuğunda kronometrede okunan değer dakika cinsinden kayıt edildi ve enzimatik reaksiyon test tüplerine 500 μ l Na₂CO₃ (Sodyum karbonat) ilave edilerek durduruldu. β -galaktozidaz tüpleri santrifüjde 1600 rpm'de 4 dk çöktürüldü ve sıvı kısım 2 ml'lik

spektrofotometre küvetine aktarıldı. Spektrofotometrede 420 nm’de absorbands değerleri ölçülerek değerler tabloya kayıt edildi.

Araştırmamızda kullanılan LacZ füzyonlarının transkripsiyon aktisitesi tayinlerinde aktivitenin normalizasyonu lizatların protein konsantrasyonuna göre yapılmaktadır. Transformant lizatlarındaki çözünür protein konsantrasyonu ise Lowry yöntemi ile tayin edildi (Lowry ve ark. 1951). Lowry metodunda 10x100 mm ebatlarındaki test tüplerine 180 µl steril saf su konuldu. Hazırladığımız maya lizatlarından, deney tüplerine 20 µl ilave edildi. Daha sonra bu lizat karışımlarına Ek-1’de açıklandığı şekilde taze hazırlanan Lowry-A çözeltisinden 1 ml ilave edilerek vortekste karıştırıldı ve 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda bu kez 1 N Folin çözeltisinden 100 µl ilave edilerek vortekle karıştırıldı, 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda test tüpleri masaüstü santrifüjde 1600 rpm’de 4 dakika santrifüjlendi. Sıvı kısım spektrofotometre küvetine aktarıldı. Spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı ve tablolara kayıt edildi. β-galaktozidaz aktiviteleri Ek-2 verilen eşitliğe göre oluşturulan Excell programı ile hesaplandı. Deneyler 3’lü tekrarlı yapıldı. β-galaktozidaz ünitesi nm ONPG/dk/mg protein olarak ifade edildi.

Ty1’de programlı çerçeve kaymasının oranını hesaplamak için çerçeve kayması raportör vektörü olan Ty1-FS’den yapılan β-galaktozidaz ünitesi çerçeve kayması olmayan vektörden (Ty1-FF) yapılan β-galaktozidaz ünitesine bölünerek elde edildi ve % FS olarak verildi.

Sonuçlarda verilen β-galaktozidaz üniteleri aynı gen füzyonu için en az 12 β-galaktozidaz aktivitesi ortalamalı olup standart sapma değerlerinin kabul edilebilir aralık olan % 10-15 aralığında olduğu görülmektedir.

4. BULGULAR

4.1. Apoptoz Uyarımının Ty Transkripsiyonuna Etkileri

Yapılan çalışmalarla *S. cerevisiae*'da apoptoz uyarımının asetik asitle indüklenebildiği gösterilmiştir (Ludivico ve ark. 2001). Apoptoz sinyalinin asetik asit ile aktive edilmesi sonucu Ty1 ve Ty2'de promotor aktivitelerinde önemli oranda azalma olduğu görüldü. Hem Ty1 ve hem de Ty2 promotorlarına bağlı olarak yapılan gen füzyonu ekspresyonunun yaklaşık 3-kat baskılandığı görüldü (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Apoptoz koşullarının Ty1 ve Ty2'de gen ifadesine etkileri. $\pm$ SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir. ($p < 0.001$)

Ty gen füzyonları	Üreme ortamları ve β -Galaktozidaz Aktiviteleri*($\pm$ SD)	
	<i>Sc-Ura</i> +%2 Glukoz (Normal ortam)	Apoptoz koşulları (60 mM Asetik Asit)
<i>Ty1-144-LacZ</i>	3074 $\pm$ 92	831 $\pm$ 51
<i>Ty2-754-LacZ</i>	185 $\pm$ 15	62 $\pm$ 15

Ty1 ve Ty2 elementlerinin promotor aktiviteleri arasında önemli fark olmasına rağmen her iki elementte de apoptoz sinyalinin aktive edilmesi sonucu transkripsiyonun aynı oranda (yaklaşık 3-kat) baskılandığı dikkat çekmektedir (Çizelge 4.1).

4.2. Farklı Protein Kinazların Apoptotik Şartlarda Ty Transkripsiyonuna Etkileri

Apoptoz sinyal iletiminde *S. cerevisiae*'da önemli metabolik işlevleri olan Tor1p, Snf1p ve Gcn2p protein kinazlarının da işlevleri oldukları rapor edilmektedir. Araştırmamızda Ty elementlerinde apoptoz sinyali oluşumun yanıt olarak Ty elementlerinde transkripsiyonun 3-kat kadar baskılanmasında bu protein kinazların işlevlerinin olup olmadığı da test edildi. Yaban tip ve bu protein kinazları içermeyen mutant *S. cerevisiae* suşlarının normal ve apoptotik koşullarda Ty gen füzyonlarından yapılan ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldı. Verilen protein kinaz mutantlarında Ty1 transkripsiyonunun normal üreme şartlarında dahi yaban tip suştaki ekspresyon seviyesine göre %20-40

kadar azaldığı görüldü (Çizelge 4.2). Apoptoz sinyalinin oluşturulması ile özellikle $\Delta snf1$ mutanti maya suşunda Ty1 ekspresyon seviyesinde 6-kat kadar azalma olduğu (1824'den 323 üniteye) görüldü. Diğer protein kinaz mutantları olan $\Delta tor1$ ve $\Delta gc2$ mutanti maya suşlarında da apoptoz sinyali ile ortalama 2-kat kadar azalma olduğu görüldü (Çizelge 4.2). Bu sonuçlar Tor1p, Snf1p ve Gcn2p'nin Ty1 transkripsiyonunda hem normal şartlarda gerekli olduğu göstermekle birlikte apoptoz sinyaline karşı Ty1 transkripsiyonunun baskılanmasında tam olarak yer almadığını da göstermektedir. Çünkü, bu kinazların kodlanmadığı mutant suşlarda da Ty1 transkripsiyonu apoptoz sinyali ile baskılanmaktadır.

Çizelge 4.2. Apoptoz koşullarında farklı protein kinazların Ty1'de gen ifadesine etkileri. $\pm$ SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir. ($p < 0.05$)

<i>S. cerevisiae</i> suşları	Üreme ortamları ve β -Galaktozidaz Aktiviteleri*($\pm$ SD)	
	<i>Sc-Ura</i> +%2 Glukoz (Normal ortam)	Apoptoz koşulları (60 mM Asetik Asit)
<i>Yaban tip</i>	3074 $\pm$ 92	831 $\pm$ 51
$\Delta tor1$	2273 $\pm$ 167	905 $\pm$ 76
$\Delta snf1$	1824 $\pm$ 89	323 $\pm$ 35
$\Delta gc2$	2876 $\pm$ 217	1101 $\pm$ 39

Tor1p, Snf1p ve Gcn2p'nin normal ve apoptotik koşullarda Ty2'de gen ifadesine etkileri de incelendi. Ancak bu protein kinazların Ty2 transkripsiyonunu normal ve apoptotik şartlarda Ty1'den farklı şekilde etki ettiği görüldü (Çizelge 4.3). Normal üreme ortamı koşullarında Tor1p ve Gcn2p'nin Ty2 de gen ekspresyonuna etkisi olmadığı görüldü. Apoptoz sinyalinin oluşturulması sonucu ise $\Delta snf1$ mutantında Ty2de gen ekspresyonunun yaban tip suş seviyesine azaldığı görüldü. $\Delta gc2$ mutant suşunda ise apoptoz koşullarında Ty2 gen ifadesinde %40 kadar azalma olduğu $\Delta tor1$ mutant suşunda Ty2 ekspresyonunda apoptoz sinyaline yanıt olarak sadece %30 kadar azalması

yaban tip sušta apoptoz koşullarında Tor1p'nin kısmen işlevi olduğunu öne sürmektedir (Çizelge 4.3). Bu sonuçlar Snf1p'nin Ty2'de gen ifadesinde normal koşullarda işlevi olmasına rağmen apoptoz koşullarında etkili olmadığını Tor1p ve Gcn2p'nin ise apoptoz koşullarına bağlı olarak Ty2 gen ifadesindeki baskılanmada düşük seviyede de olsa etkisi ve işlevi olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.3. Apoptoz koşullarında farklı protein kinazların Ty2'de gen ifadesine etkileri. $\pm$ SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir. ($p < 0.05$)

