



**STRESLE AKTİVE EDİLEN PROTEİN KİNAZLARIN  
*EST3* GENİNDE RİBOZOMAL FRAMESHİFT HIZINA  
ETKİLERİNİN ANALİZİ**

**Süeda SARICA**



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

**STRESLE AKVİTE EDİLEN PROTEİN KİNAZLARIN *EST3* GENİNDE  
RİBOZOMAL FRAMESHİFT HIZINA ETKİLERİNİN ANALİZİ**

**Süeda SARICA**

Prof. Dr. Sezai TÜRKEKEL  
(Danışman)

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


**BURSA-2018**  
**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ ONAYI

Süeda SARICA tarafından hazırlanan "Stresle Aktive Edilen Protein Kinazların *EST3* Geninde Ribozomal Frameshift Hızına Etkilerinin Analizi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uluğadağ 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 TÜRKEL  
U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza.  


**Üye:** Dr. Öğr. Üyesi. Figen ERSOY  
U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza.  


**Üye:** Doç.Dr. Mehmet ÖZTÜRK  
Abant İzzet Baysal Üniversitesi  
Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza.  


Yukarıdaki sonucu onaylarım

  
Prof. Dr. Ali BAYRAM  
Enstitü Müdürü

12 / 06 / 2018

## Bilimsel Etik Bildirim Sayfası

**U. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;**

- 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.**

12 / 06 / 2018

**Süeda SARICA**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### STRESLE AKVİTE EDİLEN PROTEİN KİNAZLARIN EST3 GENİNDE RİBOZOMAL FRAMESHIFT HIZINA ETKİLERİNİN ANALİZİ

**Süeda SARICA**

Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Telomerler kromozom uçlarında tekrarlı DNA dizileri olup genom bütünlüğünün korunması için gereklidirler. Telomerik DNA bölgeleri normal replikasyon mekanizması ile çoğaltılmaz. Telomer replikasyonları özel bir enzim kompleksi olan “Telomeraz” enzimi ile sağlanır. *S. cerevisiae*'de telomeraz kompleksi Est1p, Est2p ve Est3p peptidleri ve özelleşmiş bir çeşit kalıp RNA olan TLC1 RNA'sından oluşur. Çeşitli stress faktörlerinin telomeraz enzim aktivitesini ve telomer uzunluklarını etkilediği bilinmektedir. Stres oluşturan ajanlar bütün canlılarda hücre içi dengeyi bozmaktadır. Bu çalışmada çeşitli stres faktörlerinin EST3 mRNA'sında oluşan +1 PRF oranına etkileri incelenmiştir. Gcn2p kinazını aktive eden amino asit açlığının *EST3*'de PRF oranını yaklaşık 2 kat aktive ettiği ve bu aktivasyonun da Gcn2p kompleksine bağlı olduğu gösterilmiştir. Bu aktivasyonda Gcn kompleksinin alt birimleri olan Gcn1p ve Gcn20p'nin daha etkin olduğu görülmektedir. Çalışmamızda Hog1p kinaz ile etki eden ozmotik stresin de *EST3*'de PRF'i yaklaşık 2 kat aktive ettiği gösterilmiştir. *S. cerevisiae* hücrelerine ozmotik stres uygulanması ile *EST3*'de PRF'in 2 kat artış gösterdiği ve bu aktivasyonunda tamamen hücredeki Hog1p kinaza bağlı olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlara ek olarak araştırmalarımız glukoz kısıtlamasının da *EST3*'de PRF'i önemli oranda kısıtladığını göstermiştir. Maya hücrelerinin fermente edilemeyen karbon kaynağı olan gliserol laktat ortamında üretilmesi ile *EST3*'de PRF'in 5-6 kat azaldığı görülmüştür. Sonuçlarımız glukoz kısıtlamasının *EST3*'de PRF oranını Snf1p kinaz ile kontrol ettiğini göstermiştir. Bu araştırmada elde edilen sonuçlar *EST3*'de PRF oranı veya etkinliğinin *S. cerevisiae*'de etkin bir şekilde SAPK'lar ile kontrol edildiğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *S. cerevisiae*, Telomeraz, Translasyon, Frameshift, Stres

**2018, XIII + 75 sayfa**

## ABSTRACT

M.Sc. Thesis

### ANALYSIS OF THE EFFECTS OF STRESS ACTIVATED PROTEIN KINASES ON THE RIBOSOMAL FRAMESHIFT RATE IN *EST3* GENE

**Süeda SARICA**

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

**Supervisor:** Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Telomeres are repeated DNA sequences at the end of chromosomes and are required for protection of genome integrity. They cannot be replicated by normal replication mechanisms. Telomere replications are carried out by specialized enzyme complex called “Telomerase”. In *S. cerevisiae*, telomerase complex consists of Est1p, Est2p and Est3p peptides and special template RNA called TLC1. It is well known that various stress factors affects telomere length and telomerase activities. In this study, the effects of various stress inducing conditions on the +1 PRF in *EST3* mRNA was investigated. Our results indicate that amino acid starvation that activates Gcn2p kinase, activates PRF rate in *EST3* more than 2-fold in Gcn2p dependent manner. It appears that Gcn2 kinase activity is partially dependent on other subunits Gcn1p and Gcn20p in the regulation of *EST3* PRF rate in stress inducing conditions. Moreover, results of this study indicate that osmotic stress which is triggered by high salt and exerted through Hog1p kinase also affects PRF rate in *EST3*. Application of osmotic stress on *S. cerevisiae* cells lead to 2-fold increase in the PRF rate of *EST3*, and this activation was completely dependent on the presence of functional Hog1p. In addition, our results indicates that glucose limitation severely restricts PRF rate in *EST3*. Growth of yeast cells in non-fermentable carbon sources such as glycerol lactate, resulted with 5 to 6-fold decrease in the PRF efficiency in *EST3*. We found that glucose limitations exerts its effects on *EST3* PRF through Snf1p kinase. Results of this thesis research clearly indicated that PRF rate or PRF efficiency in *EST3* mRNA is strictly controlled by SAPK’s in *S. cerevisiae*.

**Keywords:** *S. cerevisiae*, Telomerase, Translation, Frameshift, Stress

**2018, XIII + 75 pages**

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalıőmasının gerçekleőmesinde, akademik bilgi birikiminin artmasında ve yardım istediğim her konuda bana destek olan, yol gosteren danışmanım sayın Prof. Dr. Sezai Tırkel'e en içten teőekkürlerimi sunarım. Ayrıca Sarıca, Albayrak ve Yiğit ailelerine her daim yanımda oldukları için minnetle teşekkür ederim.

Süeda SARICA  
12. 06. 2018



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLERİN DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. Model Organizma Olarak <i>S. cerevisiae</i> 'nin Özellikleri.....	4
2.2. <i>S. cerevisiae</i> Telomer ve Telomerazı.....	7
2.3. Programlı Ribozomal Frameshift.....	14
2.4. <i>S. cerevisiae</i> <i>EST3</i> geninde PRF.....	21
2.5. <i>S. cerevisiae</i> 'da Stresle Uyarılmış Protein Kinazlar.....	24
2.5.1. Gcn Yolağı ve İşleyişi.....	24
2.5.2. Hog1 Yolağı ve İşleyişi.....	28
2.5.3. Snf1 Yolağı ve İşleyişi.....	32
2.6. Ribozomal Protein Stm1.....	35
2.7. Ribozomal Protein Asc1.....	37
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	40
3.1. Araştırmada Kullanılan <i>S. cerevisiae</i> Suşları ve Plazmidler.....	40
3.2. Lityum Asetat Metodu İle Transformasyon.....	42
3.3. <i>S. cerevisiae</i> Transformantlarının Üretilmesi.....	44
3.4. Transformantlarda $\beta$ -Galaktozidaz Aktivitelerinin Tayini.....	45
4. BULGULAR.....	47
4.1. Stres Koşullarının <i>EST3</i> 'de PRF'nin Düzenlenmesine Etkileri.....	47
4.2. Gcn2 Kompleksinin <i>EST3</i> 'de PRF'nin Düzenlenmesine Etkileri.....	49
4.3. Ozmotik Stresin <i>EST3</i> 'de PRF'nin Düzenlenmesine Etkileri.....	51
4.4. Snf1 Kinazın <i>EST3</i> 'de PRF'nin Düzenlenmesine Etkileri.....	53
4.5. Asc1p ve Stm1p Ribozomal Proteinlerinin <i>EST3</i> 'de PRF'e Etkileri.....	54
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	56
KAYNAKLAR.....	62
EKLER.....	69
Ek 1: Deneylerde kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanması.....	70
Ek 2: $\beta$ - Galaktozidaz aktivitesinin hesaplanması.....	73
Ek 3: Araştırmada kullanılan stres ajanlarının hazırlanması.....	74
ÖZGEÇMİŞ.....	75



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µm	: Mikron
g	: Gravity (santrifuj birimi)
α	: Alfa
β	: Beta
Δ	: Delta, delesyon
Σ	: Sigma
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
S	: Swedberg sedimentasyon birimi

### Kısaltmalar

	<b>: Açıklama</b>
A-site	: Ribozomal amino açıl tRNA bölgesi
aa	: Amino asit
ADP	: Adenozin difosfat
AMP	: Adenozin monofosfat
AMPK	: AMP-tarafından aktive edilen protein kinaz
ARS	: Autonomously Replicating Sequences
ASC1	: Absence of growth Suppressor of Cyp1
ATP	: Adenozin trifosfat
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CEN	: Sentromer
cDNA	: Complementary DNA
CLS	: Chronical Life Span
CST kompleksi	: Cdc13, Stn1, Ten1 proteinlerinden oluşan kompleks
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DSB	: Double Strand Break
dsRNA	: Çift zincirli RNA
E. coli	: <i>Escherichia coli</i>
EMCV	: <i>Encephalomyocarditis virüs</i>
eEF	: Eukaryotic Elongation Factor
eIF	: Eukaryotic Initiation Factor
E-site	: Ribozomal yüksüz tRNA bölgesi
EST3	: Ever Shorter Telomere 3 geni
Est3p	: Ever Shorter Telomere 3 proteini
FF	: FrameFusion
FS	: Frameshift
Gag	: Group specific antigen, virüs kapsit proteini
GCN	: General Control Nonderepressible
gDNA	: Genomik DNA
GDP	: Guanozin difosfat
GTP	: Guanozin trifosfat

<b>Kısaltmalar</b>	<b>: Açıklama (Devam)</b>
HOG	: High Osmolarity Glycerol response
Ku kompleksi	: Yku70 ve Yku80 proteinlerinden oluşan kompleks
LacZ	: $\beta$ -Galactozidaz geni
Leu	: Lösin
lncRNA	: Long Non-coding RNA
LTR	: Long Terminal Repeat
M	: Molar
MAT	: Mating type, <i>S. cerevisiae</i> 'da eşleşme tipi
MAPK	: Mitogen activated protein kinaz
MAPKK	: MAPK Kinase
MAPKKK	: MAPKK Kinase
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı RNA
NHEJ	: Non-homolog End Joining
NMD	: Non-sense mediated decay
NGD	: No-Go Decay
OD	: Optic Density
ODC	: Ornitin Dekarboksilaz
ONPG	: O-Nitro-Fenil- $\beta$ -D- Galaktosidaz
ORF	: Open Reading Frame
Pol	: Polimeraz
P-site	: Ribozomal peptidil tRNA bölgesi
NPDTA	: Nascent peptide-dependent translation arrest
PEG	: Polyeten glikol
PKA	: Protein Kinaz A
PRF	: Programlı Ribozomal Frameshift
RF2	: Release Factor 2
RNA	: Ribo Nükleik asit
RQC	: Ribosome Quality Control
rRNA	: Ribozomal RNA
<i>S. pombe</i>	: <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>S. cerevisiae</i>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAPK	: Stress Activated Protein Kinase
SC- Ura	: Synthetic complete minus uracil
SD	: Shine Dalgarno
Ser	: Serin
SIR kompleksi	: Sir2, Sir3, Sir4 proteinlerinden oluşan kompleks
Sic	: Cyclin Dependent Kinase İnhibitor
SNF	: Sucrose NonFermenting
ssDNA	: Tek zincirli DNA
ssRNA	: Tek zincirli RNA
snoRNA	: Small nucleolar RNA
STM1	: Suppressor of ToM1

<b>Kısaltmalar</b>	<b>: Açıklama (Devam)</b>
TLC	: TeLomerase Component
TLM	: Telomere Length Maintenance
tRNA	: Taşıyıcı RNA
Ty	: Transposon Yeast
URA	: Urasil
Val	: Valin
YNB	: Yeast Nitrogen Base
YPD	: Yeast extract pepton dextrose



## ŞEKİLLERİN DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. <i>S. cerevisiae</i> 'da hayat döngüsü .....	7
Şekil 2.2. Telomerik dizinin yapısı .....	9
Şekil 2.3. <i>S. cerevisiae</i> 'da telomer yapısı proteinleri.....	9
Şekil 2.4. <i>S. cerevisiae</i> 'da telomeraz yapısı.....	11
Şekil 2.5. Telomeraz proteinlerinin hücre döngüsüne göre değişimi.....	13
Şekil 2.6. HIV-1'de -1 PRF elementlerinin gösterimi .....	15
Şekil 2.7. AZ1'de frameshift bölgesindeki RNA pseudoknot yapısı.....	18
Şekil 2.8. <i>EST3</i> geninde frameshift bölgesi sekansı.....	23
Şekil 2.9. Gcn2 proteininde işlevsel domainler.....	26
Şekil 2.10. Gcn1,2, 20 Kompleksinin ribozomdaki konumu.....	27
Şekil 2.11. Hog1 sinyal yolağı ve etkileşimleri.....	29
Şekil 2.12. Snf1 yolağının işleyişi.....	33
Şekil 2.13. Stm1 proteinin ribozom üzerindeki konumu.....	36
Şekil 2.14. Asc1p'nin ribozom üzerinde yerleşimi.....	38
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan rapörtör plazmit yapısı.....	42

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşları ve özellikleri.....	40
Çizelge 4.1. Yabanıl tip <i>S. cerevisiae</i> suşunda stres koşullarının <i>EST3</i> 'de PRF oranına etkisi .....	48
Çizelge 4.2. <i>S. cerevisiae</i> Gcn mutantlarında, <i>EST3</i> geni PRF oranına stres koşullarının etkisi.....	50
Çizelge 4.3. <i>S. cerevisiae</i> $\Sigma 1278b$ suşunda <i>EST3</i> geni PRF oranına amino asit açlığının etkisi.....	51
Çizelge 4.4. <i>S. cerevisiae</i> Hog1 ve Rck2 mutantlarında, <i>EST3</i> geni PRF oranına stres koşullarının etkisi.....	52
Çizelge 4.5. <i>S. cerevisiae</i> Snf mutantında, <i>EST3</i> geni PRF oranına stres koşullarının etkisi.....	54
Çizelge 4.6. <i>S. cerevisiae</i> $\Delta stm1$ mutantında, <i>EST3</i> geni PRF oranına stres koşullarının etkisi.....	55
Çizelge 4.7. <i>S. cerevisiae</i> $\Delta asc1$ mutantında, <i>EST3</i> geni PRF oranına stres koşullarının etkisi.....	55

## 1. GİRİŞ

Maya kullanışlı ve üstün özelliklere sahip bir model organizmadır. Genomunun dizilenmiş olması, mutant, cDNA ve gDNA kütüphanelerine sahip olması her türlü moleküler biyolojik çalışma için mayayı tercih edilir bir model organizma haline dönüştürmektedir (Botstein ve Fink 2011). Telomer ve telomeraz biyolojisinin aydınlatılmasında da mayadan yararlanılmaktadır (Wellinger ve Zakian 2012).

Telomerler ökaryotlarda yaygın olarak bulunan, doğrusal kromozomların uçlarındaki ve genom stabilitesini ve dolayısıyla hücre canlılığını sağlayan nükleoprotein yapılarıdır. Telomerlerin semiconservative replikasyonu, telomeraz enziminin yapılarak uç replikasyonu problemi çözülür (Harari ve Kupiec 2014). Telomeraz enzimi Est1, Est2 Est3 proteinleri (Estp) ve TLC1 kalıp RNA'sından oluşan çok alt üniteli bir ribonükleoprotein kompleksidir. Est2p, TLC1 ile birlikte enzimin katalitik bölgesini oluştururken, Est1p ve Est3p in vivo enzim aktivitesi için gereklidir (Chen ve ark. 2018). Telomerik protein Cdc13p ve Est1p etkileşerek telomerazın telomerde toplanmasını sağlar (Kupiec 2014). Est3p 181 amino asit uzunluğunda telomeraz içinde yapısal bir proteindir. Tam uzunlukta ve işlevsel Est3p sentezi *EST3* mRNA'sından translasyon sırasında +1 yönlü programlı ribozomal frameshift (PRF) olayı ile gerçekleşir. Eğer 94. Sıradaki UGA kodonu okunarak translasyon sonlanırsa 93 aa uzunluğundaki işlevi henüz bilinmeyen bir kısa polipeptid oluşur. CUU\_AGU\_U dizisinin translasyonu sırasında + 1 PRF meydana gelirse, Lösin ve Serin şeklinde okunacak olan aminoasit dizisi, Lösin ve Valin şeklinde okunur. Bu PRF olayının meydana gelmesi işlevsel bir telomer alt birimi Est3p oluşması için elzemdir (Farabaugh ve ark. 2006). Est3 proteinde gerçekleşen +1 yönlü PRF olayı, maya Ty retrotransposonlarından translasyonel anlatım sırasında da gerçekleşmektedir. Est1p ve Est2p'nin translasyonu sırasında ise -1 yönlü PRF meydana gelmektedir (Morris ve Lundblad 1997, Advani ve ark. 2013).