<i>S. cerevisiae</i> suşları	Üreme ortamları ve β -Galaktozidaz Aktiviteleri*($\pm$ SD)	
	<i>Sc-Ura</i> +%2 Glukoz (Normal ortam)	Apoptoz koşulları (60 mM Asetik Asit)
<i>Yaban tip</i>	185 $\pm$ 15	62 $\pm$ 5
<i>Δtor1</i>	156 $\pm$ 2	114 $\pm$ 2
<i>Δsnf1</i>	116 $\pm$ 1	60 $\pm$ 2
<i>Δgcn2</i>	163 $\pm$ 6	103 $\pm$ 10

4.3. Tec1p ve Sgc1p'nin Apoptotik Şartlarda Ty Transkripsiyonuna Etkileri

Ty1 ve Ty2'de promotor bölgelerine bağlanıp bu elementlerin transkripsiyonlarını aktive eden çok sayıda aktivator tayin edilmiştir. Bunlardan Tec1p ve Sgc1p'nin normal koşullarda Ty1 ve Ty2'de transkripsiyonun aktivasyonu için gerekli oldukları daha önce yapılan çalışmalar ile moleküler seviyede gösterilmiştir (Laloux ve ark. 1990, Löhning ve ark. 1994). Tec1p ve Sgc1p'nin Ty1 ve Ty2'de apoptoz şartlarında transkripsiyona etkileri bu genleri içermeyen delesyonlu mutant suşlar kullanılarak test edildi. Elde edilen sonuçlar yaban tip maya suşu ile karşılaştırıldı. Beklendiği şekilde Δ tec1 mutant suşunda normal ortam koşullarında Ty1 ekspresyonunda yaklaşık 6-kat kadar azalma olduğu görüldü (çizelge 4.4). Ty2'de ise ekspresyon seviyesinin Δ tec1 mutasyonundan etkilenmediği görüldü. Ancak, bu mutant suş apoptotik koşullarda üretildiğinde her Ty1 elementinde apoptoz etkisi ile gen ifadesinde herhangi bir

baskılanma olmadığı görüldü. Ty2’de ise ekspresyon seviyesinde düşük seviyede (yaklaşık %25 kadar) artış olduğu görüldü. Bu sonuç apoptoz sinyaline yanıt olarak Ty1 de gen ifadesinin baskılanmasında direkt ve/veya dolaylı olarak hedef alınan düzenleyici faktörlerden birisinin Tec1p olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.4. Trankripsiyon faktörü Tec1p’nin Apoptoz koşullarında Ty1 ve Ty2’de gen ifadesine etkileri. $\pm$ SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir. ($p < 0.05$)

Ty gen füzyonları	Üreme ortamları ve β -Galaktozidaz Aktiviteleri*($\pm$ SD)	
	<i>Sc-Ura+2% Glukoz (Normal ortam)</i>	Apoptoz koşulları (60 mM Asetik Asit)
<i>Ty1-144-LacZ</i>	592 $\pm$ 18	485 $\pm$ 17
<i>Ty2-754-LacZ</i>	157 $\pm$ 1	192 $\pm$ 2

Sgc1p’nin Ty1 ve Ty2’de gen ifadesine etkileri de incelendi. Normal üreme ortamı koşullarında hem Ty1 ve hem de Ty2’de gen ifadesinde yaban tip suşa kıyasla yaklaşık 2-kat azalma olması bu transkripsiyon faktörünün Ty1 ve Ty2’de gen ekspresyonu için gerekli olduğunu göstermektedir. Apoptoz sinyalinin aktive edildiği koşullarda ise Δ sgc1 mutantında Ty1 transkripsiyonunda %36 kadar azalma olması bu faktörün de apoptotik koşullarda kısmen de olsa Ty1 transkripsiyonunda yer aldığını göstermektedir. Ty2’nin Δ sgc1 mutant suşunda normal ve apoptotik koşullarda yaklaşık olarak aynı seviyede gerçekleşmiş olması Sgc1p’in apoptotik koşullarda Ty2 ekspresyonunda direkt/dolaylı olarak yer aldığını göstermektedir. Çünkü Sgc1p’nin fonksiyonel olarak bulunduğu yaban tip suшта apoptotik koşullarda 3-kat azalan gen ifadesi mutant suшта hiçbir azalma göstermemiştir.

Çizelge 4.5. Trankripsiyon faktörü Sgc1p'nin Apoptoz koşullarında Ty1 ve Ty2'de gen ifadesine etkileri. $\pm$ SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir. ($p < 0.05$)

Ty gen füzyonları	Üreme ortamları ve β -Galaktozidaz Aktiviteleri*($\pm$ SD)	
	<i>Sc-Ura+2% Glukoz (Normal ortam)</i>	Apoptoz koşulları (60 mM Asetik Asit)
<i>Ty1-144-LacZ</i>	1677 $\pm$ 86	1225 $\pm$ 21
<i>Ty2-754-LacZ</i>	74 $\pm$ 4	84 $\pm$ 4

Ty2 elementinin transkripsiyonunda gerekli olan en önemli aktivatör element kodlama bölgesinde yer alan enhansır elementidir. Ty2'de bu bölgenin delesyonu ile transkripsiyon çok düşük seviyeye iner (Farabaugh ve ark. 1989). Apoptoz koşullarında Ty2'de transkripsiyonun baskılanmasında enhansır elementinin hedef alınıp alınmadığı da sadece bu bölgeyi içeren ekspresyon vektörleri kullanılarak test edildi. p-ENC plazmitinde Ty2 enhansır bölgesi aktivatör bölge içermeyen HIS4 promoturunda TATA kutusunun 5' yönüne gelecek şekilde daha önceden klonlamıştır (Türkel ve Farabaugh, 1993). Ty2-555-LacZ ekspresyon vektöründe ise Ty2'de gen ifadesini baskılayıcı etkisi olan represör bölge (DRS bölgesi delesyonla yok edilmiştir. Bu ekspresyon vektörlerini içeren yaban tip maya suşu normal ve apoptoz uyarılmış koşullarda üretilerek apoptoz sinyalinin bu vektörlerde enhansır elementine bağlı transkripsiyonuna etkileri incelendi. Elde edilen sonuçlar apoptoz sinyalinin enhansır elementine bağlı transkripsiyona herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir (Çizelge 4.6). Bu durum apoptoz sinyali aktivasyonuna bağlı olarak Ty2 transkripsiyonunun baskılanmasında Ty2 promotorunun bütünlüğünün ve doğal yapısının gerekli olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.6. Apoptoz sinyalinin Ty2’de enhansır elementine etkileri. $\pm$ SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir. ($p<0.05$)

Ty gen füzyonları	Üreme ortamları ve β -Galaktozidaz Aktiviteleri*($\pm$ SD)	
	<i>Sc-Ura+2% Glukoz (Normal ortam)</i>	Apoptoz koşulları (60 mM Asetik Asit)
Ty2-555-LacZ	2158 $\pm$ 20	2135 $\pm$ 190
p-ENC-LacZ	852 $\pm$ 55	1010 $\pm$ 62

4.4. Otofaji Uyarımının Ty Transkripsiyonuna Etkileri

Otofaji sinyal yolağının kafein ile aktive edilmesi sonucu Ty1 ve Ty2’de gen ekspresyonunun farklı şekilde etkilendiği görülmektedir. Otofaji koşullarında Ty1 transkripsiyonu oldukça düşük seviye, yaklaşık %18 kadar azalma olduğu görüldü. (Çizelge 4.7). Fakat, Ty2 transkripsiyonunun otofaji koşullarında da apoptozda olduğu gibi 3-kat kadar azaldığı bulundu (Çizelge 4.7). Bu sonuçlar apoptozdan farklı olarak otofaji koşullarının Ty1 ve Ty2’de gen ifadesine farklı seviyede etki ettiğini göstermektedir.

Çizelge 4.7. Otofaji uyarımının Ty elementlerinde gen ifadesine etkileri. $\pm$ SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir. ($p<0.05$)

Ty gen füzyonları	Üreme ortamları ve β -Galaktozidaz Aktiviteleri*($\pm$ SD)	
	<i>Sc-Ura+2% Glukoz (Normal ortam)</i>	Otofaji koşulları (+8 mM Kafein)
<i>Ty1-144-LacZ</i>	3074 $\pm$ 92	2602 $\pm$ 9
<i>Ty2-754-LacZ</i>	185 $\pm$ 15	69 $\pm$ 2

4.5. Farklı Protein Kinazların Otofaji Şartlarında Ty Elementlerinde Gen İfadesine Etkileri

Tor1p, Snf1p ve Gcn2p'nin otofaji koşullarında Ty1 ve Ty2'de gen ifadesine etkileri incelendiğinde Ty1 ve Ty2'de önemli farklılıklar olduğu görüldü. Snf1p ve Gcn2p kinazları içermeyen mutant suşlarda Ty1 transkripsiyonunun normal koşullarda ve otofajinin aktive edildiği koşullarda yaklaşık olarak aynı seviyede gerçekleştiği görüldü (Çizelge 4.8). Ancak, Δ tor1 mutant suşunda otofaji koşullarında Ty1 transkripsiyonunda %27 kadar artış olduğu görüldü.

Çizelge 4.8. Farklı protein kinazların otofaji koşullarında Ty1'de gen ifadesine etkileri. (p<0.05)

<i>S. cerevisiae</i> suşları	Üreme ortamları ve β -Galaktozidaz Aktiviteleri*($\pm$ SD)	
	<i>Sc-Ura</i> +%2 Glukoz (Normal ortam)	Otofaji koşulları (+8 mM Kafein)
<i>Yaban tip</i>	3074 $\pm$ 92	2601 $\pm$ 9
<i>Δtor1</i>	2273 $\pm$ 167	2903 $\pm$ 96
<i>Δsnf1</i>	1824 $\pm$ 89	1800 $\pm$ 65
<i>Δgcn2</i>	2826 $\pm$ 217	1987 $\pm$ 56

Otofaji koşullarında Tor1p, Snf1p ve Gcn2p'nin Ty2'de gen ifadesine etkileri de incelendi. Ty2'de otofaji koşullarında Ty1'den farklılıklar olduğu görüldü. Yaban tip maya suşunda otofaji koşullarında Ty2'de gen ifadesinin yaklaşık 3-kat azaldığı, bunun Δ snf1 mutant suşunda daha fazla olduğu ve yaklaşık 4-kat azalma olduğu bulundu. Δ tor1 mutantında da Ty2 gen ifadesinde otofaji koşullarında 2-kat kadar azalma olduğu görülmektedir (Çizelge 4.9). Gcn4 mutant suşunda ise teknik nedenlerden dolayı inceleme yapılmadı. Bu sonuçlar incelenen protein kinazların otofaji koşullarında Ty2 gen ifadesinin kontrolünde önemli derecede yer almadığını göstermektedir.

Ty2 elementinin transkripsiyonunun aktivasyonunda en önemli aktivatör bölge enhansır elementidir. Otofaji koşullarının bu aktivatör bölgeden yapılan transkripsiyona etkileri de p-ENC ve Ty2-555-LacZ ekspresyon vektörleri kullanılarak test edildi (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.9. Farklı protein kinazların otofaji koşullarında Ty2’de gen ifadesine etkileri (p<0.05)

<i>S. cerevisiae</i> suşları	Üreme ortamları ve β -Galaktozidaz Aktiviteleri*($\pm$ SD)	
	<i>Sc-Ura</i> +%2 Glukoz (Normal ortam)	Otofaji koşulları (+8 mM Kafein)
<i>Yaban tip</i>	185 $\pm$ 15	69 $\pm$ 2
<i>Ator1</i>	156 $\pm$ 2	86 $\pm$ 2
<i>Δsnf1</i>	116 $\pm$ 1	30 $\pm$ 1
<i>Δgcn2</i>	163 $\pm$ 6	104 $\pm$ 6

Otofaji koşullarının oluşturulduğu ortamda üretilen yaban tip maya suşunda enhansır elementine bağlı gen ifadesinde %45 kadar bir azalma olduğu görüldü. Represör bölgeyi içermeyen Ty2 ekspresyon vektöründen yapılan gen ifadesinin ise otofaji koşullarında yaklaşık 2-kat azaldığı bulundu (Çizelge 4.10). Bu sonuçlar apoptoz koşullarından farklı olarak otofaji koşullarında Ty2 gen ifadesinde azalmanın enhansır elementi ile bağlantılı olabileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.10. Otofaji sinyalinin Ty2’de enhansır elementine etkileri (p<0.05)

Ty gen füzyonları	Üreme ortamları ve β -Galaktozidaz Aktiviteleri*($\pm$ SD)	
	<i>Sc-Ura</i> +%2 Glukoz (Normal ortam)	Otofaji koşulları (+8 mM Kafein)
<i>Ty2-555-LacZ</i>	2158 $\pm$ 200	965 $\pm$ 77
<i>p-ENC-LacZ</i>	852 $\pm$ 55	516 $\pm$ 29

4.6. Tec1p ve Sgc1p’nin Otofaji Şartlarda Ty Transkripsiyonuna Etkileri

Transkripsiyon aktivatörleri Tec1p ve Sgc1p’nin Ty1 ve Ty2’de gen ifadesinde işlevleri bilindiğinden bu faktörlerin otofaji koşullarında Ty1 ve Ty2’de etkileri de incelendi. Ty1’de gen ifadesinin Δ tec1 mutant suşunda otofaji koşullarından etkilenmediği görüldü. Ty2’de gen ifadesinde ise Δ tec1 mutant suşunda otofaji koşullarında yaban tip suşta olduğu gibi yaklaşık 3-kat kadar azalma olduğu görüldü (Çizelge 4.11). Δ sgc1 mutant suşunda ise Ty1’de gen ifadesinde %30 kadar düşük oranda bir artış, Ty2’de ise yine 3-kat kadar önemli miktarda azalma meydana geldiği görüldü (Çizelge 4.11). Bu sonuçlar her iki Ty elementinde Tec1p ve Sgc1p’nin otofaji koşullarında direkt veya dolaylı olarak farklı işlevleri olduğunu göstermektedir. Normal koşullarda Ty1’de bazal seviyede gen ifadesi için gerekli olan Tec1p’nin otofaji koşullarında da Ty1’de gen ifadesinin baskılanmasında hedef faktör olabileceği düşünülmektedir. Ty2’de ise hem normal koşullarda ve hem de otofaji koşullarında yaban tip ve Δ tec1 mutant suşunda yaklaşık olarak aynı seviyede gen ifadesinin görülmesi ise Tec1p’nin otofaji koşullarında Ty2’de görülen gen ifadesinin baskılanmasında işlevi olmadığı şeklinde değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.11. Tec1p ve Sgc1p'nin otofaji koşullarında Ty1 ve Ty2'de gen ifadesine etkileri (p<0.05)

Mutant <i>S. Cerevisiae</i> suşları	Ty gen füzyonları	Üreme ortamları ve β-Galaktozidaz Aktiviteleri*(± SD)	
		<i>Sc-Ura</i> +%2 Glukoz (Normal ortam)	Otofaji koşulları (+8 mM Kafein)
<i>Δtec1</i>	<i>Ty1-144-LacZ</i>	592 ± 18	657 ± 52
	<i>Ty2-754-LacZ</i>	157 ± 1	54 ± 4
<i>Δsgc1</i>	<i>Ty1-144-LacZ</i>	1677± 86	2187 ± 11
	<i>Ty2-754-LacZ</i>	74 ± 4	29 ± 1

4.7. Mitofaji Uyarımının Ty Transkripsiyonuna Etkileri

Genel otofaji koşullarının Ty1 ve Ty2'de gen ifadesine etkilerinin analiz edilmesinden sonra spesifik bir otofaji şekli olan mitofaji koşullarının da Ty1 ve Ty2'de gen ifadesine etkileri incelendi. Mitofaji koşullarını oluşturmak için yaban tip maya suşu önce gliserolde üretilip logaritmik aşamada üreme ortamında %2 oranında glukoz ilave edildi. Gliserol ortamında üretilen maya transformantlarında Ty1 ve Ty2'de gen ifadesinde normal ortam koşullarına göre önemli ölçüde azalma olduğu görülmektedir. Bu durum daha önce rapor edilmiş olup Ty2 de gen ifadesinin glukoz sinyaline bağlı olarak aktive edildiği bilinmektedir (Türkel ve ark 2009). Gliserol ortamına glukoz eklenmesi ile Ty2'de ve bu elementin enhansır bölgesine bağlı olarak yapılan gen ifadesinde 6-8 kat kadar artış olduğu görüldü (Çizelge 4.12). Ancak, mitofaji sinyalinin uyarılması ile Ty1 gen ifadesinde önemli bir farklılık, artış veya azalma olmadığı görüldü (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Mitofaji aktivasyonunun Ty1 ve Ty2’de gen ifadesine etkileri. ($p<0.05$)