Çevresel uyarıcıların PRF üzerine olan etkisi daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Türkel ve ark.'nın 2009 yılındaki yapmış oldukları çalışma ile Ty2 translasyonel anlatımı sırasında meydana gelen PRF'e glukoz sinyali yolağı ve büyüme

koşullarının etkisi olduğunu göstermişlerdir. Yine Türkel ve ark. (2011) Ty3'de PRF'e glukoz sinyal yolağının etkisini incelemiş ve besin algılanmasında görevli, ribozom ilişkili protein Stm1 ve yine ribozom ilişkili Asc1 proteinlerinin, Ty3 PRF karbon kaynağı bağımlı kontrolünü sağladıklarını göstermişlerdir (Türkel ve ark. 2009, Türkel ve ark. 2011).

Maya kullanılarak telomer uzunluğu ve çevresel stres ilişkisini aydınlatmak amacıyla yapılan çalışmalar göstermiştir ki, alkol ve asetik asit stresi telomerlerin uzamasına yol açarken, kafein ve yüksek ısı stresi telomerlerin kısalmasına sebep olmaktadır ve oksidatif stresin ise telomer uzunluğu üzerinde herhangi bir etkisi yoktur (Romano ve ark. 2013). Dolayısıyla hücrel denge sistemleri telomer uzunluğunun korunmasında etkilidir (Harari ve ark. 2013). Ayrıca oksidatif stresin telomeraz aktivitesinde azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (Kepinska ve ark. 2015). Hücrede telomer uzunluğu ile ilgili iç dengenin sağlanmasında, birçok hücrel süreci etkileyen yaklaşık 500 adet TLM (Telomere Length Maintenance) geni etkilidir (Harari ve ark. 2013, Harari ve ark. 2017).

SAPK'ler (Stress Activated Protein Kinase) hücre dışı uyarılara karşı, hücrenin stres koşullarına uyum sağlayarak varlığını sürdürmesinde iş gören hücre içi sinyal ağlarıdır (Lia De Nadal ve Posas 2009). SAPK'ler aktifleştğinde hücre içinde transkripsiyonel, post-transkripsiyonel, translasyonel, ve post-translasyonel seviyede gen anlatımı değiştirilerek hücre metabolizması ve siklusunda değişimler, düzenlemeler meydana getirilir. Böylelikle hücrenin çevresel uyarılara karşı adaptif cevap oluşturması sağlanır. (Duch ve ark. 2012).

Bu çalışmada SAPK yollarından Snf1, Gcn2 ve Hog1 yolları çeşitli stres koşulları altında uyarılarak, telomeraz alt birimi Est3p anlatımı sırasında gerçekleşen PRF oranına etkisi incelenmiştir. Gcn2 yolağı, aminoasit açlığında uyarılan bir yolak olup, aminoasit sentezinde görevli genlerin anlatımını değiştirerek, aminoasit açlığına karşı hücrel cevap oluşturur (Castilho ve ark. 2014). Azalan glukoz seviyesi ile aktifleşen, Snf1 yolağı ise, hücre içerisinde birçok süreçle ilişkili olmakla birlikte ana işlevi azalan glukoz seviyesine karşı hücre içerisinde glukoz üretimini ve tutumunu etkileyen

süreçlere müdahale etmek ve hücre içi enerji dengesini sağlamaktır (Conrad ve ark. 2014). Hog1 yolağıysa hücre dışı osmotik strese karşı hücre içerisinde gliserol birikimini artırarak hücrenin turgor basıncını yeniden oluşturur ve ayrıca daha birçok genin anlatımını etkileyerek osmotik stres koşullarında hücrenin varlığını sürdürebilmesini sağlar (Hohmann 2015, De Nadal ve Posas 2015). Hog1 alt akış hedeflerinden olan Rck2p sayesinde ise translasyonel kontrol sağlayabilmektedir (Kumar ve ark. 2015).

Bu tez çalışması kapsamında daha önce PRF'in düzenlenmesinde etkili oldukları bilinen, ribozom ilişkili proteinlerden Stm1p ve Asc1p proteinlerinin de EST3 mRNA'sında translasyonda PRF oranına etkisi de incelenmiştir. Stm1p ribozom üzerinde yer alan, stres ilişkili bir *S. cerevisiae* proteindir (Ben-Shem ve ark. 2011). Asc1p ise ribozom ilişkili, birçok biyolojik sürece müdahil olan ve translasyonun düzenlenmesinde etkili bir *S. cerevisiae* proteindir (Opitz ve ark. 2017).

Bu çalışmada incelen SAPK'ler, korunmuş yollar olup memelilerde hatta insanda karşılıkları bulunduğu ve aynı şekilde prokaryot ökaryot fark etmeksizin birçok mikroorganizmada hatta insanda PRF'in varlığı gösterildiğinden, yapılan bu çalışma ile frameshift düzenleme mekanizmalarına ve SAPK'lerin tanımlanan işlevlerine bir yenisini daha ekleyen bir araştırma olarak önem taşımaktadır. Aynı zamanda işlevsel bir telomeraz için gerekli Est3p'ni oluşturulması için gereken koşullara da ışık tuttuğundan telomer ve telomeraz biyolojisine dolayısıyla kanser, hücre ömrü ve yaşlanma çalışmalarına ve medikal süreçlerine de katkı sağlamaktadır.



## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Model Organizma Olarak *S. cerevisiae*'nin Özellikleri

Mayalar fungi ailesine ait tek hücreli ökaryotik organizmalardır (Zhao 2017). Bir maya türü olan *S. cerevisiae*, *cerevisiae* bilimsel ismi biradan gelmektedir (Duina ve ark. 2014). *S. cerevisiae*'nin farklı suşları bira ve ekmek yapımında kullanılması sebebiyle Budding yeast, Baker yeast ve Brewer's yeast isimleriyle de bilinmektedir (Zhao 2017).

Çok hücreli ökaryotlara benzer olarak mayaların da nükleusları ve membranlı sitoplazmik organelleri vardır. Ancak çok hücreli ökaryotlardan farklı olarak, mayalarda hücre zarlarının dışında, hücre duvarı bulunur. Maya hücre duvarı 100-200 nm kalınlığında olup glukan, kitin ve mannan başlıca yapısal bileşenleridir (Feldmann 2012).

*S. cerevisiae* hücreleri haploid veya diploid olarak bulunabilir. Haploid maya hücreleri MAT $\alpha$  veya MAT $a$  eşey tiplerinde olabilir. Bu iki eşeysel tipin eşleşmesiyle MAT $\alpha$ /MAT $a$  diploid hücreleri meydana gelir. Diploid durumda eşleşemeyen MAT $\alpha$ /MAT $a$  hücreleri besince fakir koşullarda mayoz bölünme geçirerek haploid sporlar üretirler. Dört adet haploid hücreden oluşan bu yapıya "Ascus" adı verilir (Şekil 2.1) (Duina ve ark. 2014). *S. cerevisiae* hücreleri vejetatif büyüme sırasında, aslında bir kapalı mitoz bölünme olan tomurcuklanma ile çoğalırlar. Böylece oluşan tomurcuğa yavru hücre denirken, tomurcuklanan hücreye ise ana hücre denilmektedir (Duina ve ark. 2014). Yavru hücrenin ana hücreden bölünerek kopması sonucu ana hücrenin hücre duvarında "Bud Scars" denilen özelleşmiş, yüzük şeklindeki iz kalmaktadır (Feldmann 2012).

*S. cerevisiae* genomunun dizilenmesi 1996 yılında tamamlanmıştır. Böylece *S. cerevisiae* genomu dizilenen ilk ökaryotik genom olmuştur (Botstein ve Fink 2011, Duina ve ark. 2014). Elde edilen bu genom dizisi sayesinde ökaryotlarda genom organizasyonu ve evrimi yönünden büyük bir bilgiye ulaşılmış olup, diğer

organizmaların genomlarının dizilenmesinde de büyük yarar sağlamıştır. (Duina ve ark. 2014, Feldmann 2012)

*S. cerevisiae* haploid genomu  $\sim 12 \times 10^6$  bç genomik DNA'ya sahiptir (Duina ve ark. 2014). Bu genomik DNA boyutları 250 kb ve >2500 kb arasında değişen 16 kromozom üzerinde taşınmaktadır (Feldmann 2012). *S. cerevisiae* genomunda kodlama yapmayan genler bulunmasına rağmen protein kodlayan genler oldukça yüksek sıklıkta olup gen yoğunluğu insan genomuna göre  $\sim 50$  kat fazladır. *S. cerevisiae* genomunda protein kodlamayan genler de vardır. Bunlar sayıları 300'e yakın tRNA genleri, kromozom 12 üzerinde 100-200 kopyanın art arda dizilmesiyle dört farklı rRNA molekülü kodlayan rDNA genleri, small nuclear RNA'lar (5 adet), small nucleolar RNA genleri (76 adet) ile endoplazmik retikuluma protein hedeflenmesinin parçası olan SCR1 ve telomeraz RNA'sı TLC1, transkripsiyon düzenleyici SRG1, ICR1, PWR1' kodlayan genlerdir. *S. cerevisiae* kromozomları üzerinde sentromer (CEN), ARS ve telomer özelleşmiş dizileri bulunmaktadır. Replikasyon orjinleri her bir kromozomda  $\sim 20-40$  kb aralıkla bulunmaktadır ve ARS (Autonomously replicating sequences) elementleri olarak adlandırılır. Kromozomların uçlarında ise özel DNA dizisine ve bu diziyle ilişkili proteinlere sahip telomer tekrarlı DNA dizileri bulunmaktadır. Telomerik bölgeler  $\sim 300$  bp uzunluğunda olup,  $G_{1-3}A/TG_{1-3}$  tekrarlı dizisi ile ilişkili dizi olarak isimlendirilen subtelomerik bölgelerden meydana gelmektedir. *S. cerevisiae* genomunda bunlara ek olarak LTR (Long terminal repeat) ve Ty elementleri, 16 kromozoma dağılmış olarak bulunmaktadır (Duina ve ark. 2014).

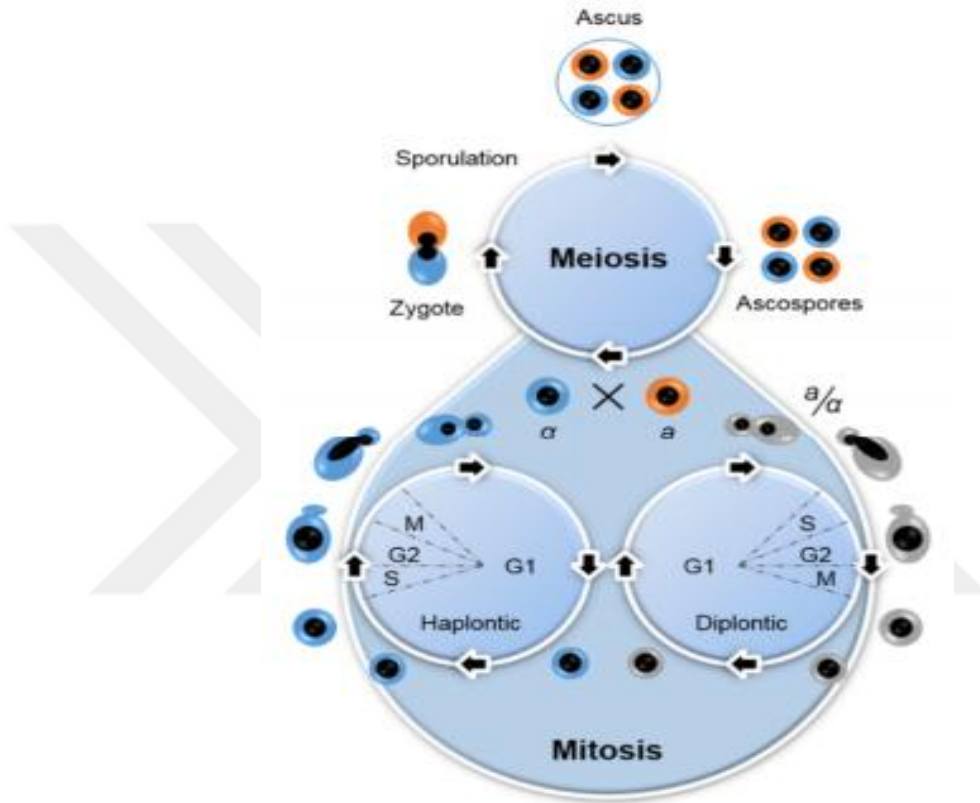
*S. cerevisiae* genomunda genomik DNA'ya ek olarak bulunan diğer genetik elementler retrotranspozonlar (Ty1-Ty5), ssRNA virusleri (T ve W) ve dsRNA virüsleridir (L-A) (Zhao 2017). Mayaların sahip olduğu bir diğer kromozom dışı genetik element ise 2µm plazmididir. Bu plazmit halkasal DNA plazmiti olup stabil yapıdadır ve S fazında replike edilir. Üzerinde dört adet gen taşıyan bu plazmit maya rekombinant DNA teknolojisinde, klonlama vektörlerinin geliştirilmesinde öncülük etmiştir. Maya klonlama vektörlerinden YEep (Yeast Epizomal plazmit) vektörlerinin yapısı 2 mikron plazmitine dayanmaktadır (Feldmann 2012). Bununla birlikte Ty elementleri ve özellikle 2 mikron plazmitinin maya hücrelerindeki işlevi halen belirsizdir.

İnsan biyolojisi ve hastalıkları ile ilişkili birçok protein ilk olarak mayada bu proteinlerin homologlarının çalışılmasıyla keşfedilmiştir. Buna ek olarak, ökaryotik hücrelerde meydana gelen bölünme, hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücresel transport, programlı hücre ölümü ve otofaji moleküler temelleri maya hücrelerinde de korunmuştur. Bu nedenle de maya hücreleri hücre moleküler biyolojisi ile ilgili birçok konunun araştırılmasında model organizma olarak kullanılmaktadır. Mayada yapılan çoklu ve kalıcı heterolog protein çalışmaları ile ilgilenilen memeli genlerinin büyük ölçekli ve fonksiyonel karakterizasyonu yapılabilmektedir (Zhao 2017). Mayalarda bulunan [PSI]-faktör, memeli prionları ile analogtur. Böylece maya prion çalışmalarında da kullanılabilir (Botstein ve Fink 2011). Mayalar kendi endojen virüslerini taşıdıklarından insan, bitki, hayvan gibi yüksek ökaryotlara ait virüslerin çalışılmasında da kullanılırlar (Zhao 2017). Maya büyüme şartları kontrol edilebildiği için çevresel parametrelerin çalışılması için elverişlidir (Feldmann 2012). Maya kısa ikilenme süresine sahip bir ökaryotik organizma olduğundan, evrimsel adaptasyon çalışmalarında da kullanılabilirliği mümkündür. Mayalar düşük maliyetli besiyerlerinde üretildiğinden ve fermentasyon teknolojisindeki bilgi birikimi sayesinde çeşitli üretim sektörlerinde ticari boyutlarda üretim için yaygın olarak kullanılmaktadır, “Large scale” üretimlerde de kullanılmaktadır (Botstein ve Fink 2011).

Maya diğer ökaryotik sistemlere ait gen ürünlerinin çalışılması için genetik manipülasyona elverişlidir (Feldmann 2012). Maya genomunda gerçekleştirilen mutasyonlar ile, neredeyse her açık okuma çerçevesinin delesyon seti oluşturulmuştur ve bu mevcut setler sayesinde birçok genin biyolojik rolü ve düzenleniş mekanizması çalışılabilir (Botstein ve Fink 2011). Maya genomunun dizilenmiş olması, gDNA ve cDNA kütüphanelerinin varlığı, delesyon setine sahip olması hücresel faktörlerin belirlenmesi ve çalışılmasında büyük kolaylık sağlar (Zhao 2017).

Maya sayesinde insan biyolojisi, kanser biyolojisi ve fizyolojisi çalışmalarına büyük katkı sağlanmıştır. Bunun doğal bir sonucu olarak da maya genetiği alanındaki temel araştırmalara çok sayıda Nobel Tıp ve Fizyoloji ödülü verilmiştir. *S. cerevisiae* ve *S. pombe*'de hücre döngüsü üzerine yaptıkları çalışmalar dolayısıyla Leland Hartwell ve

Paul Nurse 2001 yılı Nobel Tıp ve Fizyoloji ödülünü almışlardır. Dr. Randy W. Schekman maya hücrelerinde salgı veziküllerinin taşınımı ve sitoplazmik vezikül transportunun moleküler biyolojisi üzerine yaptıkları çalışma ile de 2013 yılında Nobel Tıp ve Fizyoloji ödülü kazanan üç bilim insanından biri olmuştur. 2016 yılında ise Dr. Ohsumi otofojinin kontrolü ve moleküler bileşenleri alanındaki çalışmaları ile Nobel Tıp ve Fizyoloji ödülünü tek başına almıştır (Zhao 2017).



Şekil 2.1. *S. cerevisia*'de hayat döngüsü (Zhao 2017)

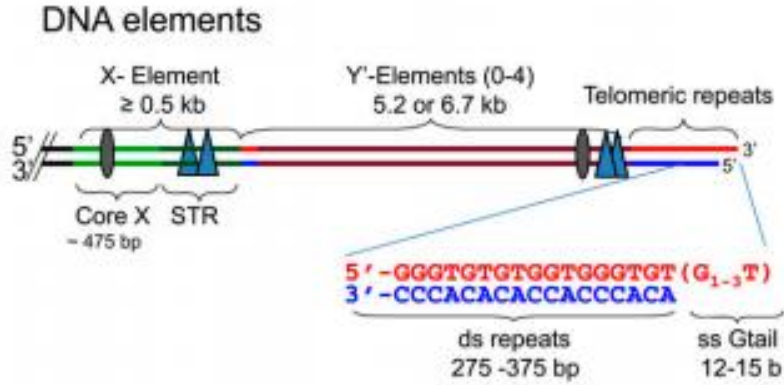
## 2.2. *S. cerevisiae* Telomer ve Telomerazi

Telomerik DNA'nın varlığı ilk kez E. Blackburn ve J. Gall'in, *Tetrahymena thermophila*'da yaptıkları çalışmalarla ortaya çıkmıştır. Daha sonra diğer ökaryotlarda da yapılan dizileme çalışmalarıyla diğer ökaryotların da tekrarlı ve genellikle G'nince zengin telomerik dizilere sahip olduğu gösterildi. Telomerler, genom bütünlüğünü sağlayan ve koruyan hayat süreci için gerekli, ökaryotik kromozomların uçlarında bulunan tekrarlı diziler ve çeşitli proteinlerden oluşan nükleoprotein yapılarıdır (Pfeiffer ve Lingner 2013, Kupiec 2014). Ökaryotların sahip oldukları telomerik diziler farklılık

gösterse de temel yapı ve görev itibari ile hepsi arasında benzerlik bulunmaktadır. Ancak bir istisna olarak ökaryotlar içinde *Drosophila*'nın ise kromozom uçlarında telomerik dizi yerine retrotranspozonların telomerik DNA görevi olduğu bulunmuştur (Pfeiffer ve Linger 2013).