Ty gen füzyonları	Üreme ortamları ve β -Galaktozidaz Aktiviteleri*($\pm$ SD)	
	<i>Sc-Ura+2% Gliserol</i>	<i>Gliserol→2% Glukoz</i>
<i>Ty1-144-LacZ</i>	1594 $\pm$ 129	1775 $\pm$ 102
<i>Ty2-754-LacZ</i>	37 $\pm$ 2	295 $\pm$ 52
<i>Ty2-555-LacZ</i>	514 $\pm$ 40	2132 $\pm$ 119
<i>p-ENC-LacZ</i>	79 $\pm$ 4	416 $\pm$ 32

4.8. Apoptoz ve Otofaji Koşullarının Ribozomal Çerçeve Kaymasına Etkileri

Ty elementlerinden kodlanan Gag ve Pol homoloğu olan TYA ve TYB polipeptidlerin oranı translasyon sırasında programlı ribozomal çerçeve kayması ile kontrol edilmektedir. TYA ve TYB (Gag-Pol) ise Ty elementlerinin replikasyon döngüsü için gerekli olan faktörlerin olduğu polipeptidlerdir. Apoptoz ve otofaji koşullarının TY1 ve Ty2’de aynı şekilde gerçekleşen programlı çerçeve kaymasına etkileri de incelendi. Normal üreme koşullarında Ty elementlerinde beklendiği şekilde yaklaşık olarak %28 oranında çerçeve kayması olduğu görüldü. Ancak bu oranın apoptoz koşullarında %22’ye otofaji koşullarında ise %20’ye azaldığı bulundu (çizelge 4.13). Elde edilen bu sonuçlar apoptoz ve otofaji koşullarının Ty elementlerinde programlı çerçeve kayması oranını da etkilediği göstermektedir. (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. Apoptoz ve otofaji koşullarının Ty1’de ribozomal çerçeve kaymasına etkisi.

Üreme koşulları	% Çerçeve kayması
Normal ortam	28 ±
Apoptoz koşulları	22±
Otofaji koşulları	20±

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu araştırma *S. cerevisiae* genomunda farklı kromozomlarda yer aldığı daha önce belirlenen iki farklı Ty retrotranspozonunun apoptoz ve otofaji gibi hücresel süreçlerden nasıl etkilendiği incelenmiştir. Araştırmamızda tam uzunlukta TY transkriptlerinin analizi yerine Ty-LacZ raportör gen füzyonlarını içeren plazmit temelli YE_p ekspresyon vektörleri kullanılmıştır. Ty transkripsiyon analizini klasik RNA analizi (northern blot, rtPZR gibi) yöntemlerle yapmak önemli teknik zorluklar içermektedir. Çünkü Özellikle Ty1 ve Ty2'nin genomdaki kopyaları arasındaki sekans benzerliğinin yüksek olması Northern blotta kullanılan probe veya PZR primerlerinin diğer Ty kopyalarından yapılan transkriptleri ile çapraz hibridizasyonuna yol açmaktadır (Kim ve ark. 1998). Ayrıca günümüze kadar tayin edilen Ty2 ve özellikle Ty1'lerin kendi aralarında da transkripsiyon sevipleri açısından önemli farklılıklar (50-kat) olduğu açıklanmıştır. Bu durumda Ty retrotranspozonlarında raportör gen füzyonlarının kullanılıyor olması esasen diğer moleküler tekniklere göre önemli avantaj sağlamaktadır. LacZ; ilk olarak *Escherichia coli*'de tanımlanmıştır ve beta galaktozidaz enzimini kodlamaktadır (Kalnins ve ark. 1983). LacZ; gen füzyonları hızlı sonuç alınabilen ve oldukça hassas bir raportör gen olarak uzun süredir kullanılmaktadır (Guarete 1981, Gerlach ve ark 2007). LacZ raportör gen füzyonları kullanılarak, RNA veya protein analizi gibi başka genetik tekniğe ihtiyaç duyulmadan ilgili genlerin promotor aktivitelerini hızlı bir şekilde analiz etmek mümkündür (Smale 2010). Daha önce yapılan birçok çalışmada da β -galaktozidaz aktiviteleri ile *S. cerevisiae*'da kromozomal genden transkribe edilen mRNA miktarları arasında doğru orantı olduğu da gösterilmiştir (Türkel 1994).

Ty1 ve Ty2 elementlerinde gen ifadesi transkripsiyon seviyesinde çok fazla faktör tarafından kontrol edilir. Bu faktörlerden bazıları aktivator, bazıları represör veya kromatin modifiye edici faktörlerdir (Curcio ve ark. 2015). Belirlenen faktörlere ek olarak bu tez araştırmamın kapsamında YEASTRACT veri tabanı kullanılarak yapılan incelemede Ty1 promotorunda Xbp1 ve YAP1 gibi stresle aktive edilen transkripsiyon faktörü bağlanma dizileri de belirlendi (Mai ve Breden 1997, Anonim 2020b). Daha önceki çalışmalarda represör faktör olan Rap1p'nin de Ty1 ve Ty2 de düzenleyici faktör olarak yer aldığı da gösterilmiştir (Gray ve Fassler 1993). Apoptoz koşullarında Ty

elementlerinde gen ifadesinin baskılanmasında stres koşullarında aktive edilen bu represör faktörlerin etkisi olabileceği düşünülmektedir. Apoptoz ve otofaji koşullarında Ty1 ve Ty2’de transkripsiyonu aktive eden faktörler de bu hücrel süreç dolayısıyla inaktive edilmiş olabilir. Ty2’de transkripsiyonu aktive eden en önemli faktör Gcr1p olup hücrede birçok genlerin transkripsiyonundan da sorumludur (Türkel 1994, Türkel ve ark. 1997, Lopez ve Baker 2000). Ancak *GCR1* geni delesyonu bazı maya suşlarında letal olup bu mutant suşlar ile bu araştırmada olduğu şekilde analiz yapmak mümkün değildir. Delesyonu letal olmayan maya suşlarında da pleotropik etkileri dolayısıyla Δ gcr1 mutant suşlarında bölünme süresi YPD ortamında 12 saat kadardır (Lopez ve baker 2000). Rap1p *S. cerevisiae*’da çok bol bulunan çok fonksiyonlu transkripsiyon faktörüdür. Fakat bu faktörün delesyonu da *S. cerevisiae* için letaldır. Ty1 transkripsiyonun baskılanmasında işlevi olduğu daha önce rapor edilen represör faktör Mot1p’nin de *S. cerevisiae* genomundan delesyonu letaldır (Anonim 2020a).

Ty elementlerinde protomor bölgelerinde çok fazla düzenleyici faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerin (aktivatör, represör ve kromatin faktörlerinin) Ty elementlerinde gen ifadesinin her türlü koşulda dengeli olarak, hücrel genlerin düzenlenmesine ve mayalardaki metabolik süreçlere de uygun olarak kontrol edilmesini sağladığı düşünülmektedir. Bu şekilde kontrollü gen ifadesi bu genetik elementlerin evrimsel süreçte kopya sayılarının korunmasını, maya genomlarından elimine edilmeden varlıklarını sürdürmesini de sağlar. Bu araştırmada apoptoz ve otofaji koşullarının da hem Ty1 ve hem de Ty2’de transkripsiyonu da tamamen baskılamadığı bulundu. Ty elementlerinde gen ifadesinin translasyon seviyesinde kontrolünü sağlayan programlı çerçeve kayması oranının da apoptoz ve otofaji koşullarında önemli oranda azaldığı görüldü. Bu durum Ty elementlerinde bazı hücrel koşullarda çerçeve kayması oranının transkripsiyona paralel olarak kontrol edilebildiğini de göstermektedir.

Apoptoz ve otofaji koşullarında bu araştırma da test edilen protein kinazlarında da Ty1 ve Ty2’de farklı şekilde etkileri olduğu görülmektedir. Tor1p, Gcn2p ve Snf1p’nin apoptoz koşullarında Ty1’de görülen transkripsiyonun baskılanmasında çok fazla işlevi olmadığı görülmektedir. Ancak Tor1p’nin Ty2 de apoptoz koşullarında transkripsiyon baskılanmasında işlevi olduğu görülmektedir. Snf1p de hem Ty1 ve hem de Ty2’de

bazal transkripsiyonda etkisi olmasına rağmen apoptoz sürecinde her iki elemente de etkisi olmadığı düşünülmektedir.

Ty1 ve Ty2'de apoptoz koşullarındaki gen ifadesinde $\Delta tec1$ mutant suşunda önemli bir baskılanma olmadığı bulunmuştur. Bu durum apoptoz koşullarında yaban tip suşta inaktive edilen (degrede edilen veya transkripsiyonu baskılanan) transkripsiyon faktörlerinden birisinin Tec1p olduğu görülmektedir. Bu şekilde yaban tip suşta aktivatör faktörün inaktive edilmesi sonucu Ty1 ve Ty2'de transkripsiyonda 3 kat kadar azalma/baskılanma meydana gelmektedir. Mutant $\Delta tec1$ suşunda ise zaten bu faktör olmadığından normal koşullardaki ekspresyon seviyesi ve apoptoz koşullarındaki seviye yaklaşık olarak aynı seviyededir. Aynı durum Ty1 ve Ty2'de aktivatör olarak işlevi olan Sgc1p için de geçerlidir.

Otofaji koşullarında ise Ty1'de gen ifadesinin çok etkilenmediği Ty2'de ise gen ifadesinde 3 kat kadar baskılanma olduğu görülmektedir. Otofaji koşullarında Tor1p ve Snf1p'nin Ty1 ve Ty2'de olan etkileri incelendiğinde bu faktörlerin otofaji koşullarında Ty1 ve Ty2 de etkisinin olmadığı görülmektedir. Ty1 ve Ty2'de aktivatör olarak işlevi olan Tec1p ve Sgc1p'nin otofaji koşullarındaki işlevleri de incelenmiştir. Ancak, apoptoz sürecindeki etkilerinden farklı olarak otofaji koşullarında her iki transkripsiyon faktörünün de Ty1 ve Ty2'de herhangi bir işlevi olmadığı görülmektedir. Çünkü hem Ty1 ve hem de Ty2 de yaban tip maya suşunda normal koşullarda ve otofaji uyarılmış durumdaki gen ifadesi durumunun $\Delta tec1$ ve $\Delta sgc1$ mutant suşlarında korunduğu görülmektedir. Ty2'de otofaji koşullarında her iki mutant suşta da yaban tip maya suşunda olduğu gibi transkripsiyonda yaklaşık 3-kat azalma olduğu görülmektedir. Bu durumda otofaji koşullarında Ty2'de görülen transkripsiyon baskılamasında Ty2'de gen ifadesinde işlevi olan farklı faktörlerin hedef alındığı düşünülmektedir.

Mitofajide makrotofajiden farklı bir süreç olup hasarlı mitokondrileri hedef alır. deneysel olarak oluşturulan mitofaji koşullarından Ty1 transkripsiyonunun önemli dercede etkilenmediği ancak Ty2 transkripsiyonunda önemli seviyede aktivasyon olduğu görülmektedir. Ancak bu aktivasyon kısmen de olsa daha önce Ty2'de görülen glukoz aktivasyonundan da kaynaklanmış olabilir (Türkel ve ark. 2009). Daha önce

yapılan çalışmalarda Ty2’de gen ifadesinin glukoz sinyaline bağı olarak aktive edildiğı bulunmuştur (Türkel ve ark. 2009).

Apoptoz sinyalinin enhansır elementine bağı transkripsiyona herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Apoptoz sinyali aktivasyonuna bağı olarak Ty2 transkripsiyonunun baskılanmasında, Ty2 promotorunun bütünlüğünün ve doğal yapısının gerekli olduğu şeklinde değerlendirilmiştir. Fakat otofaji sinyali aktivasyonuna bağı olarak Ty2 transkripsiyonunun baskılanmasında doğal promotor yapısının gerekli olmadığı gösterilmiştir.

Apoptoz ve otofaji bütün ökaryotlarda korunmuş önemli işlevleri olan hücrel süreçlerdir. Bu çalışmada apoptoz ve otofaji süreçlerinin *S. cerevisiae*’da bulunan ve pseudovirüs olarak da adlandırılan Ty1 ve Ty2 retrotranspozonlarında gen ifadesine iki retrotranspozonda da farklı şekilde ve farklı derecelerde etki ettiği bulunmuştur.

KAYNAKLAR

- Anonim, 2020a.** *Saccharomyces cerevisiae* Genome Database (SGD). <https://www.yeastgenome.org/>-(Eriřim tarihi: 15 Mayıs, 2020)
- Anonim, 2020b.** YEASTRACT (Yeast Search for Transcriptional Regulators And Consensus Tracking). <http://www.yeasttract.com/>-(Eriřim tarihi: 15 Mayıs, 2020)
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J. 1996.** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87: 171.
- Axford-Delorme, E., Klionsky, D.J. 2018.** Transcriptional and post-transcriptional regulation of autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*, 293: 5396-5403.
- Azzopardi, M., Farrugia, G., Balzan, R. 2017.** Cell-cycle involvement in autophagy and apoptosis in yeast. *Mech Ageing Dev.*, 161: 211-224.
- Bayram, Ö. 2003.** Ortam şartlarının Ty2 retrotranspozonu transkripsiyonuna ve frame shift oranına etkilerinin analizi. Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, *Yüksek Lisans Tezi*, 59 sayfa.
- Belcourt, M.F., Farabaugh, P. 1990.** Ribosomal frameshift in the yeast retrotransposon Ty: tRNAs induce slippage on a 7 nucleotide minimal site. *Cell*, 62: 339-352.
- Boeke, J.D., Garfinkel, D.J., C. A. Syles, C.A., Fink, G.R. 1985.** Ty elements transpose through an RNA intermediate. *Cell*, 40: 491-500.
- Boeke, J.D., Eichinger, D., Castrillon, D., Fink, G.R. 1988.** The *Saccharomyces cerevisiae* genome contains functional and nonfunctional copies of transposon Ty1. *Mol Cell Biol.*, 8: 1432-1442.
- Boeke, D.J., Sandmeyer, S.B. 1991.** Yeast transposable elements. In the molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: Genome dynamics, protein synthesis, and energetics. Editors: Broach, R.J. Pringle, R.J. and Jones, W.E. (Plainview, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Pres). pp.193-261
- Bona, M., Nowak, E., Miller, J.T., Ogendi, B., Nowotny, M., Stuart Grice, SF-Lee. 2013.** Ty3 reverse transcriptase complexed with an RNA/DNA hybrid shows structural and functional asymmetry. *Retrovirology*, 10: P109.
- Botstein, D., Fink G.R. 2011.** Yeast: An experimental organism for 21st Century Biology. *Genetics*, 189: 695–704.