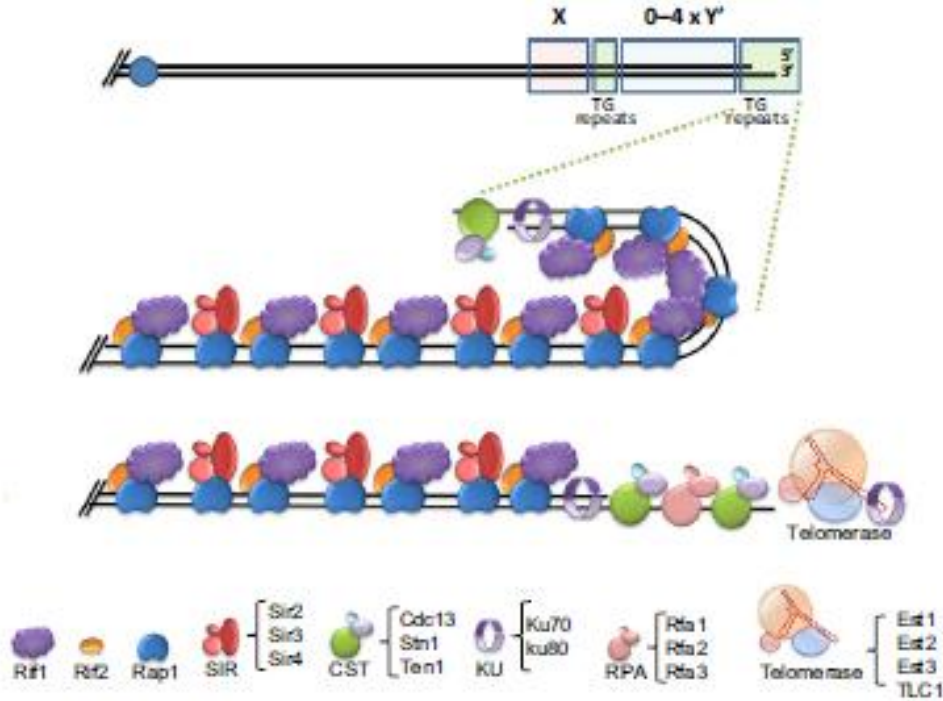
Telomerler kromozom uçlarının çift zincirli DNA kırıkları olarak algılanıp, gereksiz tamirini önlerler. Bu sayede de tamir sonucu oluşacak kromatit ya da kromozomal füzyonların önüne geçer ve dolayısıyla genom stabilitesini sağladığından hücre ölümü ya da kanserleşmeye mani olurlar. *S. cerevisiae* gibi tek hücreli organizmalar, kanser hücreleri ve memelilerin embriyonik hücreleri gibi hızlı bölünme ve çoğalma yeteneğindeki hücrelerde, telomeraz anlatımını aktif olarak yapılmaktayken, çoğu somatik hücre için bu geçerli değildir. Somatik hücrelerde telomeraz anlatımı düşük olduğundan her bölünmede telomerler giderek kısalır (Harari ve ark. 2017, Harari ve Kupiec 2014).

*S. cerevisiae* telomerleri  $300 \pm 75$  bp uzunluğunda,  $G_{1-3}A/TG_{1-3}$  olarak kısaltılmış diziden oluşan ve protein kodlamayan tekrarlı DNA yapılarıdır (Şekil 2.2). *S. cerevisiae* telomerleri kör uç ile bitmeyip G tail olarak adlandırılan, 3' ipliğin G'nince zengin tekrarlar, 5' iplikten daha uzun olduğu bir yapıdadır. Geç  $S/G_2$  fazında ise kısa bir süre boyunca  $\geq 30-100$  nt boyunda olabilmektedir (Wellinger ve Zakian 2012). *S. cerevisiae* diğer ökaryotların çoğuna benzer olarak telomerik dizilere ilaveten subtelomerik tekrarlara sahiptir ve bu subtelomerik bölgeler X ve Y' elementleri olarak adlandırılır. Bu elementlerin her ikisinde ARS (Autonomously Replicating Sequences) olarak adlandırılan potansiyel replikasyon orjinleri barındırmaktadır ve maya suşları arasında suştan suşa farklılık gösterebilmektedir (Kupiec 2014).



**Şekil 2.2.** Telomerik dizinin yapısı (Wellinger ve Zakian 2012)

Telomerik fonksiyonları yerine getirebilmesi için telomer dizilerine bağlı birçok protein bulunmaktadır. Telomerik proteinler sayesinde telomerlerin kapatılması veya örtülmesi (telomere capping) sağlanır ve kromozom uçlarının üç boyutlu katlanmasında işlev görerek kromozom uçlarını korurlar (Şekil 2.3.). Bu sayede kromozom uçlarının hem parçalanmasını hem de diğer kromozomlara bağlanması engellenmiş olur (Harari ve Kupiec 2014).

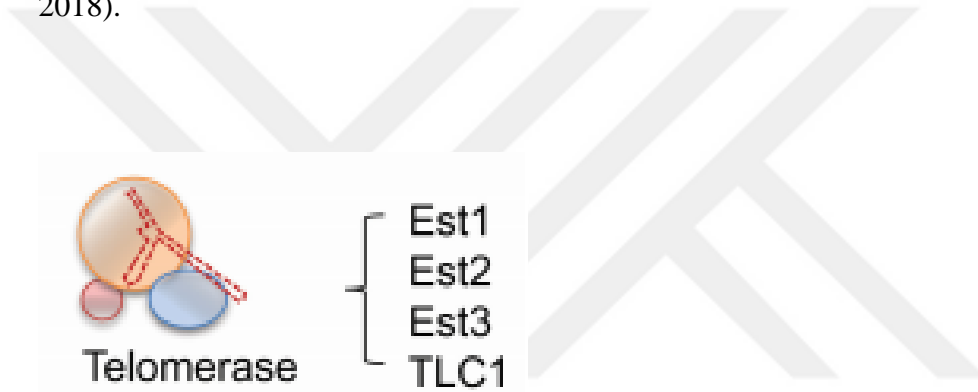


**Şekil 2.3.** *S. cerevisiae*'da telomer yapısı proteinleri (Kupiec 2014)

Telomerik proteinler Rap1, Rif1 ve Rif2 ile Ku, CST, SIR komplekslerini meydana getiren proteinlerdir. Rap1 proteini haploid hücre başına 4000 molekül ile hücre içerisinde bol bulunan, esansiyel ve telomere yüksek affinite ile bağlanan bir proteindir. Sahip olduğu iki ardışık myb domain ile telomerik DNA'ya bağlanarak, Rap1 konsantrasyonuna bağlı "counting" mekanizması ile telomer uzunluğunun belirlenmesi için gereklidir. Bu işlevinin yanı sıra Rap1 proteini telomer-telomer füzyonlarını önler, kromozom uçlarını korur, gen ekspresyonunun baskılanmasında etkilidir ve stres koşullarında genel transkripsyonu düzenlemede hem aktivatör hem de repressör görevi üstlenir. Ayrıca telomerin, nükleus çevresinde yerleşmesinde de Rap1 proteinine ihtiyaç vardır. Rif1 ve Rif2, Rap1p C-terminal bölgesine bağlanan, birbirinden bağımsız olarak çalışan ve DNA'ya bağlanan iki proteindir. Bu iki proteinin mutantlarıyla yapılan çalışmalar, telomer uzunluğunu olumsuz yönde etkileyen proteinler olduklarını göstermişlerdir ve telomerik DNA'nın kırık kromozomlar gibi algılanarak tamirinin önlenmesinde önemli işleve sahiptirler. Yku80 ve Yku70 proteinleri birlikte Ku kompleksini oluşturmaktadır ve Ku kompleksi sayesinde telomerler DSB gibi algılanarak NHEJ (Non-Homolog End Joining) ile tamir edilmekten kurtulurlar. Bunun dışında Ku kompleksi telomerleri peri nuklear alana sabitlenmesinde ve telomeraz RNA'sının nükleusa taşınmasında işlevseldir. CST kompleksi, Cdc13, Stn1 ve Ten1 proteinlerden meydana gelmektedir ve hücrel DNA replikasyonu süresince ssDNA'ya bağlanmaktadır. SIR kompleksi ise Sir2, Sir3, Sir4 proteinlerinden meydana gelmekte olup telomere yakın olan genlerin sessizleşmesinde etkilidir. Kompleks ayrıca maya kromozomlarının geriye katlanmasında ve telomerlerin nuklear zara bağlanmasında etkilidir (Harari ve Kupiec 2014, Kupiec 2014).

DNA polimeraz sadece 5'-3' yönünde sentez yaptığından ve de novo replikasyon başlatamayıp bir RNA primerine ihtiyaç duyduğundan kromozom uçlarındaki telomerlerin çoğaltımında, "End replication problem" ortaya çıkar. Bu problem telomeraz enzimi varlığıyla giderilir. Telomeraz aktivitesi tüm genom replikasyonu eşlenik olarak gerçekleşir, bu durum telomer yakınlarındaki replikasyon orjinleri sayesinde başarılı ve telomerazlar kısa kromozom uçlarında birikerek, kısa telomerleri uzatırlar (Harari ve Kupiec 2014, Wellinger ve Zakian 2012).

Lundblad ve Szostak tarafından 1989'da *S. cerevisiae*'da *est* (ever shorter telomere) mutantları tanımlanmıştır. Est1p, Est2p ve Est3p olarak adlandırılan bu faktörlerin telomerazın bir parçası olduğu gösterilmiştir. Maya telomerazı Est proteinlerine ek olarak reverse transkriptaz aktivitesini yerine getirirken kalıp olarak kullandığı telomeraz RNA'sına (TLC1) sahip çok alt üniteli bir ribonükleoprotein kompleksidir (Şekil 2.4.)(Chen ve ark 2018, Kupiec 2014). *S. cerevisiae*' da telomeraz core enzimi Est2p ve TLC1 RNA'sından oluşup enzimatik aktiviteyi yerine getirmek için yeterli olmasına rağmen, in vivo fonksiyonunu sağlayabilmesi için Est1p ve Est3p faktörlerine de ihtiyacı vardır. Ayrıca Pop1/Pop6/Pop7 ve Ku heterodimeri ile Sm7 heteroheptameri telomeraz fonksiyonunda görevli olup TLC1'in işlevi için gereklidirler (Chen ve ark 2018).



**Şekil 2.4.** *S. cerevisiae* telomeraz yapısı (Harari ve Kupiec 2014)

Est1p, EBS1 olarak adlandırılan bir paraloğa sahiptir. *EST1* geni kromozom XII üzerinde yer alır ve 699 aa uzunluğundaki Est1p proteinini kodlar (Anonim 2018a). Est1p oldukça korunmuş bir proteindir. Bazı amino asit farklılıkları olmakla birlikte memelilerde de bulunur. Est1p, TLC1'ye direkt olarak bağlanır. Bu etkileşim ile geç S/G2 fazda hem Est1p'nin hem de Est2p'nin telomere getirilmesini sağlar. Est1p'nin başlıca görevi telomer ve telomerazın etkileşimine aracılık etmektir. Est1p, Cdc13p ile de direkt olarak etkileşmektedir (Welinger ve Zakian 2012).

Est2p, 884 aa uzunluğunda olup, kromozom XII üzerinde kodlanmaktadır (Anonim 2018b). *S. cerevisiae* telomerazının katalitik alt ünitesidir, reverse transkriptaz aktivitesine sahiptir. Est2p'de diğer reverse transkriptazlarda da mevcut olan 3 değişmez aspartat kalıntısı taşımaktadır. Uzun bir temel N-terminal (TEN) domaine

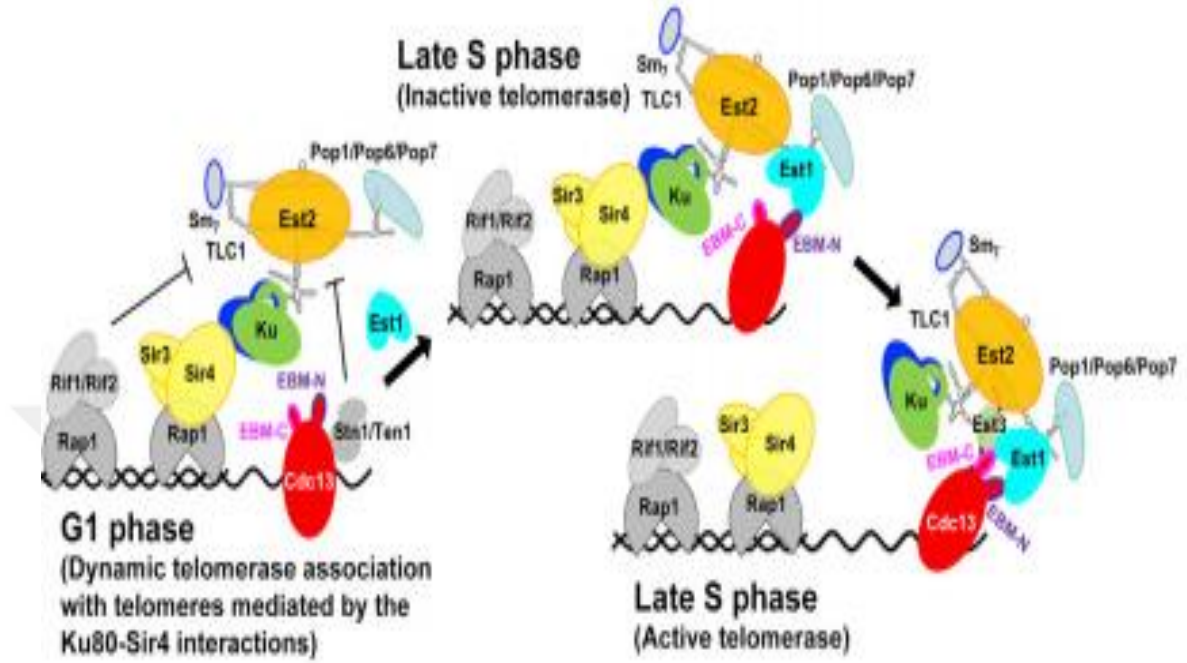


sahiptir. TEN domain sayesinde in vivo ve in vitro olarak katalitik aktivitesini sergileyebilir ve TLC1 ve Est3p ile etkileşim kurabilir. Est2p miktarı TLC1 bağımlı düzenlenmekte olup hücre başına >40 molekül kadardır (Welinger ve Zakian 2012).

Est3p de in vivo telomeraz aktivitesi için gereklidir. Ancak enzimin in vitro katalitik aktivitesi için gerekli olmadığı da bulunmuştur. Est1p aracılığı ile telomeraza bağlanan Est3p'nin telomerazla olan ilişkisi Est2 proteinine bağlıdır (Welinger ve Zakian 2012). Est3p'nin potansiyel homoloğu memeli TPP1 proteini olabilir. Bu iki protein birbirinin tam eşdeğeri olmasa da Est3p, TPP1 proteinin OB-fold domainine karşılık gelmektedir (Lue ve ark. 2013). Est3p diğer Est proteinlerinden farklı olarak kromozom IX üzerinde bulunmaktadır ve işlevsel ve tam uzunluktaki (181 amino asit) Est3 proteinin translasyonu programlı ribozomal frameshift (PRF) ile gerçekleşir. *EST3* geni fenotipi belirlenmek üzere yapılan çalışmalar, bu proteinin *S. cerevisiae*'da farklı işlevleri olduğunu da öne sürmektedir. Est3p'nin ayrıca vegetatif büyüme, ısı duyarlılığı, lipid partikül morfolojisi, kimyasallara direnç, kimyasal bileşen birikimi, koloni morfolojisi, kromozom/plazmit korunumu ile de ilişkili olduğunu göstermiştir. (Anonim 2018c)

*S. cerevisiae* telomerazları hücre döngüsünün G1 fazında inaktif olup, telomerlerle geçici ilişki içerisindedirler. Telomerlerde bulunan proteinlerin hücre döngüsüne de bağlı olarak telomerik DNA bölgelerinde yer aldığı gösterilmiştir. G1 fazında Ku iki önemli rol üstlenir; birincisi TLC1 RNA'sı tanıyarak etkileşir, ikincisi Ku80 ve Sir4 arasındaki etkileşim ile Ku telomerazı telomerlerin dupleks kısmına getirir. Bu iki işlev sayesinde telomerde telomeraz birikimi kolaylaşır. Cdc13 proteini hücre döngüsü boyunca telomerlere bağlı olarak bulunmaktadır ancak geç S fazında, sayıca artmaktadır ki bu zaman uzun G-tail yapısının oluştuğu zamandır (Chen ve ark. 2018). Est2p'de sadece geç S fazında değil, hücre siklusu boyunca telomerler ile etkileşir haldedir. Est1p ve Est3p ise sadece geç S fazında telomer ile etkileşimdedir (Kupiec 2014). Hücre siklusu geç S fazına geldiğindeyse, Est1p sayısında artış gözlenir. Cdc13p, Stn1-Ten1'den bağımsız olarak telomerdeki varlığını sürdürür böylece bağımsız Cdc13p ve Est1p etkileşerek, telomerazın 3'ss overhang/3' G tailde toplanmasını sağlar. Cdc13-Est1p etkileşiminin, TLC1-Ku-Sir4 yolağıyla iş birliği içerisinde olduğu

düşünülmektedir (Şekil 2.5). Ayrıca Ku80-Sir4 etkileşiminin Cdc13-Est1p etkileşimini artırıyor olabileceği de düşünülmektedir (Chen ve ark. 2018).



Şekil 2.5. Telomeraz proteinlerinin hücre döngüsüne göre değişimi (Chen ve ark. 2018).

Telomer uzunluğu, telomerlerin telomerazlarca uzatılması ve nükleazlarca kısaltılmasıyla belirlenir. Yabani tip *S. cerevisiae* hücrelerinde telomer uzunluğu daima aynıdır. Bunun sebebi ise telomer uzunluğunu düzenleyen bu iki mekanizma arasındaki dengenin korunarak her hücre için telomer boyutunun tam olarak aynı kalmasına yarayan hücre içi güçlü bir mekanizmanın varlığıdır (Harari ve Kupiec 2014). TLM gen grubu (Telomere Length Maintenance) olarak adlandırılan yaklaşık 500 gen telomer uzunluğunun korunmasını etkiler. Çevresel streslerin telomer uzunluğunu belirlemede rol oynadığı bilinmektedir. Bazı çevresel stresler telomerin uzamasına sebep olurken (etanol, asetik asit gibi) bazılarıyla telomerlerin kısaltılmasına (kafein gibi) sebebiyet verir. Ancak ekstrem uzun telomerler (yabani tip maya hücrelerindeki gibi yaklaşık 5 kat daha uzun) insanda kanser hastalarında görülen bir fenotipken, maya hücre fitnessına pozitif ya da negatif bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Harari ve ark. 2017).

### 2.3. Programlı Ribozomal Frameshift

Programlı ribozomal frameshift (PRF) aynı mRNA üzerinden iki veya daha fazla protein ürünü oluşmasına imkan veren normal translasyon dışı bir düzenlenme mekanizmasıdır. PRF'in meydana gelebilmesi için mRNA üzerinde özel ikincil yapısal elementler veya spesifik mRNA dışileri (kodonları) bulunması gereklidir. Bu elementler sayesinde ribozomlar translasyon sırasında ileri veya geri kayarak, okuma çerçevesini tekrar düzenler (Bayegan ve ark. 2016).

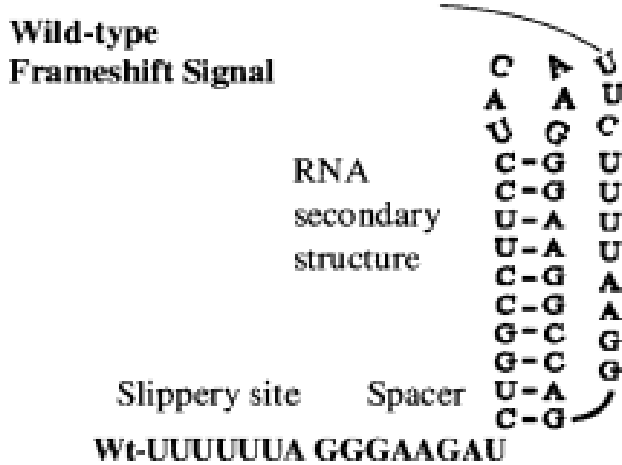
Genom dizisinde oluşan insersiyonlar ve delesyonlar frameshift mutasyonlarını meydana getirir ki bunun sonucunda fonksiyonel olmayan proteinler oluşur. Bu proteinler genom stabilizasyonunu bozarak tümör oluşumuna sebep olabilir (Ketteler 2012). Ancak frameshift mutasyonlarından tamamen farklı olan, programlı ribozomal framesift ile overlapping gen kodlanmasına imkan verilerek translasyonel düzeyde düzenlenme sağlanır ve mRNA stabilize düzenlenir (Tsai ve ark. 2017). Translasyon replikasyon ve transkripsiyona göre hataya çok açık bir işlemdir, translasyonel hata oranı %0.1 olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte frameshift oranının %1'den daha fazla oranda gerçekleşmesi PRF'in çok sıkı şekilde kontrol edilen ve belirli oranda protein sentezinin gerçekleşmesini sağlayan bir moleküler işlem olduğunu da göstermektedir (Tinoco ve ark. 2013).

PRF, genelde iki şekilde meydana gelir. mRNA üzerinde okuma yaparken ribozomların 5' yönünde 1 nt geri kaymasıyla -1PRF ve 3' yönünde 1 nt ileri sıçraması veya kaymasıyla +1 PRF oluşur. Ribozomların hangi yönde yer değiştireceği ise mRNA üzerindeki çeşitli cis-acting elementlere bağlı olarak ve termodinamik olarak yararlı olacak şekilde belirlenir (Tsai ve ark. 2017, Ketteler 2012).

PRF, canlıların üç domaininde de kullanılan yaygın bir mekanizmadır. Bunun yanında PRF virüsler, retrotranspozonlar, insersiyon elementleri ve mitokondri organel genomunda da kullanılan bir translasyonel kontrol mekanizmasıdır (Namy ve ark. 2004). PRF sadece +1 ve -1 yönünde değil, -2 yönünde de meydana gelebilir, bu

durumun varlığı bir faj olan Mu'da, arteviruslerde (nsp2TF) ve *Trichomonas vaginalis* virüs-1'de gözlenmiştir (Ivanov ve ark. 2006, Atkins ve ark. 2016). Ayrıca aynı mRNA üzerinde birden çok bölgede de PRF meydana gelebilir. Retroviruslerin bazılarında iki kez -1 frameshift meydana gelebilirken, *Perkinsus marinus* ctychrome oksidaz alt ünitesi 1'i kodlayan mitokondriyal gende 10 kez frameshift meydana gelebilmektedir. Aynı mRNA üzerinde en fazla meydana gelen framesift 12 kez olup, mitokondriyal bir gen üzerinde olmaktadır (Atkins ve ark. 2016, Ketteler 2012).

-1 PRF meydana gelebilmesi için mRNA üzerinde kaygan dizi (slippery site), ara sekans veya ara bölge (spacer) ve artırıcı aktive edici ikincil yapı/sekans (downstream stimulatory structure) olmak üzere üç adet elementin bulunması gerekir (Şekil 2.6). Slippery site 7 nt'lik bir dizidir ve okuma çerçevesindeki translasyonel kayma burada meydana gelir. Downstream secondary structure ise bir mRNA pseudonokt, stem-loop ya da hairpin yapısı olabilir. Spacer ise bu iki element arasındaki kısa dizidir ve genellikle 12 nt'den daha kısadır. Bazen down-stream secondary structure yerine upstream Shine Dalgarno (SD) dizisi bulunabilir (Dinman 2012, Tsai ve ark. 2017, Atkins ve ark. 2016).



**Şekil 2.6.** HIV-1'de -1PRF elementlerinin gösterimi (Biswas ve ark. 2004)

PRF sayesinde post-transkripsiyonel düzenlenme, protein oranının ayarlanması ve küçük genom boyutlarında daha fazla bilgi depolanması sağlanmaktadır. PRF virüslerde daha sık kullanılır ve birçok örneği bulunmaktadır (Dinman 2006). Virüslerde yaygın

olan -1 PRF ile küçük genom boyutunun en etkili şekilde kullanımı sağlanmaktadır. Ayrıca PRF sayesinde doğru kimyasal oranda viral protein üretimi gerçekleştirilerek virüsün varlığını sürdürülebilmesi sağlanır. Mesela, maya L-A virüsünde, Gag (Group specific antigen) denilen kapsid proteinleri 60 adet eş alt ünite meydana getirir ve bu alt ünitelerin birleşmesiyle viral kapsid oluşturulur. Maya L-A virusunun genomundan kodlanan bir diğer ürün ise Pol (Polimeraz) denilen viral replikazdır. Maya L-A virüsü için uygun kapsid, replikaz yani Gag-Pol oranı 60:1'dir ve bu oran L-A virüsü genomu anlatımı sırasında ribozomların -1 PRF ile Gag ORF'sinden Pol ORF'sine %1.8 oranında geçişle başlar. HIV-1, SARS gibi her virüs keline özgü PRF sinyali sayesinde, viral partikülün oluşabilmesi için viral gen ürünü oranına sahiptir ve bu durum "altın oran" olarak adlandırılır (Dinman 2012). Virüslere benzer olarak, mitokondriyal genomun kodlama kapasitesi de PRF'den yararlanılarak artırılır (Ketteler 2012). IS elementler de Frameshift'den yararlanarak iki çakışık ORF'nin anlatımı frameshift ile gerçekleşir ve bu sayede transpoz aktivitesine sahip olurlar (Atkins ve ark. 2016).

Bazı virüslerde - PRF kullanılarak iki veya daha fazla ürün meydana getirilirken, hücresel genlerde -1 PRF olaylarında, ribosomun 5' yönde kaymasıyla sonlanma kodonuna erkenden rastlayarak prematüre sonlanma oluşturulur. Bu durumda hedef mRNA NMD (Non-sense mediated decay) için substrat haline gelir (Celik ve ark. 2017, Dinman 2012). NMD mekanizması ile mRNA yapılarında bulunan internal/içsel stop kodon tanındığında bu tür mRNA'lar anlamsız kodonlu mRNA degradasyon sinyali yolağı ile hızlıca parçalanırlar. NMD mayadan insana kadar korunmuş bir kontrol mekanizmasıdır. Ayrıca mayada yapılan çalışmalarla -1PRF, No-Go-Decay yolağına da arasındaki ilişki ortaya koyulmuştur (Dinman 2012).

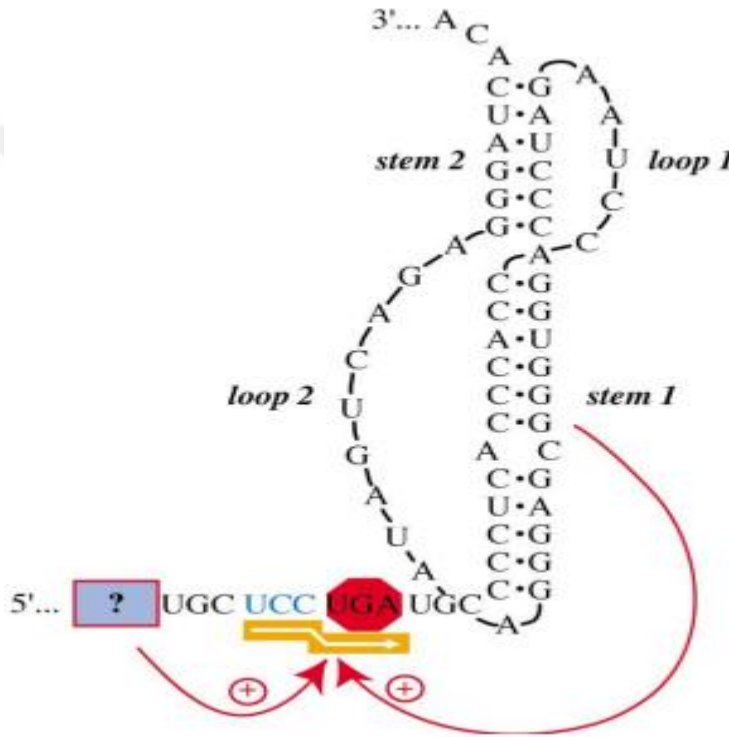
-1PRF sayesinde *E. Coli* dnaX geninden DNA Polimeraz-III holoenzimi  $\gamma$  ve  $\tau$  alt üniteleri oluşturulabilmektedir.  $\tau$  alt ünitesi genin tamamının translasyonu ile oluşturulurken,  $\gamma$  alt ünitesi translasyon sırasında -1 PRF meydana gelmesi ve ribozomların prematüre stop kodona yönlendirilmesiyle oluşturulur. Bu durum mRNA üzerindeki slippery site upstreaminde bulunan, SD-benzeri 10 nt'lik dizi ve 5 nt downstreaminde bulunan bir ilmek (stem-loop) yapısının varlığıyla gerçekleşir (Namy

ve ark. 2004). Yine *E. coli* CopA geninin translasyonu sırasında -1PRF 'den yararlanarak Copper Chaperone CopA proteini üretilmektedir. CopA geninden transkribe edilen mRNA'nın translasyonunun mRNA dizisinin sonuna kadar sürdürülmesiyle copper transporter CopA oluşturulmaktadır. CopA geninde -1PRF meydana gelmesi ile premature sonlanma oluşur ve 70 aa'lık daha kısa copper chaperone Cop A(Z) proteini üretilmiş olur. Sonuç olarak -1 PRF sayesinde aynı mRNA üzerinden, aynı kimyasal yolda görevli, farklı görevlere sahip iki farklı protein oluşturulur. Burada gerçekleşen PRF'de mRNA ile uzayan polipeptid üzerindeki özel elementler rol oynamaktadır (Meydan ve ark. 2017).

+1PRF bakteri, mantar ve memelilerde -1 PRF'e göre daha az bulunmaktadır ve -1PRF'e göre çok çeşitli frameshift sinyal mekanizmaları içermektedir (Wang ve ark. 2016). *E. coli*'de *prfB* geninden RF2 kodlanmaktadır ve RF2 bakteride UAA ile UGA kodonlarını tanıyıp translasyonu sonlandıran faktördür. *prfB* genine ait ORF içerisinde UGA sonlanma kodonu bulunmaktadır. Ancak CUU UGA C slippery sequence'de meydana gelen +1 PRF ile 340 kodonun tamamı okunabilmektedir. Yeterli miktarda RF2 varken, +1 PRF baskılanmakta, translasyon peptid zinciri slippery sequence içerisindeki sonlanma kodonunda sonlanarak RF2 üretimini kısıtlanmaktadır. Ancak RF2 miktarı azaldığında UGA tanınması azalır ve +1 PRF etkinliği artırılır. Bunun sonucu olarak, RF2 üretimine izin verilir (Wang ve ark. 2016, Dinman 2012). Burada +1 PRF etkinliğinin uyarılmasında; upstream Shine Dalgarno benzeri dizi varlığı ve 16S rRNA üzerindeki anti Shine Dalgarno dizi ile olan etkileşimin +1PRF uyarıcı etkisi, stop kodonun (UGAC) göreceli olarak zayıf sonlandırma kodonu olması etkilidir. Sonuç olarak, +1 PRF aracılığıyla translasyon sonlandırma faktörü olan RF2 translasyonu ve üretimi geri dönüşümlü olarak RF2 konsantrasyonuna göre oto regülasyon ile sağlanır (Dinman 2006, Wang ve ark. 2016, Namy ve ark. 2004).

ODC (Ornitin Dekarboksilaz) poliaminlerin biyosentezinde görevli bir enzimdir. Metazoan ve fungal hücrelerde ODC'nin önemli düzenleyicisi Ornitin Dekarboksilaz Antienzimidir ve Antienzim genleri mayalardan memelilere kadar korunmuş olup anlatımı +1PRF'ce kontrol edilir. Antienzim mRNA'sı kısa ORF'lere başlayıp +1 frame ile uzun bir ORF'ye geçerek devam eder. Aynı RF2'de olduğu gibi AZ frameshift

aktivitesi de autoregulatory feedback ile kontrol edilir. ODC aktivitesi yüksek olduğunda poliamin seviyesinde artış olur. Bu durumda, +1 PRF artar ve daha fazla antienzim sentezlenir ve ODC'ye bağlanarak aktivitesini inhibe ederek poliamin üretimini azaltır. AZ mRNA'sı üzerinde Frameshift etkinliğini artıran birkaç cis-acting mRNA elementi bulunmaktadır. Bunlardan bazıları 3' upstreamde bazıları ise 5' downstreamde konumlanmıştır. Örneğin insanda OAZ mRNA'sı üzerinde downstreamde konumlanmış uyarıcı bir ikincil yapı bulunmaktadır (Şekil 2.7) (Ivanov ve ark. 2006, Wang ve ark. 2016).



**Şekil 2.7.** AZ1'de frameshift bölgesindeki RNA pseudoknot yapısı (Namy ve ark. 2004)

Yaşayan organizmalar arasında en yüksek +1 PRF frekansına sahip olan canlı *Euplotes octocarinatus* olup, toplamda 3,700 (~%11) varsayılan +1 PRF geni tanımlanmıştır. *Euplote*'lar, c-AMP bağımlı protein kinazlar, nuclear protein kinaz, telomeraz alt birimi reverse transkriptaz, La motif protein ve MAPK1 (mitogen activated protein kinaz), Ser/Thr protein kinaz, membran occupotiaz ve recognition nexus (MORN) repeat protein gibi +1PRF ile kontrol edilen birçok gene sahiptirler. Bu genlerin hepsi benzer slippery sequence sahip olup, +1PRF sayesinde tam bir protein ürünü üretebilmektedirler (Wang ve ark. 2016).

+1PRF hücrel genler dışında retrotraspozon elementlerinde de meydana gelmektedir ve ökaryotlarda +1 PRF ilk olarak maya Ty1 elementinde keşfedilmiştir. Maya retrotranspozonlarından Ty2 ve Ty3’de de +1 PRF kullanılmaktadır (Dinman 2012). PRF’in insan genomun anlatımı sırasında da faydalanılan bir mekanizma olduğu gösterilmiştir. Örneğin, insan PEG10 geni –1 PRF mekanizması ile plasentada yüksek anlatıma sahiptir. PEG10 geni fare Edr geni homoloğu olup, Mart (For mammalian retrotranspozon derived) üyesi bir gendir. (Dinman 2006) Ayrıca insan antienzim1 geni anlatımı sırasında da +1 PRF’den yararlanılmaktadır (Atkins ve ark. 2016).

Bazı metabolik olayların varlığı, çeşitli hücre tiplerinde PRF’nin tespit edilebilirliğini kolaylaştırır. Bu durumlara örnek olarak, bazı üreme fazları (bakteri durağan faz), viral enfektif döngü ve oksidatif stres altındaki mayalar verilebilir (Atkins ve ark. 2016).