- Cameron, J.R., Loh, E.Y., Davis, R.W. 1979.** Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell*, 16: 739-51.
- Cebollero, E., Reggiori, F. 2009.** Regulation of autophagy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta (BBA)*, 1793: 1413-1421.
- Clare, J., Farabaugh, P. 1985.** Nucleotide sequence of a yeast Ty element: Evidence for an unusual mechanism of gene expression. *Genetics*, 82: 2829-2833.
- Clare, J.J., Belcourt, M., Farabaugh, P.J. 1988.** Efficient translational frameshifting occurs within a conserved sequence of the overlap between the two genes of a yeast Ty1 transposon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 6816-6820.
- Company, M., Errede, B.A. 1988.** Ty1 cell-type-specific regulatory sequence is a recognition element for a constitutive binding factor. *Mol Cell Biol.*, 8: 5299–5309.
- Company, M., Adler, C., Errede, B. 1988.** Identification of a Ty1 regulatory Sequence responsive to STE7 and STE12. *Mol Cell Biol.*, 8: 2545-2554.
- Costanzo, M.J., Engel, S.R., Wong, E.D., Lloyd, P., Karra, K., Chan, E.T., Weng, S., Paskov, K.M., Roe, G.R., Binkley, G., Hitz, B.C., Cherry, J.M. 2014.** *Saccharomyces* genome database provides new regulation data. *Nucleic Acids Res.*, 42: D717–D725.
- Cristofari, G., Gabus, C., Ficheux, D., Bona, M., Le Grice, S.F., Darlix, J.L. 1999.** Characterization of active reverse transcriptase and nucleoprotein complexes of the yeast retrotransposon Ty3 in vitro. *J Biol Chem.*, 274: 36643-8.
- Curcio, M.J., Hedge, A-M., Boeke, J.D., Garfinkel, D.J. 1990.** Ty RNA levels determine the spectrum of retrotransposition events that activate gene expression in *Sacchromyces cerevisie*. *Mol Gen Genet.*, 220: 213-221.
- Curcio, M.J., Lutz, S., Lesage, P. 2015.** The Ty1 LTR-retrotransposon of budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Spectr.*, 3: 1-35.
- D’Arcy, M.S. 2019.** Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.*, 43: 582-592.
- Delorme-Axford, E., Guimaraes, R.S., Reggiori, F., Klionsky, D.J. 2015.** The yeast *Saccharomyces cerevisiae*: an overview of methods to study autophagy progression. *Methods*, 75: 3-12.
- Delorme-Axford, E., Klionsky, D.J. 2018.** Transcriptional and post-transcriptional regulation of autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*, 293: 5396-5403.

Dinman, J.D., Icho, T., Wickner, R.B. 1991. A -1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 174–178.

Duina, A.A., Miller, M.E., Keeney, J.B. 2014. Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*, 197: 33–48.

Elmore, S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.*, 35: 495–516.

Engel, S.R., Dietrich, F.S., Fisk, D.G., Binkley, G., Balakrishnan, R., Costanzo, M.C., Dwight, S.S., Hitz, B.C., Karra, K., Nash, R.S., Weng, S., Wong, E.D., Lloyd, P., Skrzypek, M.S., Miyasato, S.R., Simison, M., Cherry, J.M. 2014. The reference genome sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: Then and now. *G3* (Bethesda), 4: 389-398.

Errede, B., Company, M., Hutchinson, C.A. 1987. Ty1 sequence with enhancer and mating-type-dependent regulatory activities. *Mol Cell Biol.*, 7: 258-265.

Fannjiang, Y., Cheng, W-C., Lee, S.J., Qi, B., Pevsner, J., 2004. Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. *Genes Dev.*, 18; 2785 – 2797.

Farabaugh, P.J., Liao, X.B., Belcourt, M., Zhao, H., Kapakos, J., Clare, J. 1989. Enhancer and silencerlike sites within the transcribed portion of a Ty2 transposable element of *S.cerevisiae*. *Mol Cell Biol.*, 9 :4824-4834.

Farabaugh, P. J., Vilamadithan, A.,Türkel. S., Johnson, R., Zhao, H. 1993a. Three downstream sites repress transcription of a Ty2 retrotransposon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.*, 13: 2081-2090.

Farabaugh, P.J., Zhao, H., Vimaladithan, A. 1993b. A novel programmed frameshift expresses the Pol3 gene of retrotransposon Ty3 of yeast: frameshifting without tRNA slippage. *Cell*, 74: 93–103.

Farabaugh, P.J. 1995. Post-transcriptional regulation of transposition by Ty retrotransposons of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*, 18:10361-10364.

Farabaugh, P.J. 1996. Programmed translational frameshifting. *Annu Rev Genet.*, 30: 507-28.

Farabaugh, P.J. 2010. Programmed frameshifting in budding yeast. Recoding: Expansion of Decoding Rules Enriches Gene Expression. Editors: Atkins, J.F., Gesteland,R., pp: 221-247.

Feldman, H., 2012. Yeast: Molecular and Cellular Biology, Wiley-Blackwell, Weinheim, Germany, 1650pp.

Gerlach, R.G., Hölzer, S.U., Jäckel, D., Hensel, M. 2007. Rapid engineering of bacterial reporter gene fusions by using Red recombination. *Appl Environ Microbiol.*, 73: 4234-42.

Giannattasio, S., Guaragnella, N., Ždravlević, M., Mara, E. 2013. Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. *Front. Microbiol.*, 4: 33.

Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., Woods, R.A. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11: 355-60.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G. 1996. Life with 6000 Genes. *Science*, 274: 546, 563-7.

Gray, W.M., Fassler, J.S. 1993. Role of *Saccharomyces cerevisiae* Rap1 protein in Ty1 and Ty1-mediated transcription. *Gene Expr.*, 3: 237–251.

Gray, W.M., Fassler, J.S. 1996. Isolation and analysis of the yeast TEA1 gene, which encodes a zinc cluster Ty enhancer-binding protein. *Mol Cell Biol.*, 16: 347–358.

Greig, D., Leu, J.Y. 2009. Natural history of budding yeast. *Curr Biol.*, 19: R886-90.

Grosshans, C.D., Friedrich, A., Schacherer, J. 2013. Genome-wide analysis of intraspecific transposon diversity in yeast. *BMC Genomics*, 14: 399.

Guarente, L., Patashe, M. 1981. Fusion of *Escherichia coli* lacZ to the cytochrom c gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 78: 2199-2203.

Gutierrez, D.J., Eisenberg, T., Büttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G., Madeo, F. 2010. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death & Differentiation*, 17: 763-773.

Happel, A.M., Swanson, M.S., Winston, F. 1991. The SNF2, SNF5 and SNF6 genes are required for Ty transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 128: 69-77.

Hayward, A. 2017. Origin of the retroviruses: when, where, and how?. *Curr Opin Virol.*, 25: 23-27.

Jiang, Y.W. 2002. Transcriptional cosuppression of yeast Ty1 retrotransposons. *Genes Dev.*, 16: 467–478.

Jordan, I.K., McDonald, J.F. 1999. Comparative genomics and evolutionary dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* Ty elements. *Genetica*, 107: 3-13.

Jürgensmeier, J.M., Krajewski, S., Armstrong, R.C., Wilson, G.M, ve ark. 1997. Bax- and Bak-induced cell death in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*, 8: 325-339.

Kalnins, A., Otto, K., Ruther, U., Muller-Hill. 1983. Sequence of the lacZ gene of *Escherichia coli*. *The EMBO J.*, 2: 593-597.

Kanki, T., Klionsky, D.J. 2008. Mitophagy in yeast occurs through a selective mechanism. *J Biol Chem.*, 283: 32386-93.

Kanki, T., Klionsky, D.J. 2010. The molecular mechanism of mitochondria autophagy in yeast. *Molecular Microbiol.*, 75: 795-800.

Kanki, T., Klionsky, D.J., Okomato, K. 2011. Mitochondria Autophagy in Yeast. *Antioxid Redox Signal*, 14: 1989-2001.

Karadağ, A. 2016. Otofaji: Programlı Hücre Ölümü. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, Cilt 15, Sayı 2.

Kim, J.M., Vanguri, S., Boeke, J.D., Gabriel, A., Voytas, D.F. 1998. Transposable Elements and Genome Organization: A Comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *Genome Res.*, 8: 464-478.

Kinsey, P. T., Sandmeyer, S.B. 1991. Adjacent pol II and pol III promoters: transcription of the yeast retrotransposon Ty3 and a target tRNA gene. *Nucleic Acids Res.*, 19: 1317-1324.

Koren, A. 2006. Is *Saccharomyces cerevisiae* apoptotic cell death associated with gene transfer?. *IUBMB Life*, 58: 203-207.

Krastanova, O., Hadzhitodorov, M., Pesheva, M. 2005. Ty Elements of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 19:sup2, 19-26.

Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G., François, J. 2006. Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol Microbiol.*, 61: 1147-1166.

Laloux, I., Dubois, E., Dewerchin, M., Jacobs, E. 1990. TEC1, a gene involved in the activation of Ty1 and Ty1-mediated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and molecular analysis. *Mol Cell Biol.*, 10: 3541-3550.

Lawler, J.F., Jr., Merkulov, G.V., Boeke, J.D. 2001. Frameshift signal transplantation and the unambiguous analysis of mutations in the yeast retrotransposon Ty1 Gag-Pol overlap region. *J Virol.*, 75: 6769-6775.