Yukarı verilen örneklerde PRF’de stimulatory elementlerin varlığı ile FS etkinliğinin artırıldığından bahsedildi, ancak bir çeşit ciliate olan Euplotes’in bazı türlerinde görülen durumlarda ve *S. cerevisiae* Ty1/antienzim benzeri +1 frameshift olduğu gibi istisnai durumlarda stimulatory elementlerden yararlanılmamaktadır. Bu istisnai durumların dışında ise yüksek frameshift etkinliği için stimulatorlere ihtiyaç vardır. Frameshift çeşitli durumların varlığı ile kontrol edilebilir. Yukarıda bahsedildiği gibi antienzim frameshift olayında poliaminler autoregulatory görevi görebilir. Poliamin seviyesinin ayrıca Ty1’de frameshifti uyardığı da bilinmektedir. Yine bahsedildiği üzere RF2’deki upstream Shine-Dalgarno dizisi varlığı ya da barley yellow dwarf virüsü 5’de bulunan stem-loop yapısının ribozomları yavaşlatarak frameshifti uyarması gibi. Ökaryotlarda ise Shine-Dalgarno etkileşimleri yoktur ancak örneğin birçok antienzim geni shift site’in 5’ mRNA dizisi frameshifti uyarması gibi FS uyarıcı elemanlara sahiptirler. Bunların yanında yapılan çalışmalar “spacer” nükleotid içeriğinin Frameshiftten yararlanmada önem taşıdığını göstermiştir. Ayrıca uzayan protein zincirinin ribozom çıkış tüneli olan etkileşimi, rRNA ve mRNA’nın, mRNA çıkış ya da giriş tüneline yakın eşleşmesi de Frameshifti uyarıcı durumlar oluşturabilir (Atkins ve ark. 2016). Bazı virüs tiplerinde triplex etkileşimlerle pseudonokt yapıları stabilize edilerek, burumsal rezistansın artırıldığı ve translasyon yapan ribozomlara daha güçlü mekanik direnç



oluşturulduğu gözlenmiştir. Bu üçüncül RNA etkileşimleri yokluğunda ise PRF etkinliğinin yetersiz kaldığı bulunmuştur. Bu virüs tiplerine örnek olarak Beet western yellow virüs ve Simon retrovirus type-1 verilebilir. İnsan cytokine receptor HIV-1 co-receptor CCR5 mRNA'sında ise microRNA ve pseudonokt yapısı arasındaki direkt etkileşim sonucu oluşan triplex yapısının -1PRF'i uyardığı bulunmuştur (Bacolla ve ark. 2015). Meydana gelen bu stabil yapının çözülmesi ribozomlar için zordur, böylece ribozomların slippery site'de durması uzar ve -1PRF tetiklenir. Herhangi bir uyarıcı element olmadığında mRNA kodlama bölgesindeki poly A'lar -1PRF'i direkt olarak etkileyebilirken, +1PRF'i etkileyemez. mRNA kodlama bölgesinde 9 adet A'nın peşpeşe sıralanması, ribozomların okuma çerçevesini değiştirmesinde etkili olmuştur ve bu kısa poli A'ların varlığı FS oranını %10 kadar uyarmıştır (Advani ve Dinman 2016). Picornaviridae ailesine ait, EMCV (Encephalomyocarditis virus) FS sırasında, viral protein 2A, mRNA stem-loop yapısına bağlanarak bir RNA:protein kompleksi meydana getirir ve böylece yüksek etkinlikte PRF oluşumunu uyarır (Naphthine ve ark. 2017).

Bu yapısal elemanların dışında PRF, hücre siklusuna, büyüme durumu bağımlı olarak, hücrelerin durağan fazda olmasına ya da viral hayat siklusu durumuna veya enfekte edilen hücrenin stabilitesine bağımlı olarak değişebilir. Bakteri hücreleri durağan faza girdiğinde FS etkinliği oldukça yükselir. *S. cerevisiae* Ty1 ve Ty2 Gag-Pol değişimi büyüme durumuna bağımlı olarak değişir. *EST3* ile antienzimde FS ise hücre siklusuna bağımlıdır. Mevcut karbon kaynağının da frameshifti etkilediği gösterilmiştir. Gliserol laktat ortamda üretilmiş maya hücrelerinden ölçülen Ty1 FS etkinliği, normal ortamda üretilenlere göre 4 kat daha azdır (Atkins ve ark. 2016). Ty3 frameshift oranı karbon kaynağı olarak glukoz tercih edildiğinde, alternatif karbon kaynaklarına göre 10 kat daha azdır (Türkel ve ark. 2011). Ty2'de ise bunun tam tersi bir durum mevcuttur (Atkins ve ark. 2016). Karbon kaynağına ek olarak aminoasit açlığı da frameshift oranını etkilemektedir. Aminoasit açlığına maruz bırakılarak büyütülen hücrelerdeki Ty3 PRF etkinliği, normal ortamda üretilenlere kıyasla 2 kat artmıştır (Türkel 2016). Bunlara ek olarak yüksek ısı ya da etanolde büyütme stres koşulları Ty3'de PRF oranını düşürmüştür. Tüm bunlara ek olarak, frameshift ilgili tRNA'ların modifikasyon durumlarındaki (modifiye nükleotid içermeleri durumu) değişimlerinde FS etkinliğinde rol oynadığı gösterilmiştir (Atkins ve ark. 2016).

Normal, bilinen translasyon mekanizmadan sapma sadece PRF ile sınırlı değildir. PRF'e ek olarak, stop-kodon okuma (readthrough), stop-kodonu yeniden tanımlama, internal ribozom girişi, sızıntılı kodon tanıma (leaky scanning) ile ilk AUG kodonunun atlanması, polisistronik mRNA üzerinde translasyonun yeniden başlatımı, non AUG başlatım, stop carry-on, programlı translasyonel by passing (Hopping ya da Jumping) olayları da genomların yeniden düzenlenerek farklı işlevler kazanmasına yardım etmektedir (Nosek ve ark. 2015, Firth ve Brierley 2012, Ingolia ve ark. 2011, Kearsse ve ark. 2016, Loughran ve ark. 2018).

Herhangi bir genomda kodlama bölgelerinde FS olup olmadığı biyoinformatik olarak da tespit edilebilmektedir. Olası frameshift ürünlerinin tespiti için, izlenmesi gereken biyoinformatik stratejiler; overlapping reading frame arayışı, slippery site arayışı, viral -1 PRF benzer yapı ve dizi motifleri arayışı, AUG ya da CUG gibi başlama kodonları varlığında +1/-1 framede stop kodon varlığının araştırılması, neural networks uygulamalarıdır (Dinman 2006, Ketteler 2012). Frameshift varlığının kanıtlanabilmesi içinse beş deneysel adım gereklidir. Bunlar; frameshift motifleri için bilgisayar veri tabanları kullanımı sonrası, out-of-frame peptidlerin deneysel olarak doğrulanması, ribozom profillemesi, Ribo-Seq çalışmaları ile hücre içeriğinin RNA profilinin belirlenmesi, cDNA screening ve reporter uygulamaları yapılarak PRF varlığının gösterilmesi, Mass Spectrometry gibi proteomik uygulamaları ile endojen out-of-frame peptidlerin tespitidir. PRF varlığının tespiti için geliştirilen biyoinformatik uygulamalar, mRNA üzerindeki saç tokası ya da pseudonokt gibi ikincil yapıların ya da birincil mRNA dizisindeki gerilmeler gibi tahminlere dayanılarak geliştirilmiştir. Bu veritabanlarına örnek olarak; RECODE, FSDB, PRFdb, FSCAN ve MLOGD verilebilir (Ketteler 2012).

#### **2.4. *S. cerevisiae* EST3 geninde PRF**

Birçok organizmanın telomeraz aktivitesi için PRF'den yaralandığı bilinmektedir. Örneğin, *E. crassus*'da telomeraz katalitik alt ünitesini oluşturan TERT genlerinde +1 PRF meydana gelmektedir. +1 PRF'in yaygın olarak kullanıldığı *Euplote*'lerde de yine

telomeraz aktivitesi ile ilgili genlerde de +1PRF'den yararlanılmaktadır (Namy ve ark. 2004).

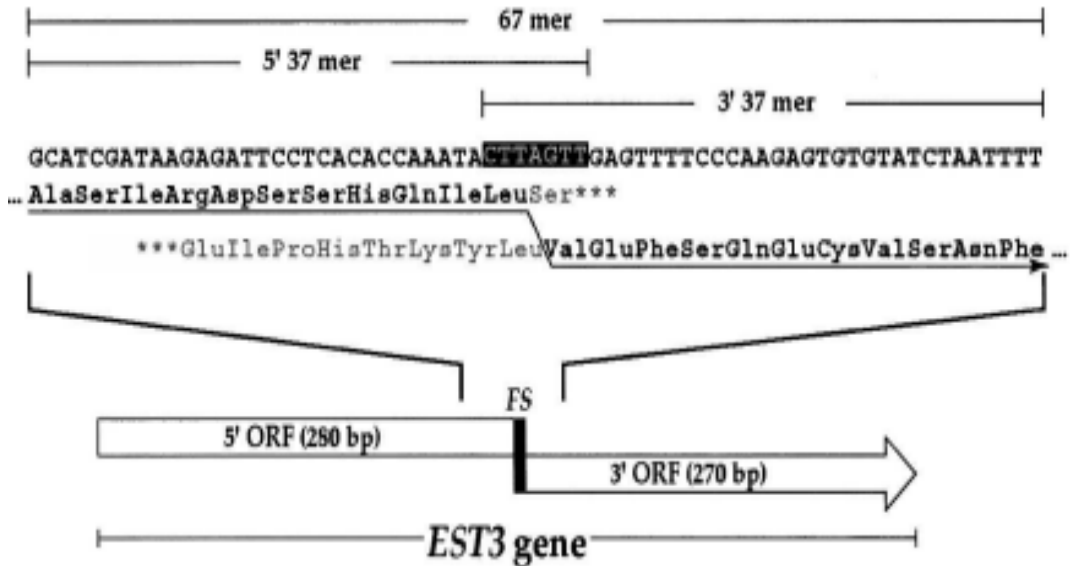
*S. cerevisiae*'da ise telomeraz alt birimleri ve telomerazın telomerlerde toplanması ile ilgili iki proteinin translasyonunda PRF'den yararlandığı gösterilmiştir. Est1, Est2 ve Cdc13 ile Stn1 proteini translasyonu sırasında -1PRF meydana geldiği Advani ve arkadaşlarınca gösterilmiştir. Burada yararlanan -1PRF, bir mRNA destabilizasyon sinyal görevi görerek prematüre sonlandırma kodonu oluşumu ile NMD (Non-sense mediated decay: internal stop kodon içeren mRNA'ların parçalanması) yolağı varlığında, ilgili genlerin mRNA miktarını düzenler. Bu bileşenlerin overexpresyonu telomeraz toplanmasına engel olup, telomerlerin kışalmasına sebep olacağından, -1PRF ile telomeraz bileşenleri doğru oranda ve miktarda sentezlenerek, telomeraz uzunluğunun korunmasında rol oynar (Advani ve ark. 2013).

*EST3* geninde PRF varlığı ilk kez Morris ve Lundblad tarafından 1997 yılında gösterilmiştir. Yapılan bu çalışma ile *EST3* geninde Ty1, Ty2 ve Ty4 maya transpozonlarına benzer bir mekanizma ile +1 PRF gerçekleştiği öne sürülmüştür. *EST3* geni mayalarda hücrel gen anlatımında PRF kullanımının kanıtlandığı ilk gen olmuştur (Morris ve Lundblad 1997). *EST3* geni evrimsel süreçte çok çabuk değişim göstermekle birlikte, *EST3* geninde frameshift varlığı >150 milyon yıldır korunmaktadır (Farabaugh ve ark. 2006).

*S. cerevisiae*'de +1 PRF'in oluşabilmesi özel tRNA izoakseptörlerinin varlığına ve miktarına ve ayrıca bazı olayların birlikte meydana gelmesine bağlı olarak gerçekleşir. Bu olaylar; ribozomun P bölgesinde frameshift site'deki bir peptidil-tRNA ve mRNA arasında çok zayıf wobble etkileşimi oluşumu, bunun akabinde sonraki kodonun yavaş tanınmasından kaynaklanan translasyonel durma ve +1 framedeki kodonun bol miktardaki aa-tRNA tarafından çabucak tanınmasıyla çerçeve değişiminin meydana gelmesidir (Farabaugh ve ark. 2006). Bu yavaş tanıma süreci (slow-decoding) A bölgesi mekanizmasından Ty1, Ty3, *ABP140* ve *EST3* genlerinde PRF oluşumu sırasında farklı şekillerde yararlanılmaktadır (Atkins ve ark. 2016).

*EST3* geninde meydana gelen PRF, Ty1 de olduğu gibi, tRNA slippage'e dayanmaktadır (1nt kayma) ve aynı mekanizmaya Ty2 ve Ty4'te sahiptir. Ancak Ty3 tRNA slippage yerine tRNA skipping (1 nt sıçrama) mekanizması işlemektedir. Buna ek olarak Ty3, Ty1'in aksine slippery site pozisyonunu uygun duruma getirmek amacıyla, 18S rRNA ile baz eşleşmesi yapan bir downstream uyarıcı diziye sahiptir (Dinman 2012).

*EST3* geni 94. Kodonunda UGA stop kodonu barındırır ve frameshift meydana gelmezse stop kodon okunarak 93 aa uzunluğunda işlevi bilinmeyen kısa bir polipeptid meydana getirilirken, CUU AGU U heptamerik dizisindeki CUU kodonunu tanıyan *tRNA<sup>leu</sup><sub>GAU</sub>*'nun 1 nükleotid kayarak, CUU yerine UUA kodonuyla eşleşmesiyle, +1PRF meydana gelir. Bu durumda, +1 PRF sonucu oluşan yeni +1 çerçevenin ilk kodonu ise GUU olur ve *tRNA<sup>val</sup><sub>CAI</sub>* tarafından tanınır. *tRNA<sup>leu</sup><sub>GAU</sub>*'nun CUU yerine UUA kodonunu tanıyarak +1 PRF meydana getirmesinin sebebi ise P bölgesindeki AGU kodonunun *tRNA<sup>ser</sup><sub>GCU</sub>*'nin düşük miktardaki varlığına bağlı olarak yavaş tanınması sonucu ribozomun yavaşlaması, kısa süreli duraklamasından kaynaklanır (Şekil 2.8) (Taliaferro ve Farabaugh 2007, Farabaugh ve ark. 2006).



Şekil 2.8. *EST3* geninde frameshift bölgesi sekansı (Talliferro ve Farabaugh 2007)

## 2.5. *S. cerevisiae*'da Stresle Uyarılmış Protein Kinazlar

Hücreler dış uyarınları algılayarak, hücre içi sinyal ağlarını etkinleştirmelerini sağlayan algılama mekanizmalarına sahiptirler. Hücreler bu algılama mekanizmaları ve sinyal iletim sistemleri sayesinde hızlı ve etkili bir cevap oluşturarak uygunsuz koşullarda da varlıklarını sürdürürler. SAPK'ler bu sinyal iletim ve cevap oluşturma sistemlerinden biri olup, gen anlatımını transkripsiyonel ve translasyonel seviyede düzenleyerek gereken cevabın oluşturulmasında esansiyel rol oynarlar (Lia De Nadal ve Posas 2009). Bu çalışmada ise çeşitli uyarıcı stres koşullarında SAPK'lardan Gcn2, Hog1 ve Snf1 yollarının *EST3* geni +1 PRF'e etkisi araştırılmıştır.

### 2.5.1. Gcn Yolağı ve İşleyişi

Hücrelerin varlıklarını sürdürebilmeleri için devamlı olarak protein sentezi yapmaları ve buna bağlı olarak da hücredeki mevcut amino asit miktarını sıkı bir şekilde kontrol etmeleri gerekir. Hücrede bu GAAC (General Control of Aminoacid Biosynthesis) yolağınca gerçekleştirilir. GAAC yolağı amino asit biyosentezi, aminoasit tRNA biyosentezi ve pürin biyosentezi enzimlerini kapsayan gen ürünlerini kontrol eder. GAAC yolağının anahtar bileşeni ise bir protein kinaz olan, hücredeki aa açlığını tespit ederek, hücrenin aa açığına karşı adaptasyonunu sağlayan Gcn2'dir (Visweswaraiah ve ark. 2011, Hoffmann ve ark. 1999).

Gcn2 yolağı yapısal ve fonksiyonel olarak tüm ökaryotlar boyunca korunmuştur (Murguía ve Serrano 2012, Anda ve ark. 2017, Duncan ve ark. 2018). Gcn2 memelilerde çok geniş ve çeşitli işlevlere sahiptir. Gcn2 yolağı memelilerde gelişim, farklılaşma, immun cevap, life span, tümör hücrelerinin varlığını sürdürmesi, memeli organlarının normal fonksiyonunu yerine getirebilmesini sağlar. Metionil tRNA sentetaz gibi proteinlerle direkt etkileşime girerek DNA tamiri ilişkili yolların tetiklenmesi, insan hastalıkları ve stres cevabının oluşturulması ile de ilişkilidir (Murguía ve Serrano 2012) Ayrıca Gcn2 inflammation süresince hücrelerin apoptoz, otofoji, eksozom karar ve manipulation mekanizması olarak iş görebilir. Bu sayede Gcn2 yolağının işleyiş mekanizmasının anlaşılması inflammatory hastalıklarda çözüm oluşturulması için

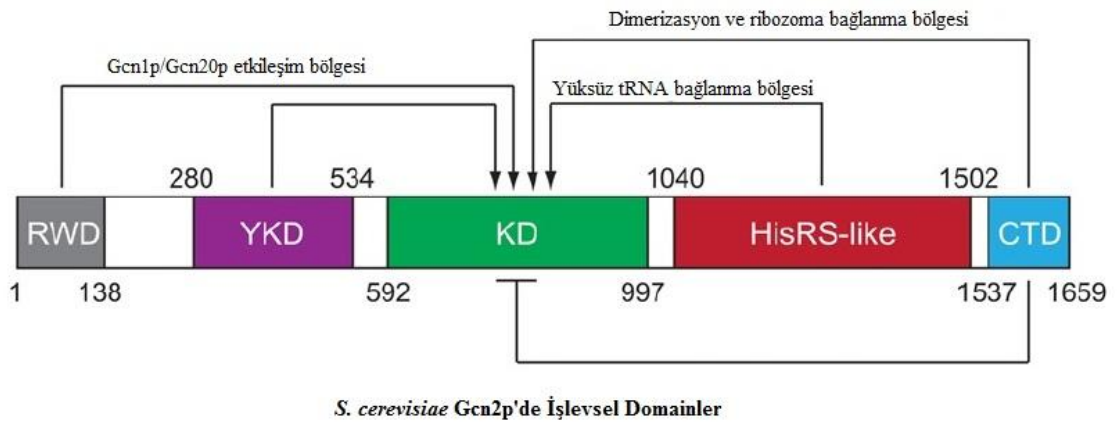
gereklidir (Xia ve ark. 2018). Gcn2 yolağı mayada ise stres cevabının yanısıra CLS, kronik yaşam süresi ile ilişkilidir (Murguía ve Serrano 2012)

Gcn2 yolağı oksidatif stres, UV irradiation, MMS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, viral enfeksiyon, serum açlığı, proteozom baskılaması, pürin açlığı, glukoz açlığı, yüksek tuzluluk, DNA alkalın ajanları, Rapamisin gibi çok çeşitli uyanlarla aktive edilebilse de en temel aktivasyon şekli yüksüz tRNA'ların Gcn2 HisRS domainine bağlanmasıdır (Anda ve ark. 2017)

Hücre içerisinde bir ya da daha fazla aa miktarı kısıtlandığında oluşan aa açlığı sonucu hücrede yüksüz tRNA birikimi olur. Yüksüz tRNA'lar direkt olarak Gcn2'ye bağlanarak, Gcn2 sinyal yolağını aktive eder (Dever ve ark. 2016). Aktive olan Gcn2 yolağının kinaz aktivitesi uyarılır ve böylece translasyon başlama faktörü eIF2,  $\alpha$  alt ünitesindeki Ser51'i fosforlar. Ser51'den fosforlanan eIF2'nin fonksiyonu azalır (Visweswaraiah ve ark. 2011). eIF2 başlatıcı tRNA ve GTP molekülü ile birlikte TC (Ternary Complex) meydana getirir ve eIF2B, başlama kodonuna rastlamasıyla hidroliz edilen GTP sonrası GDP bağlı biçimde başlama kompleksinden ayrılan eIF2'nin yeniden GTP bağlı forma dönüşümünü sağlar (Khan ve ark. 2018) ancak fosforlanan eIF2'nin  $\alpha$  alt ünitesi, eIF2B tarafından GDP-GTP değişiminin bozulmasına sebep olur, böylece başlatıcı tRNA ile birlikte Ternary Complex oluşumu ve 40S ribozomal alt üniteye bağlanması engellenir (Lageix ve ark. 2015). Sonuç olarak Gcn2'nin eIF2'yi fosforlamasıyla hücrede eIF2-GTP-Met<sup>tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup></sup> ternary complex konsantrasyonu azalır (Lageix ve ark. 2015). Böylece ternary complex konsantrasyonunun azalmasıyla, hücrede global protein sentezi baskılanarak, amino asit tüketimi azaltılır. Ancak bazı özel düzenleyici element taşıyan, sınırlı sayıda mRNA'ların translasyonunda artış meydana gelir (Valerius ve ark. 2007). Bu mRNA'lar mayada GCN4 ve memelilerde ise ATF4'tür (Duncan ve ark. 2018). GCN4 mRNA'sı 5' uç kısmında 4 adet kısa uORF bulunur ve translasyonu aa açlığı süresince yeniden düzenlenir. Normal koşullarda GCN4 mRNA'sı anlatımı sırasında bu kısa uORF'ler okunarak, GCN4 kodlama dizisine ulaşmadan ribozomlar mRNA'dan ayrılır. Stres koşulları altındaysa GCN2 aktivasyonu ve eIF2'yi fosforlamasıyla oluşan ternary complex miktarı azalışı uORF 3 ve 4'ün atlanarak GCN4 kodlama dizisinin translasyonuna imkan verir (Duncan ve ark. 2018) Gcn4p aa ve vitamin biyosentezinde görevli genlerin transkripsiyonel aktivatörü olan

bir basic leucine Zipper (bZIP) transkripsiyon faktörüdür(Lageix ve ark. 2015, Duncan ve ark. 2018).

Gcn2 proteini 190 kDa boyutunda bir protein olup, merkezi bir kinaz domain (KD), N terminal ucunda ise Gcn1 bağlama domain ve Pseudokinaz domain, C terminal ucunda ise histidin sentaz ilişkili (HisRS) domain ve ribozom bağlama (RBD) domaininden oluşmaktadır (Dever ve ark. 2016). Gcn2 monomerleri arasındaki çoklu etkileşimler bulunan bir dimerdir ve bazal durumda Gcn2 inaktiftir. Aktivasyon sinyalinin alınmasıyla konformasyonel değişim geçiren Gcn2'nin multidomainleri arasındaki etkileşim değişir. Böylece bilinen tek substratı olan eIF2 $\alpha$ 'nın fosforilasyonuna imkan doğmuş olur (Şekil 2.9) (Dever ve ark. 2016).



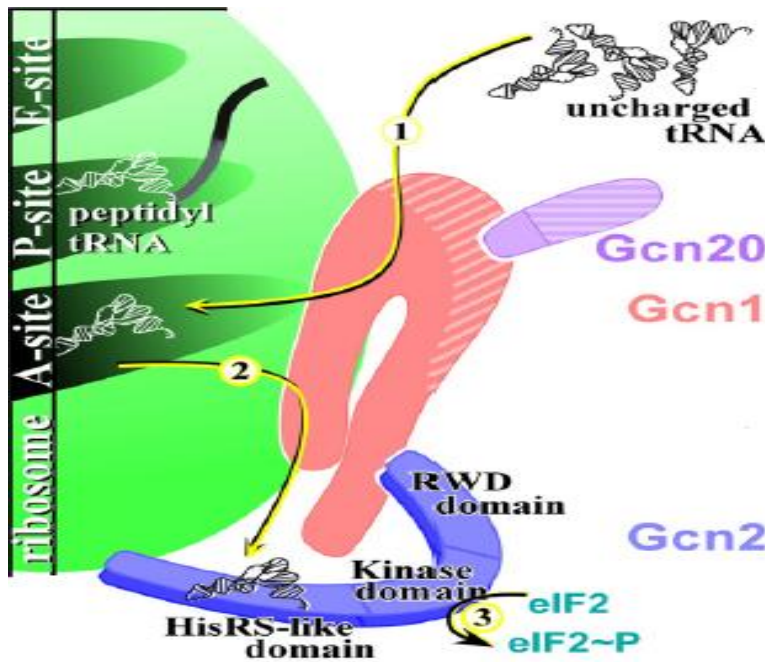
**Şekil 2.9.** Gcn2 proteini domainleri (Lageix ve ark. 2015)

Gcn4p stabilitesi, aa açlığı şartlarında nukleusta artarak 5 dakikadan 20 dakikaya kadar bir yarı ömre sahiptir ve Gcn4p anlatımıyla GAAC yolağındaki 50'den fazla genin anlatımı düzenlenir (Valerius ve ark. 2007, Hoffmann ve ark. 1999).

Gcn1 ve Gcn20 ABC type ATPase'dır ve Gcn1 ile Gcn20 birlikte Gcn1 NTP vasıyasıyla elongating ribozomlara bağlanarak, Gcn2 aktivasyonunda iş görürler (Dever ve ark. 2016). Gcn1p, Gcn2 aktivasyonu için değilse de açlık sinyalinin Gcn2'ye iletiminde görevlidir. Gcn20'nin varlığı ise Gcn2 fonksiyonu için esansiyel değildir. Gcn2 aktivasyonu için ne Gcn1'in ne de Gcn20'nin kesinlikle bulunması gerekmez

(Castilho ve ark. 2014). Gcn1, Gcn20 ve Gcn2 bir kompleks halinde translasyon yapan ribozomlara bağlanırlar ve yüksüz tRNA'ları ribozom A-site'e bağlanmasıyla, Gcn1-Gcn20 kompleksince aa açlık sinyali algılanır. Gcn1 ve Gcn20 yüksüz tRNA'ları ribozom A-sitedan Gcn2 proteini HisRS domainine geçirerek Gcn2 aktivasyonunu sağlar. Bu şekilde Gcn4p trasnlasyonu ve dolayısıyla hücrede aa korunumuna yol açan düzenleyici olaylar zinciri başlatır (Şekil 2.10) (Dever ve ark. 2016).

Translasyon uzama faktörü eEF1A Gcn2 inhibitörü olarak da görev görür. Amino asit açlığı koşullarında eEF1A, Gcn2 CTD domain aracılığıyla, Gcn2p ile direkt olarak etkileşerek Gcn2'nin eIF2 $\alpha$  kinaz fonksiyonunu inhibe eder. Böylece amino asit açlığı olamayan koşullarda GAAC yolağının negatif düzenleyicisi olarak işlev görür (Visweswaraiah ve ark. 2011). eEF3 translasyon uzama aşamasının her bir seviyesinde ribozoma geçici olarak bağlanır ve yüksüz tRNA'ların E site'dan çıkışını kolaylaştırır. eEF3 ribozoma bağlanması ise fonksiyonel bir ribozom Gcn1 kompleksi oluşumunu engelleyerek, Gcn2 fonksiyonunun gerçekleşmesine engel olur eEF3 ribozoma bağlı olmadığında ise ribozoma bağlı bir Gcn1 kompleksi oluşur ve A bölgesinden Gcn2'ye yüksüz tRNA geçişini artırarak eEF1A'nın Gcn2 CTD bölgesinden ayrılmasını sağlar. Böylece Gcn2 aktifleşir (Castilho ve ark. 2014).



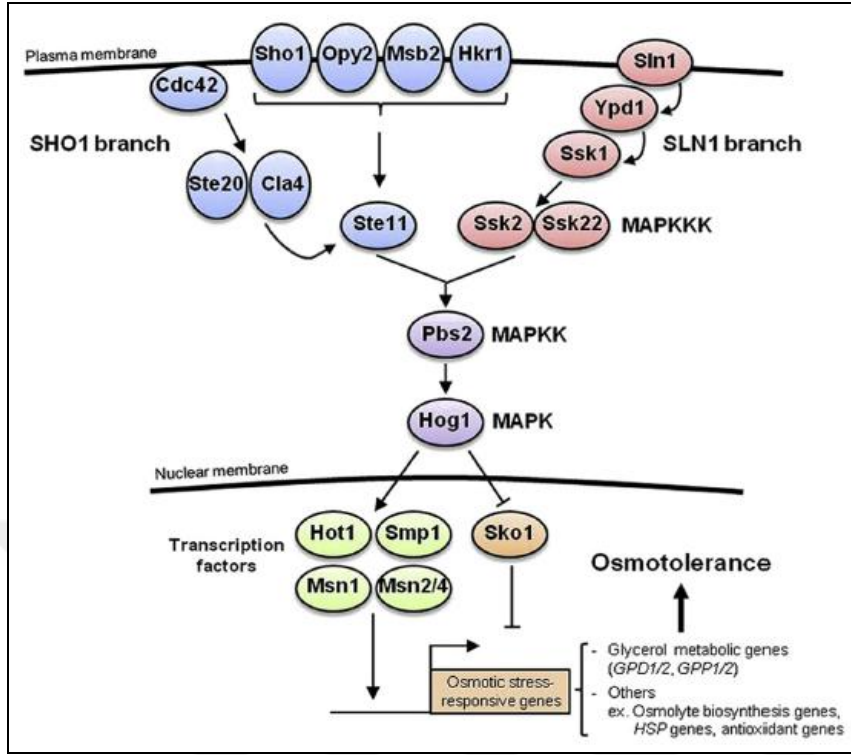
Şekil 2.10. Gcn1, 2 ve 20 kompleksinin ribozomdaki konumu (Castilho ve ark. 2014)



### 2.5.2.Hog1 Yolağı ve İşleyişı

HOG sinyal iletim yolağı, sahip olduğu osmosensörler sayesinde hücre dışındaki osmotik stres artışını algılayarak, hücre içinde uygun cevabı oluşturup, hücrenin osmotik strese adaptasyonunu sağlayan bir sinyal iletim yolağıdır. Bu yolakta son aşamada aktive edilen mitogen activated protein kinase (MAP kinase) ise Hog1p'dir. (Abu Irqeba ve ark. 2014) MAPK'lere tüm ökaryotlar sahiptir ve sayelerinde hücre dışından alınan sinyallere hücre içi cevaplar oluşturularak, hücrenin değişen koşullara adaptasyonu sağlanır. MAPK'ler MAPK, MAPKK (MAPK Kinase), MAPKKK (MAPKK Kinase) olmak üzere ard arda gelen üçlü sinyal kaskadlarından oluşurlar (Nagiec ve Dohlman 2012). HOG yolağı ökaryotlar arasında korunmuş olup, memelilerdeki homoloğu p38 stress-activated protein kinase'dır (SAPK) (Romanov ve ark. 2017).

Hücre osmotik stres ile karşılaştığında, su kaybettiği için turgor basıncı düşer ve büzülür. Osmotik strese maruz kalan hücre, kendi metabolik ürünü olan osmolitleri sitoplazmada biriktirir. Böylece hücre içi osmolorite artırılarak, turgor basıncı yeniden oluşturulur. *S. cerevisiae* hücreleri osmotik stres ile karşılaştıklarında HOG yolağı aktivitesine bağlı olarak, hücre içinde biriken osmolit ise gliseroldür (Hohmann 2015, Auesukaree 2017). HOG yolağı, Sln1 ve Sho1 dalı olmak üzere iki dal üzerinden işlemektedir (Hohman 2015). Bu iki dal birbirinden bağımsız olarak işlemektedir ve Sln1 osmotik strese karşı, daha düşük eşik değerine sahip olduğu için daha duyarlıdır (Hohman 2015, Auesukaree 2017).



**Şekil 2.11.** Hog1 sinyal yolağı ve etkileşimleri (Auesukaree 2017)

Sln1, plazma membranı üzerindedir, dört adet transmembran domainden oluşur ve sensör histidin kinaz ile kontrol edilir. Osmotik stresin var olmadığı koşullarda Sln1 histidin kinaz, otofosforlanmış durumda olduğu için aktiftir. Ypd1 aracılığıyla fosfat grubunu Ssk1'e aktarır ve fosforlanmış Ssk1 inaktif durumdadır. Osmotik stres koşullarında ise Sln1 inaktif duruma gelerek, Ypd1 ve Ssk1 defosforile edilir. Defosforile olan Ssk1, Ssk2 ve Ssk22 ile etkileşir. Ssk2 ve Ssk22 otofosforlanarak, aktifleşirler sonrada Pbs2(bir MAPKK)'yi fosforlayarak aktifleştirirler. Pbs2 de Hog1'i aktive ederek, Hog1p'nin sitoplazmadan nükleusa geçişini sağlar (Hohman 2015).

Sho1, plazma membranı üzerinde bulunan, dört adet transmembran domain ve sitosolik SH3 domainden oluşan bir scaffold proteindir (Brewster ve Gustin 2014). Sho1 dalı büyük ihtimalle Hkr1 ve Msb2 vasıtasıyla işlemektedir. Hkr1 ve Msb2 tek membran geçişli musin benzeri proteinlerdir. Bu iki sensörün uyarılmasıyla, Msb2 ve Hkr1, Sho1, protein kinazlar Ste20 ve Cla4 ile G-protein Cdc42 proteinlerinin etkileşimleri değişir. G-protein Cdc42 ile Ste2 ve Cla4 etkileşerek, Ste11 proteinini fosforlayarak

aktifleştirirler. Bu işleyiş içerisinde, Pbs2 de MAPKK işlevinin yanısıra bir scaffold protein görevi üstlenerek, Sho1 etkileşimiyle hücre yüzeyinde toplanır. Ste11 proteini, ortağı Ste50'nin Cdc42 ile etkileşimiyle, Sho1 ve Opy2 proteinlerini membrana toplar. Aktifleşen Ste11, Pbs2'yi fosforlayarak aktifleştirir ve Pbs2 de Hog1 proteinini fosforlayarak aktifleştirir (Hohman 2015).

Uyarılıp, fosforlanarak aktifleşen Hog1p nukleusa geçerek burada birikir ve osmotik strese karşı transkripsiyonel cevabın oluşturulmasını sağlar. Osmotik stres yanıt genlerinin anlatımını transkripsiyon faktörleri ve RNA Polimeraz II aracılığıyla düzenler (Auesukaree 2017, Brewster ve Gustin 2014). Hog1p aracılığıyla 300'den fazla genin anlatımı düzenlenmesine rağmen, HOG yolağının ana hedefi gliserol metabolizmasıyla ilgili olan genlerdir. Bu genlerin hedeflenmesiyle hücre içerisinde gliserol üretimi artırılır, birikimi sağlanır (Auesukaree 2017, Brewster ve Gustin 2014, Hohman 2015).

Hog1p strese bağlı olarak mRNA biyosentezini farklı şekillerde etkiler. Hog1p bazı genlerde transkripsiyonun başlangıcını düzenler, bunu özel transkripsiyon faktörlerini fosforlayarak yapar. Stres yanıt genlerinde kromatin yeniden modellenmesi ve histon modifikasyonları aktivitelerini düzenlenler (de Nadal ve Posas 2015). RNA Pol II ile fiziksel etkileşim halindedir ve RNA Pol II'nin housekeeping genlerden ziyade osmostres-cevap genlerinin promotorlarında toplanmasını sağlar ve transkripsiyon elongasyon faktörü gibi davranabilir (Brewster ve Gustin 2014, de Nadal ve Posas 2015). Hog1p ayrıca mRNA dengesinin (sentez ve mRNA stabilitesinin sağlanmasında) sağlanmasında da önemlidir. Hog1p nuklear pore kompleksi bileşenleri ile etkileşimde olması sebebiyle, genel mRNA taşınmasını zayıflatmasına rağmen stres cevap genlerinden oluşan mRNA'lar ise sitoplazmaya taşınmaktadır. Hog1p'nin bir başka transkripsiyonel rolü ise 100'den fazla lncRNA'nın anlatımını uyararak, osmotik stres koşullarında hücre döngüsünün ilerleyişini düzenlemesidir (de Nadal ve Posas 2015).