- Lavrik, I.N., Golks, A., Krammer, P.H. 2005.** Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest.*, 115; 2665-2672.
- Lee, R.E., Brunette, S., Puente, L.G., Megeney, L.A. 2010.** Metacaspase Yca1 is required for clearance of insoluble protein aggregates. *Cell Biology*, 107: 13348–13353.
- Lemasters, J.J. 2005.** Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res.*, 8: 3-5.
- Liao, X.B., Clare, J.J., Farabaugh, P.J. 1987.** The upstream activation site of a Ty2 element of yeast is necessary but not sufficient to promote maximal transcription of the element. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 84: 8520-8524.
- López, M.C., Baker, H.V. 2000.** Understanding the growth phenotype of the yeast *gcr1* mutant in terms of global genomic expression patterns. *J Bacteriol.*, 182: 4970-4978.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, 193: 265-275.
- Ludovico, P., Sousa, M.J., Silva, M.T., Leão, C. 2001.** *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death in response to acetic acid. *Microbiology*, 147: 2409-2415.
- Madeo, F., Frohlich, E., Frohlich, K-U. 1997.** A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J Cell Biol.*, 139; 729 – 734.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lächelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S., Wesselborg, S., Fröhlich, K-U. 2002.** A Caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell.*, 9: 911-917.
- Madeo, F., Herker, E., Wissing, S., Jungwirth, H., Eisenberg, T., Fröhlich, K.U. 2004.** Apoptosis in yeast. *Curr Opin Microbiol.*, 7: 655–660.
- Mai, B., Breeden, L. 1997.** Xbp1, a stress-induced transcriptional repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* Swi4/Mbp1 family. *Mol Cell Biol.*, 17: 6491-501
- Mannella, C.A., Marko, M., Buttle, K. 1997.** Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle. *Trends Biochem. Sci.*, 22: 37-38.
- Marco, A., Marín, I. 2009.** CGIN1: A Retroviral contribution to mammalian genomes . *Mol Biol Evo.*, 26: 2167-2170.
- Mazzoni, C., Falcone, C. 2008.** Caspase-dependent apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta (BBA)*, 1783; 1320-1327.
- McClintock, B. 1950.** The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 36: 344-355.

- Mellor, J., Fulton, A.M., Dobson, M.J., Roberts, N.A., Wilson, W., Kingsman, A.J., Kingsman, S.M. 1985.** The Ty transposon of *Saccharomyces cerevisiae* determines the synthesis of at least three proteins. *Nucleic Acids Res.*, 13: 6249–6263.
- Morillon, A., Bénard, L., Springer, M., Lesage, P. 2002.** Differential effects of chromatin and Gcn4 on the 50-fold range of expression among individual yeast Ty1 retrotransposons. *Mol Cell Biol.*, 22: 2078-2088.
- Morris, D.K., Lundblad, V. 1997.** Programmed translational frameshifting in a gene required for yeast telomere replication. *Curr Biol.*, 7: 969-976.
- Müller, F., Brihl, K-H., Freidel, K., Kowallik, K.V., Ciriacy, M. 1987.** Processing of TY 1 proteins and formation of Ty 1 virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.*, 207: 421-429.
- Müller, M., Lu, K., Reichert, A.S. 2015.** Mitophagy and mitochondrial dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.*, 1853: 2766-2774.
- Noda, T. ve Ohsumi, Y. 1998.** Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in Yeast. *J Biol Chem.*, 273: 3963-3966.
- Ohsumi, Y. 2014.** Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res.*, 24: 9-23.
- Reed, J.C. 2000.** Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol.*, 157: 1415-1430.
- Reggiori, F., Klionsky, D.J. 2013.** Autophagic processes in yeast: Mechanism, machinery and regulation. *Genetics*, 194: 341–361.
- Risler, J.K., Kenny, A.E., Palumbo, R.J., Gamache, E.R., Curcio, M.J. 2012.** Host co-factors of the retrovirus-like transposon Ty1. *Mob DNA*, 3: 12.
- Rose, M., Casadaban, M.J., Botstein, D. 1981.** Yeast genes fused to β -galactosidase in E.coli can be expressed normally in yeast. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 78: 2460-2464.
- Rose, M.D., Winston, F., Heiter, P. 1990.** Methods in Yeast Genetics. A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Servant, G., Pennetier, C., Lesage, P. 2008.** Remodeling yeast gene transcription by activating the Ty1 long terminal repeat retrotransposon under severe adenine deficiency. *Mol Cell Biol.*, 28: 5543-5554.
- Servant, G., Pinson, B., Tchalikian-Cosson, A., Coulpier, F., Lemoine, S., Pennetier, C., Bridier-Nahmias, A., Todeschini, A.L., Fayol, H., Daignan-Fornier, B., Lesage, P. 2012.** Tye7 regulates yeast Ty1 retrotransposon sense and antisense transcription in response to adenylic nucleotides stress. *Nucleic Acids Res.*, 40: 5271–5282.

Smale, S.T. 2010. Beta-galactosidase assay. *Cold Spring Harb Protoc.*, (5):pdb.prot5423.

Stolz, A., Hilt, W., Buchberger, A., Wolf, D.H. 2011. Cdc48: a power machine in protein degradation. *Trends Biochem Sci.*, 36: 515-523.

Sultana, T., Zamborlini, A. Cristofari, G., Lesage, P. 2017. Integration site selection by retroviruses and transposable elements in eukaryotes. *Nature Rev Genetics*, 18: 292-308.

Terziyska, A. 2003. Comparative study of TY1 and TY2 retrotransposition in *Saccharomyces cerevisiae* cells induced by genotoxins. *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*, 56, 9: 83.

Torggler, R., Papinski, D., Kraft, C. 2017. Assays to monitor autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cells*, 6: 23.

Türkel, S., Farabaugh, P.J. 1993. Interspersion of an unusual GCN4 activation site with a complex transcriptional repression site in Ty2 elements of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.*, 13: 2091-2103.

Türkel, S. 1994. Transcriptional Regulation of Yeast Retrotransposon Ty2-917. (Doktora Tezi, University of Maryland-Baltimore MD, ABD. Kısmen Yayınlanmış). Ss.258.

Türkel, S., Liao, X.B., Farabaugh, P.J. 1997. GCR1-dependent transcriptional activation of yeast retrotransposon Ty2-917. *Yeast*, 13: 917-930.

Türkel, S., Yenice, B. 2006. Analysis of the effects of chromatin modifying complexes on the tTranscription of retrotransposon Ty2-917 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Turk J Biol.*, 30: 101-106.

Türkel, S., Bayram, Ö., Arık, E. 2009. Glucose signaling pathway and growth conditions regulate gene expression in retrotransposon Ty2. *Z. Naturforsch.*, 64 c, 526 – 532.

Türkel, S. 2016. Amino acid starvation enhances programmed ribosomal frameshift in metavirus Ty3 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv. Biol.*, Volume 2016, 6 pages.

Voytas, D.F. 1996. Retroelements in genome organization. *Science*, 274: 737-738.

Warmington, J. R., Waring, R.B., Newlon, C.S., Indge, K.J., Oliver, S.G. 1985. Nucleotide sequence characterization of Ty 1-17, a class II transposon from yeast. *Nucleic Acids Res.*, 13: 6679-6693.

Wilkinson, L.E., Pringle, J.R. 1974. Transient G1 arrest of *S. cerevisiae* cells of mating type alpha by a factor produced by cells of mating type a. *Exp Cell Res.*, 89: 175-87.

Wong, A.H-H., Yan, C., Shi, Y. 2012. Crystal structure of the yeast metacaspase Yca1. *J Biol Chem.*, 287: 29251-29259.

Youngren, S.D., Boeke, J.D., Sandres, N.J., Garfinkel, D.J. 1988. Functional organization of the retrotransposon Ty from *Saccharomyces cerevisiae*: Ty protease is required for transposition. *Mol Cell Biol.*, 8: 1421-1431.

Yu, K., Elder, R.T. 1989. Some of the signals for 3'-end formation in transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* Ty-D15 element are immediately downstream of the initiation site. *Mol Cell Biol.*, 9: 2431-2444.