Hog1, Rck2 vasıtasıyla translasyonel düzenlemede de görevlidir. Rck2, serin/threonin MAPKAP (MAP Activated Protein Kinase)'dır ve bu gruptaki kinazlar gibi C terminal domaininde karakteristik bir glisin döngü domeini içermektedir (Kumar ve ark. 2015).

Rck2p'nin memeli homologu calmodulin kinazdır ve *S. pombe*'deki homologu ise Rck1'dir (Warringer ve ark. 2010, de Nadal ve Posas 2015). Rck2, Hog1p tarafından oksidatif ve osmotik stres koşullarında direkt olarak fosforlanır (de Nadal ve Posas 2015, Kumar ve ark. 2015). Rck2 proteini fosforulasyonu HOG yolağının aşırı aktive edildiği mutant suşlarda ve osmostres süresince geçici olarak artar (Kumar ve ark. 2015). Rck2 birçok proteinin translasyonu baskımlarken, stres adaptasyonu için gereken transkriptlerin ise başlatımına yardımcı olur (Nagiec ve Dohlman 2012). Buna ek olarak Rck2p, Hog1p'nin nukleustaki yerleşiminde de etkili olmaktadır ve protein sentezini geçici olarak baskılamasında translasyon elongasyon faktörü 2 ile etkileşimi rol oynamaktadır. Böylece osmostrese uygun olarak sentezlenen proteinlerin mRNA'dan translasyonunu da kontrol eder. Rck2 proteini osmotik stres koşullarında translasyon mekanizmasının korunması için önem taşımaktadır (Kumar ve ark. 2015). Yapılan fosforilasyon çalışmalarıyla, Hog1p'nin Rck2p'nini fosforlamasıyla farklı hücresel süreçlerde görevli çok sayıda proteinden oluşan karmaşık bir ağı etkilediği gösterilmiştir (Romanov ve ark. 2017).

Hücreler osmostres koşullarında hücre döngüsünün ilerleyişini durdurarak, ilk olarak strese karşı adaptasyon cevabını geliştirmeye çalışırlar. Hog1 hücre döngüsünü düzenleyebilmektedir, Sic1, cyclin dependent kinase inhibitör, anlatımını dengeleyerek G1 evresinden S evresine geçişi kontrol eder. Buna ek olarak, G2'den M evresine geçiş gibi diğer hücre döngüsü geçişlerini de kontrol edebilir, S fazında replikasyonu geciktirir (de Nadal ve Posas 2015).

HOG yolağı; Fus3, feromon cevap yolağı, Kss1, filamentous büyüme yolağı ve Stl2, hücre duvarı bütünlüğü (Cell Wall integrity) yolağı olmak üzere dört MAPK'den oluşan sinyal yolağının bir parçasıdır. Osmostrese cevap oluşturulan süre boyunca Hog1p uyarılmış ve işler durumdayken ortak bileşenlere sahip diğer MAPK'ler feromon cevabı ve filamentli üreme yolları baskılanmış durumdadır. Uygun koşullarda, uygun yolağın işlemesi, çapraz baskılama (cross-inhibition) ve yolak izolasyonu ile sağlanarak, ortak bileşenlere sahip yollardan uygun olmayanın cevap oluşturması engellenmiş olur (Brewster ve Gustin 2014).

### 2.5.3. Snf1 Yolağı ve İşleyişi

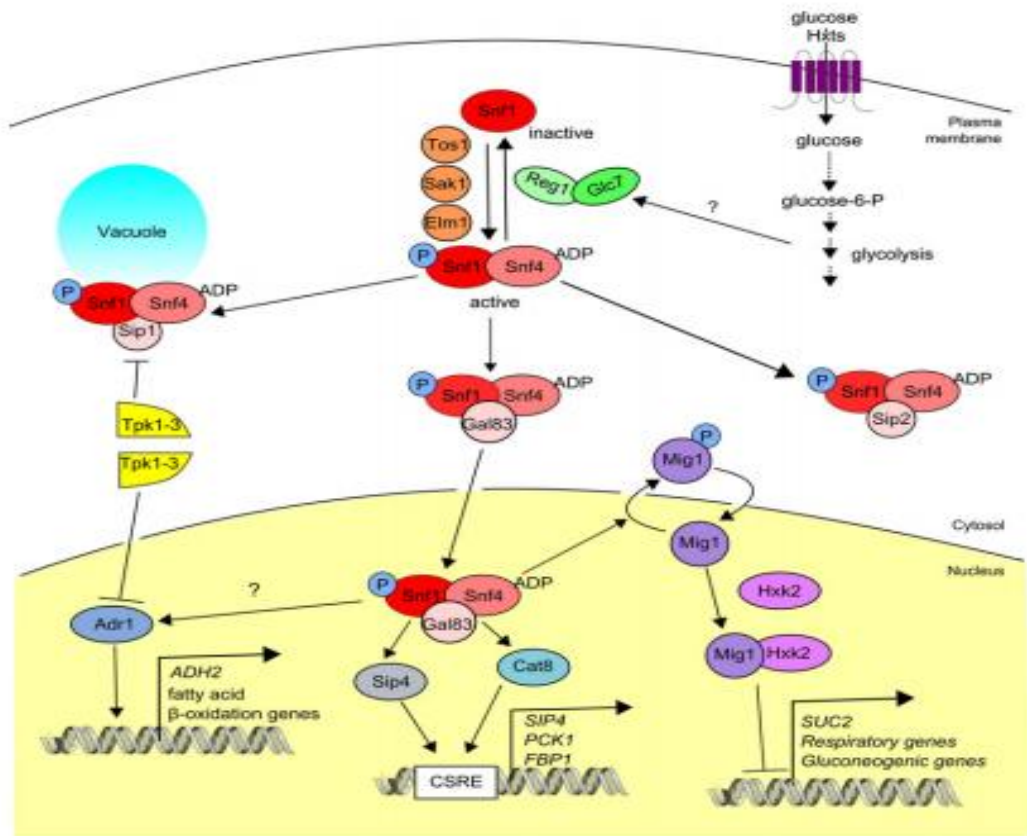
SNF1, *Saccharomyces cerevisiae*' nin sahip olduğu, glukoz yokluğunda aktifleşerek karbon stresine karşı uygun cevaplar kaskadını başlatan ve AMP-tarafından aktive edilen protein kinaz (AMPK) ailesi üyesi bir serin/theronin kinazdır (Kayikci ve Nielsen 2015). AMPK'ler enerji depolarının tükendiği koşulları algılama, enerji üretimi ve korunması ile ilgili süreçleri uyarmakta görevlidirler. Snf1 hücre içi enerji dengesini sağlamada sahip olduğu ana işlevi sebebiyle, tüm ökaryotlar arasında hem fonksiyonel hem de yapısal olarak korunmuş durumdadır. Memeli homologu AMPK olup, bitkilerdeki homologu da SnRK1(Snf-related kinase 1)'dir (Conrad ve ark. 2014).

Snf1 karbon stresinin yanı sıra, oksidatif stres, alkali pH, ısı şoku, yüksek tuzluluk ve azot açlığı gibi stres koşullarına da hücre sel yanıt oluşumu ile ilişkilidir (Shashkova ve ark. 2015, Simpson-Lavy ve Kupiec 2018). Ayrıca Snf1 yolağı hücre içerisinde gerçekleşen birçok farklı süreç ile ilişkilidir. Bu süreçler mitoz, mayoz ve spor oluşumu, filamentli büyüme, invaziv büyüme, kronolojik yaşam süresi (CLS), otofoji, biyofilm oluşumu ve yaşlanmaya kadar uzanmaktadır (Shashkova ve ark. 2015, Zhang ve Cao 2017, Tripodi ve ark. 2018).

*S. cerevisiae*'da diğer birçok hücre gibi karbon kaynağı olarak öncelikle glukozu tercih eder ve hücre dışındaki miktarına bağlı olarak hücre içi karbonhidrat metabolizmasını düzenler. Glukoz varlığında, O<sub>2</sub> varlığı fark etmeksizin, glukozu fermente ederler. Fermentasyon sonucu üretilen alkol *S. cerevisiae*'ya diğer organizmalarla rekabet için üstünlük sağlar. Glukoz tükendiğinde veya kısıtlı düzeye geldiğinde ise alternatif karbon kaynaklarını kullanır ve solunum yapmaya başlarlar. *S. cerevisiae*'da bu geçişi düzenleyen yolak, Snf1 protein kinazdır. Snf1 glukoz baskılanmasında hem aktivatör hem de represör olarak görev alabilmektedir (Simpson-Lavy ve Kupiec 2018, Kayikci ve Nielsen 2015).

Hücre dışı glukoz konsantrasyonu yüksek olduğu koşullarda Snf1 inaktif haldedir ve defosforile edilen Snf1 nükleusun dışındadır. Bu sayede glukoz-repressed genlerin baskılayıcısı, Snf1'in ana downstream hedeflerinden transkripsiyon faktörü Mig1 defosforlanmış durumda ve işlevseldir. Mig1 sayesinde alternatif karbon kaynağı

(maltoz, sukroz, galaktoz gibi) transportu ve metabolizmasında görevli genlerin anlatımı baskılanır (Şekil 2.12) (Kayikci ve Nielsen 2015, Shashkova ve ark. 2015). Glukoz kısıtlı ve tükenmiş koşullarda ise Snf1 aktifleşerek, Mig1 deaktive eder, böylece glukoz baskılaması hafifler, alternatif karbon kaynağı ilişkili genlerin transkripsiyonuna imkan doğar (Kayikci ve Nielsen 2015). Glukoz yokluğunda hücre içi enerji dengesini sağlamak amacıyla Snf1 alternatif karbon kaynakları kullanımı ve soluma geçiş ile daha fazla enerji elde edilmesini sağlar. Ayrıca, hücre içi enerji tüketimini azaltabilmek için de anabolik reaksiyonları kısıtlar. Bu amaçla Snf1 aminoasit üretimini ve yağ asidi üretimini kısıtlar, yağ asidi parçalanmasını uyararak, yüksek enerji eldesi sağlar, glukoneogenesis ve gliokzalal döngüsünü uyarır (Condrad ve ark. 2014). Snf1 bu işlevleri yerine getirebilmek için, transkripsiyonel, post-transkripsiyonel ve post-translasyonel seviyede gen anlatımını etkiler (Kayikci ve Nielsen 2015).



Şekil 2.12. Snf1 yolağının işleyişi (Condrad ve ark. 2014)

Snf1 kompleksi heterodimer yapıdaki bir protein kompleksi olup,  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  alt ünitelerinden oluşmaktadır.  $\alpha$  alt ünitesi katalitik aktiveye sahip olan Snf1'dir,  $\beta$  alt ünitesi ise Sip1, Sip2 ve Gal83'den herhangi birisince kodlanır ve  $\gamma$  alt ünitesi de uyarıcı Snf4'tür. Glukozun fazla olduğu koşullarda  $\beta$  alt ünitesi farklılığına bakılmaksızın SNF1 sitoplazmada bulunmaktadır, ancak glukozca fakir koşullarda Sip1 içeren SNF1 kompleksi vacuolar membranda, Sip2 içeren sitoplazmada ve Gal83 içeren ise nukleusta bulunmaktadır. Böylece Snf1 kinazın hücreyel yerleşim seviyesinde kontrolü sağlanır (Shevade ve ark. 2018).  $\beta$  alt ünitesinin üçünden herhangi birine sahip olduğu bu proteinler SNF kompleksinin hücre metabolizması ve transkripsiyonel düzenlemede farklı bir görev üstlenmesini sağlar. Gal83 ve Sip2 proteinleri glukoneogenik ve gliokzalat döngüsü ilgili genlerin aktivasyonunda işlev sahibiyken, Sip1 ise azot metabolizması ilgili genlerin düzenlenmesinde işlevseldir (Kayıkci ve Nielsen 2015). Snf1 aktivasyonu Sak1, Elm1 ve Tor3 adı verilen üç alternatif kinazdan birinin, katalitik  $\alpha$  alt ünitesindeki Thr210 amino asidini fosforlanmasıyla gerçekleştirilir (Şekil 2.12). Snf1 aktivasyonu için gereken bir başka adımda, N-terminal kinaz domain ve C-terminal otoinhibisyon domainine sahip Snf1'in, C-terminaline Snf4'ün bağlanarak Snf1'in otoinhibisyonunu gidermesidir. Böylece Snf1 kinazın aktif konformasyonu sağlanmış olur (Tripodi ve ark. 2018, Condrad ve ark. 2014). Memeli AMPK artan AMP/ATP oranını algılayarak hücreyel cevap oluşturmasına rağmen ve geçmişte maya Snf1 kinazda da bu şekilde olduğu kabul edilse de Snf1 kinazda bu orandan ziyade ADP etkili olmaktadır. Snf4 iki adet ADP bağlayıcı bölgeye sahip olup ATP, AMP, ADP etki dereceleri farklı olarak bağlanabilmektedir ve NADH ile daha güçlü bölge için yarışabilmektedirler. Glukozun azalması ADP seviyesinin arttığı koşullarda ise ADP daha zayıf bölgeye bağlanır. Böylelikle Snf4'te konformasyonel değişim meydana gelir ve aktif Snf1'in korunması sağlanır (Condrad ve ark. 2014, Shashkova ve ark. 2015). Snf1'in deaktivasyonu ise aktivasyonu için fosforile edilen Thr210'un, Glc7/Reg1/2 (Type 1 protein fosfotaz ve ilişkili Reg1/2 alt üniteleri), Sit4 (type 2A ilişkili fosfotaz) ve Ptc1(type 2C fosfotaz) vasıtasıyla defosforile edilmesiyle gerçekleşir (Shevade ve ark. 2018).

Snf1'in etkileştiği transkripsiyon faktörleri Mig1p'in yanı sıra Cat8 ve Adr1'dir. Snf1 tarafından, Cat8'in transkripsiyonel düzenlemesiyle, glukoneogenik genler, gliokzalat

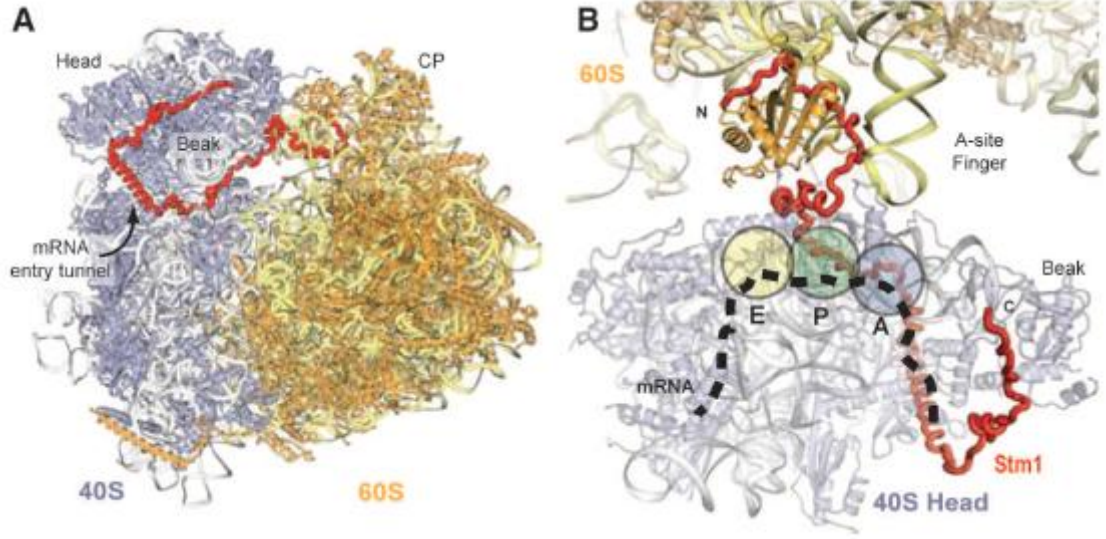
döngüsü ve alternatif karbon kaynağı kullanımı ilişkili genler anlatım yapar. Adr1 ise etanol kullanımı ve yağ asidi metabolizması ile ilgili genlerle ilişkili olduğundan Snf1'ce kromotin bağlanması kontrol edilir. Snf1 ayrıca gen anlatımının kontrolünde, kromotin yeniden düzelleme mekanizmalarından da yararlanır. Gcn5 asetil transferaz ile direkt olarak etkileşip, fosforlamayla aktivitesini tetikler ve birçok stres-responsive genin transkripsiyonel aktivasyonunu sağlar. Snf1 post transkripsiyonel seviyede gen düzenlenmesinde ise mRNA parçalanmasını düzenleyerek rol oynar. Ccr4, Dhh1, Xrn1 proteinlerini hedefleyerek, glukoz-induced mRNA'ların parçalanmasını sağlar. Snf1 post-translasyonel seviyedeki düzenlemesini ise GCN4'ün transkripsiyonunu ve hem de translasyonunu baskılayıp aminoasit biyosentezini olumsuz yönde etkileyerek gösterir (Kayikci ve Nielsen 2015).

## **2.6. Ribozomal Protein Stm1**

Stm1 proteini (Stm1p) 30kDa boyutundaki, stresle ilişkili bir *S. cerevisiae* proteini olup, hücrede bol miktarda bulunur (35.000-46.800 adet) (Hayashi ve ark. 2018, Van Dyke ve ark. 2006, Van Dyke ve ark. 2009). Stm1p'nin birçok maya türünde homoloğu bulunmaktadır (Van Dyke ve ark. 2006). Stm1p hem sitoplazmada ve hem de nükleusta bulunur. Sitoplazmada az miktarda serbest peptid olarak bulunmakla birlikte büyük çoğunluğu ribozomlara bağlı olarak bulunur. Nükleusta bulunan Stm1p ise telomerik bölgede kromozomlara bağlı olarak bulunur (Van Dyke ve ark. 2004).