Yu, G., Fassler, J.S. 1993. SPT13 (GAL11) of *Saccharomyces cerevisiae* negatively regulates activity of the MCM1 transcription factor in Ty1 elements. *Mol Cell Biol.*, 13: 63-71.



EKLER

EK 1. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması

EK 2. β - Galaktozidaz Aktivitesi Hesaplanması



EK 1 Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması

1: YPD (Yeast Ekstrakt, Pepton, Dekstroz)

10 gram maya ekstratı ve 10 gram pepton tartıldı. Behere saf su ve tartılan malzemeler konuldu. Manyetik karıştırıcıda çözüldü. YPD petrileri için, sıvı besiyeri ortamına 20 gram/litre agar eklendi ve otoklavda 121°C sıcaklıkta, 1 saat steril edildi. %20'lik stok çözelti glikoz hazırlandı, 121°C'de 1 saat otoklavda steril edildi. Steril edilen glikoz, besiyerinin son konsantrasyonu %2 olacak şekilde eklendi.

2: Yeast Nitrogen Base, YNB

1.7 gram/litre Yeast Nitrogen Base, 5 gram/litre Amonyum sülfat distile suda çözüldü. Otoklavda 121°C sıcaklıkta, 1 saat steril edildi. Katı besiyerleri için 20 gram/litre olacak şekilde agar ilave edildi. %20'lik stok çözelti glikoz hazırlandı, 121°C'de 1 saat otoklavda steril edildi. Steril edilen glikoz, besiyerinin son konsantrasyonu %2 olacak şekilde eklendi.

3: Sc-Ura Besi yeri

1.7 gram/litre Yeast Nitrogen Base, 5 gram/litre Amonyum sülfat distile suda çözüldü. Otoklavda 121°C sıcaklıkta, 1 saat steril edildi. Otoklavdan sonra litre için 1.98 gram/litre Sc-ura tartılıp distile suda çözüldü. Filtre sterilizasyonu yapılarak besiyerine ilave edildi. Katı besiyeri için 20 gram/litre olacak şekilde agar ilave edildi. %20'lik stok çözelti glikoz hazırlandı, 121°C'de 1 saat otoklavda steril edildi. Steril edilen glikoz, besiyerinin son konsantrasyonu %2 olacak şekilde eklendi.

4: Lityum Asetat Çözeltileri (1M ve 0,1M)

Lityum asetat 1M olacak şekilde ayarlanır ve saf suda çözülür. Steril disk filtreler ile steril edildi.

5: Polietilen Glikol (%50 PEG)

Polietilen Glikol (PEG) transformasyon için kullanıldı. Distile suda %50'lik stok çözelti olarak hazırlandı. 121°C'de 1 saat otoklavda steril edildi.

6: SDS (%0,1) ve Kloroform Çözeltileri

Sodyum dodesil sülfat, steril distile suda konsantrasyon %0,1 olacak şekilde hazırlandı. Kloroform doğrudan stoktan kullanıldı.

7: Lizis Tampon Çözeltisi (Break Buffer)

Lizis Tampon Çözeltisi için ;100 mM Tris.HCl (pH: 8) ,1 mM DTT,%20 Gliserol ve 4 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) kullanıldı.

8: Beta Galaktozidaz Tampon Çözeltisi (Z Buffer)

Z Buffer hazırlamak için;

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

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

10 mM KCl,

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

50 mM β -Merkepto-etanol çözeltisi

Oranlarda hazırlandı ve +4'te saklandı.

9: Lowry Çözeltileri

I: Lowry A çözeltisi:

20 g Na_2CO_3 ve 4g NaOH, 1 litre distile suda çözüldü.

II: Lowry-B1 çözeltisi:

1 g CuSO_4 , 100 ml distile suda çözüldü ve +4 °C'de depolandı.

III: Lowry-B2 çözeltisi:

2 g sodyum potasyum tartarat 100 ml distile suda çözüldü ve +4 C'de depo edildi

IV: Lowry-C çözeltisi:

Lowry-A, Lowry-B1 ve Lowry-B2 stok çözeltilerden aşağıda belirlenen konsantrasyonlarda taze olarak hazırlandı.

Lowry-C Çözeltisinin İçeriği:

24,5 ml Lowry A, 250 μl Lowry B1, 250 μl Lowry B2 hazırlandı ve lowry tayini için 1'er ml kullanıldı.

10: ONPG (O-Nitrofenil β -D-Galaktopiranozid)

ONPG (Sigma N1127), 4 mg/ml olacak şekilde Z-tampon çözeltisi içinde manyetik karıştırıcıda çözüldü ve +4°C'de saklandı.

11: Kafein Çözeltisi

Otofaji uyarımı için kullanılan kafein çözeltisi için; 150mM stok için kafein 0.291 gram tartıldı ve 10 ml steril distile suda çözüldü.

12: Asetik Asit Çözeltisi

Stok 17.4 M asetik asitten 1.5 M stok hazırlandı. pH= 3 ayarlandı. 8.62 ml asetik asitten alındı ve 91.62 ml steril saf su ile 100 ml olacak şekilde ayarlandı.

EK 2 β - Galaktozidaz Aktivitesi Hesaplanması

$$\text{Aktivite: } \frac{(\text{OD}_{420} \times 1.7 / 0.0045)}{(t \times V \times P)}$$

OD₄₂₀: Sarı rengin absorbansı

1.7: 980 μ l Z buffer, 20 μ l lizat, 200 μ l ONPG, 500 μ l NaCO₃ (TOPLAM HACİM)

0,0045: ONPG'nin molar absorpsiyon katsayısı

t: Reaksiyon süresi (dakika)

V:Kullanılan hücre lizatı hacmi (ml)

P:Lowry'de tayin edilen protein konsantrasyonları (mg/ml)

β -Galaktozidaz aktivitesi biririmi, dakika başına 1 mg proteince hidroliz edilen nmol ONPG miktarıdır.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ceyda Çolakoğlu
Doğum Yeri ve Tarihi : Bursa, 19.06.1995
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lise : Ulubatlı Hasan Anadolu Lisesi/ 2012
Lisans : Uludağ Üniversitesi/ 2018
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi/ 2020

Çalıştığı Kurum/Kurumlar :-

İletişim (e-posta) : ceydacolakoglu44@gmail.com

Akademik çalışmalar :

Türkel, S., Çolakoğlu, C., Tanık, E., Öztop, O.A. 2019. Induction of Autophagy and Apoptosis Affects the Gene Expression in Ty Elements of *Saccharomyces cerevisiae*. 29th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (ICYGMB). Gothenburg, İsveç. 18-22 Ağustos, 2019. (Poster).

Tanık, E., Çolakoğlu, C., Öztop, O.A, Türkel, S. 2019. Apoptosis and Autophagy Signaling Repress the Transcription of GPD1 and CYC1 Gene. 7th. International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey. İTÜ, İstanbul, 27-29 Eylül, 2019 (Poster) (Abstract published in Turk J Biol. 2019. 45 (5), Suppl. p:106.

Çolakoğlu, C., Türkel, S. 2020. Apoptosis Signaling Pathway Regulates the Gene Expression in the Yeast Retrotransposons Ty1 and Ty2. *Eur. J. Biology*,79: 36-42.

Çolakoğlu, C., Türkel, S. 2020. Otofaji aktivasyonunun Ty1 ve Ty2 psödovirüslerinde gen ifadesinin kontrolüne etkilerinin araştırılması (Yayına gönderildi).

Çolakoğlu, C., Türkel, S. 2020. Selective Autophagy Signals Regulate the Gene Expression in Ty Retrotransposons, II. International Conference on Agricultural, Biological and Life Science. Edirne, Türkiye. 1-3 Eylül, 2020. (Sözlü Sunum).

Öztop, O.A., Tanık, E., Çolakoğlu, C., Türkel, S. 2020. Investigation of the Effects of Calcium Signaling Pathway on the Cell Cycle Regulation and Transcription of Genes That Involves in Glucose Metabolism. II. International Conference on Agricultural, Biological and Life Science. Edirne, Türkiye. 1-3 Eylül, 2020. (Poster).

Türkel, S., Çolakoğlu, C., 2020. Activation of Selective Autophagy Signals Affects the Transcription and Programmed Ribosomal Frameshift Rate in Ty1 and Ty2 Retrotransposons of *S. Cerevisiae*. (Yayına hazırlanıyor).