Stm1p tam ribozom ile ilişkilidir. Ribozomda 40S domainin baş kısmına bağlanır ve A ve P- bölgesindeki mRNA tüneli boyunca yer alır (Şekil 2.13) (Hayashi ve ark. 2018). Stm1p 60S'den bir tane, 40S'den de sekiz tane olmak üzere dokuz adet ribozomal protein ile etkileşim içindedir. Sm1p her iki ribozom alt birimiyle etkileşime sahip olması sebebiyle, ribozom alt birimlerinin birbiri ile etkileşimini sağladığı görülmektedir (Ben-Shem ve ark. 2011, Hayashi ve ark. 2018).





**Şekil 2.13.** Stm1 proteininin ribozom üzerindeki konumu. A panelinde Stm1p'nin küçük alt birimdeki bulunuşu, B panelinde ise Stm1p'nin mRNA giriş tüneli üzerinde yerleşimi gösterilmektedir (Ben-Shem ve ark. 2011).

*S. cerevisiae* hücrelerinin besince yetersiz koşullarda olması, (uzun süreli glikoz açlığı, azot açlığı gibi) Stm1'in ribozoma bağlanmasında ya da bağlı Stm1p'de konformasyonel değişikliklere neden olur. Bu şekilde hücre için uygun koşullar oluşuncaya kadar Stm1p ribozomları koruyor olabilir (Ben-Shem ve ark. 2011).

Stm1 proteinin translasyonu düzenlemesinde eEF2 ve eEF3 translasyon uzama faktörleriyle olan etkileşimi rol oynar. Dyke ve arkadaşlarına göre, Stm1p eEF3 translasyon uzama faktörünün işlevini yerine getirebilmesinde yardımcı bir rol üstlenir. Stm1p ribozoma bağlanarak, eEF3 faktörünün ATP hidrolizi ile konformasyonel değişime uğrayıp, ribozomdan ayrılmasını sağlar. Böylece yüksüz tRNA'nın E bölgesinden salınımına ve A bölgesine eEF1A-GTP-aminoaçil tRNA bağlanmasına imkan tanımış olur. Yani Stm1p ve eEF3 arasındaki ilişki translasyon uzama aşamasının doğru şekilde devamlılığı için gereklidir (Van Dyke ve ark. 2009). Hayashi ve ark.'ca ise ribozomların üzerinde Stm1 proteinin bulunması durumunda eEF2 etkileşimlerini incelemiştirler. Bu çalışmayla, Stm1 proteinin GTP bağlı konformasyonda ribozom üzerinde eEF2 bağlanmasını sağlamlaştırdığını kanıtlamışlardır. Stm1p'nin eEF2 ribozom bağını stabilize etmesiyle eEF2'ce ilk GTP hidrolizine olanak sağlamış olur. (Hayashi ve ark. 2018)

Stm1p birçok biyolojik süreç ile ilişkili olan çok fonksiyonlu bir proteindir. Bu süreçler apoptozdan, hücre döngüsünün düzenlenmesine, telomer biyosentezinden, mRNA'da 5' Cap yapısının çıkarılmasına, besinsel stres koşullarına bağlı olarak protein translasyonunun düzenlenmesine kadar değişmektedir. Ayrıca Stm1p'nin TOR yolu aracılığı ile mayada translasyonun kontrolünde de işlevi olduğu yayımlanmıştır (Hayashi ve ark. 2018, Van Dyke ve ark. 2009, Van Dyke ve ark. 2006).

## 2.7. Ribozomal Protein Asc1

Asc1 proteini, *ASC1* geninden kodlanan bir *S. cerevisiae* proteini olup, yedi kanatlı  $\beta$ -pervane şeklinde katlanma gösteren WD40 tekrarlı protein ailesine ait bir scaffold proteindir. (Opitz ve ark. 2017, Schmitt ve ark. 2017) Asc1 proteini ökaryotlar arasında son derece korunmuşluğa sahip bir protein olup, memeli homologu RACK1 (Receptor For Activated C Kinase 1) ve *S. pombe*'deki homologu Cpc2'dir (Gallo ve Manfrini 2015).

Asc1p çok sayıda gen ve protein ile etkileşim halinde olduğundan birçok biyolojik süreç içerisinde var olmaktadır (Rachfall ve ark. 2013). Asc1p'nin içerisinde yer aldığı süreçler translasyonun düzenlenmesi, demir homeostosisinin sağlanması, feromon cevabının oluşturulması, hücre duvarı bütünlüğünün korunması, mitokondriyal biyogenezis, hücre solunum ve fermentasyonun organizasyonu ile oksidatif stres cevabının oluşturulmasını kapsamaktadır (Rachfall ve ark. 2013, Gallo ve Manfrini 2015).

Asc1p ribozom üzerinde 40S ribozom küçük altbiriminin baş kısmında, mRNA çıkış tüneline yakın olarak bulunmaktadır (Şekil 2.14) (Opitz ve ark. 2017). Ayrıca, *ASC1* lokusu üzerinde snoRNA U24'ü kodlayan intronlar bulunmaktadır. U24 snoRNA ise 28S rRNA'nın metilasyonu ile 60S ribozom altünitesinin olgunlaşmasını sağlar (Rachfall ve ark. 2013).



Asc1p aracılığıyla oluşan translasyonel tutuklama ile normal olmayan mRNA'lardan sentezlenen polipeptidlerin parçalanması gerçekteştirilebilmektedir. Asc1p varlığı, bu polipeptidlerin E3-ubiquitin ligaz Ltn1 aracılı parçalanması için gereklidir (Gallo ve Manfrini 2015). Bu mekanizmalara ek olarak, Asc1p bazı özel transkripsiyon faktörü kodlayan mRNA'ların 5' UTR'leri vasıtasıyla, translasyonlarının başlangıcını kontrol edebilir. Tec1p, Phd1p ve Ste12p miktarlarının Asc1p ile ilişkili olarak değiştiği gösterilmiştir (Rachfall ve ark. 2013).

Translasyonel düzenlemelerin yanısıra Asc1p sinyal iletim yolakları ile fiziksel etkileşim içindedir. Asc1p üzerinde meydana gelen konformasyonel değişimler ile alınan sinyaller ribozoma iletiliyor olabilir (Rachfall ve ark. 2013, Schmitt ve ark. 2017). Asc1 proteinin etkileşimde olduğu sinyal iletim yolakları arasında cAMP/PKA ve farklı MAPK yolakları bulunmaktadır (Opitz ve ark. 2017).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Araştırmada Kullanılan *S. cerevisiae* Suşları ve Plazmidler

Bu çalışmada kullanılan ve Çizelge 3.1’de listelenen *S. cerevisiae* suşlarından BY4741’den türevlenen suşlarının tamamı EUROSCARFT’tan temin edildi.  $\Sigma$ 1278b suşu ise Maria Cardenas’dan (Duke Üniversitesi, ABD) sağlandı.

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

EUROSCARF kodu	Genotip
Y 00000 (BY4741)	MATa his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0. (YST124, Standart yaba tip suş)
Y14311	MAT $\alpha$ his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0.YDR477w::kanMX4 (YST124’e izogenik, <b>snf1</b> mutanı)
Y 02724	MATa ura3 $\Delta$ 0; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; <b>YLR113w</b> ::kanMX4 ( <b>hog1</b> mutanı, YST124’e izogenik)
Y 05157	MATa ura3 $\Delta$ 0; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; <b>YLR248w</b> ::kanMX4 ( <b>rck2</b> mutanı, YST124’e izogenik)
Y 04546	MATa ura3 $\Delta$ 0; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; YGL195w::kanMX4 ( <b>gcn1</b> mutanı, YST124’e izogenik)
Y 03642	MATa ura3 $\Delta$ 0; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; <b>YDR283c</b> ::kanMX4 ( <b>gcn2</b> mutanı, YST124’e izogenik)
Y 05688	MATa ura3 $\Delta$ 0; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; <b>YFR009w</b> ::kanMX4 ( <b>gcn20</b> mutanı, YST124’e izogenik)
$\Sigma$ 1278b	MATa ura3-52
Y 06556	MATa ura3 $\Delta$ 0; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; <b>YMR116c</b> ::kanMX4 ( <b>asc1</b> mutanı, YST124’e izogenik)
Y04107	MATa his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; <b>YLR150w</b> ::kanMX4 ( <b>stm1</b> mutanı, YST124’e izogenik YST124’e izogenik)

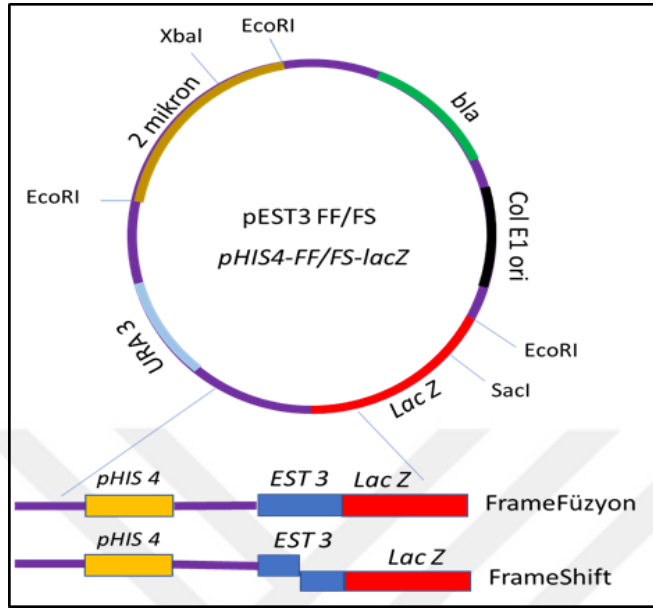
Maya suşlarının genel amaçlar için üretilmesinde tam besiyeri olarak da bilinen YPD (Yeast Extract, Peptone Dextrose) üreme ortamı kullanıldı. Maya suşlarının transformantlarının üretilmesinde ise Sc-Ura +%2 glucose (Synthetic complete, minus urasil supplemented with %2 Glucose) besiyeri kullanıldı (Rose ve ark. 1990). Maya suşlarının stokları YPD petrilerinde üretildikten sonra steril, 1 ml %20 gliserol içinde -80 C’de saklandı. Transformasyon için stok mayalardan alınan örnekler YPD petrilerine ekilerek taze kültürler elde edildi. YPD petrilerindeki maya kültürleri ve transformasyonla elde edilen transformant petrileri deneyler süresince +4C’de buz dolabında saklandı. Maya üreme ortamlarının hazırlanması ve araştırmada kullanılan çözeltilerin içeriği ve hazırlanması da tezin ekler bölümünde ayrıntılı olarak verildi.

Bu çalışmada kullanılan plazmit yapısı ise YEp plazmit üzerine temellendirilmiş, Sundararajan ve ark.’ca (1999) tarafından geliştirilen raportör plazmittir. Bu raportör plazmitte *S. cerevisiae HIS4* geni promotorunu ve ilk 4 kodonunu içeren bölge *E. coli lacZ* genine sıfır çerçevede translasyon yapılacak şekilde klonlama yapılmıştır. Bu plazmit üzerinde HIS4 kodonları ve *lacZ* arasında sıfır, +1 veya -1 çerçevede translasyonun devamı için farklı uzunluklarda ORF bölgelerinin klonlanabilmesi için uygun polilinker dizisi de bulunmaktadır. Sunulan bu çalışmada da bu şekilde oluşturulmuş iki farklı reporter plazmit kullanılmıştır (Sundararajan ve ark. 1999).

Kullandığımız *lacZ* raportör vektörlerinden birisinde [pDT261 (EST3 FF)] *lacZ* kodlama bölgesi önünde sıfır çerçevede translasyonun devam edebileceği şekilde *EST3* geni frameshift sekansı olan TTA-GTT dizisi klonlanmıştır. Bu vektörde His4-Est3-LacZ hibrit mRNA’sından translasyonun yapılması için translasyonun Est3-LacZ bölgesinde sıfır çerçevede devam etmesi gerekir. Bu nedenle çalışmalarımızda bu vektör, [pDT261 (EST3 FF)], doğru çerçeve veya kısaca “Framefusion” vektörü olarak adlandırılmıştır (Şekil 3.1) (Taliaferro ve Farabaugh 2007).

Diğer raportör vektör de [pDT265 (EST3 FS)] aynı yapıda olup bu vektörde transkribe edilen His4-Est3-LacZ hibrit mRNA’sından translasyonun yapılması için *lacZ* kesişim bölgesine klonlanan *EST3* frameshift bölgesi sekansı CTT-AGT-T olarak klonlanmıştır. Bu vektörde (pDT265) transkribe edilen His4-Est3-LacZ hibrit mRNA’sından *lacZ*

kodlanan bölgesinin de translasyonu RNA'da CUU-AGU-U'nun +1 çerçevede frameshift olması ile gerçekleşmektedir (Taliaferro ve Farabaugh 2007).



**Şekil 3.1.** Çalışmada kullanılan raportör plazmit yapısı

Vektör üzerindeki 2µm orijini maya replikasyon orijini olup vektörün mayada çoğalmasını sağlarken, ColE1 ori bakteri replikasyon orjinidir ve vektörün bakteride çoğalmasını sağlar. *bla* ise amphisiline karşı bakteriyel direnç genidir. *E. coli LacZ* geni, β-galaktozidaz kodlar ve raportör gen olarak kullanılmıştır. *URA3* geni ise vektörün transformasyonu gerçekleşen mayaların seçiminde, seçici fenotip olarak kullanılır.

### 3.2. Lityum Asetat Metodu İle Transformasyon

Bu çalışmada mevcut imkanlar ve verimliliği göze alınarak, Rose ve ark. 1990'daki geliştirmiş olduğu lityum asetat-PEG yöntemi küçük değişiklikler ile aşağıda anlatıldığı şekilde uygulanmıştır (Rose ve ark. 1990).

Transformasyonda kullanılacak maya suşları +4 C'deki YPD petrilerinden alınıp 5 ml'lik sıvı YPD ortamında 30 C'de çalkalamalı inkübatörde 140 dönüş /dakika hızda 1 gece (16-18 saat) üretilerek gecelik ön kültürler elde edildi. Ertesi sabah

transformasyonu yapılacak olan bu kültürden, başlangıç OD<sub>600</sub> değeri 0.2 olacak şekilde bu kez 20 ml'lik sıvı YPD'ye ekim yapılarak bu taze kültürlerin aynı şartlarda logaritmik aşamaya kadar (OD<sub>600</sub>=1.0-1.5) üremeleri sağlandı. Log faz kültürleri 50 ml'lik steril falkon tüplere aktarılıp 1600 rpm'de 5 dk çöktürüldü, sıvı faz atılıp çöken maya hücreleri steril 25 ml distile suda süspansedilerek tekrar aynı hızda çöktürüldü. Sıvı faz atıldı, çöken maya hücreleri bu kez steril 1 ml 0.1M LiOAc'de süspansedilerek steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve tekrar 12500 rpm'de 1 dakika çöktürüldü. Sıvı faz atıldı, çöken maya hücreleri bu kez 450 µl 0.1 ml LiOAc'de süspansedilerek stok kompetent maya hücreleri elde edildi. Bu stok kompetent maya hücrelerinden 50 µl alınarak taze mikrofüj tüplerine alındı ve tekrar aynı hızda çöktürülerek üst sıvı pipetle alındı. Mikrofüj tüplerinde kalan maya hücrelerine PEG, LiOAc, taşıyıcı DNA ve plazmit DNA'ları aşağıda verilen sırada ilave edildi. Transformasyon tüplerinde son hacim 350 µl olacak şekilde steril saf su ilave edildi. Transformasyon karışımı homojen oluncaya kadar vorteks ile karıştırıldı ve daha sonra 30 C inkubatorde 30 dakika bekletildi.

240 µl %50 PEG

36 µl 1 M LiAOc (taze hazırlanmış stoktan kullanıldı)

6 µl denatüre edilmiş Herring sperm DNA'sı

4-5 µl plazmid DNA'sı (0.1-1 µg max)

64 µl dsH<sub>2</sub>O

30 C'de inkubasyon süresi sonunda, transformantlar ısı şoku işlemi için 42 C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edildi. Isı şoku işleminin ardından 12.500 rpm'de 1 dakika santrifüj edilen tüplerden üst sıvı atılarak, çökeltiye 500 µl steril saf su eklendi ve pipet yardımıyla süspansedildi. Bu basamakta yapılan LiAOc muamelesi sonucu maya hücrelerinin, hücre duvarı ve zarı zayıflamış durumda olduğundan nazik davranmaya özen gösterildi. Steril saf su içerisinde süspansedilene haldeki maya transformantlarından, 100 µl alınarak seçici besiyeri petrilere (Sc-Ura +%2 glukoz petrilere) yayma ekim yöntemiyle ekildi ve 30 C'lik etüvde koloniler belirginleşip büyüyünceye kadar 3-4 gün inkübasyona bırakıldı. Kalan transformantlar ise kontaminasyon vb. koşullarda deneyin tekrarlanması gerekebileceğinden +4 C'de, bir hafta boyunca canlılıklarını koruyabildikleri için buzdolabında muhafaza edildiler. Seçici besiyerindeki transformant maya kolonileri belirginleştiğinde, çevresindeki



kolonilerden bağımsız olarak büyüyen kolonilerden alınarak, taze seçici besiyerlerine pasajlar halinde ekildi. Her petride 6 ya da 8 pasaj olacak şekilde hazırlanan petriler, transformantların üremesi için 2 ya da 3 gün 30 C'de inkübasyona bırakıldı. Deneyler süresince hazırlanan transformant pasajları +4 C'de muhafaza edilerek kullanıldı.

### 3.3. *S. cerevisiae* Transformantlarının Üretilmesi

Maya transformantlarının her biri 5 ml Sc-Ura+%2 glukoz sıvı besi ortamına, transformantların pasajlanması ile oluşturulan petrilerden steril kürdan ile alınarak aşılandı. Elde edilen bu sıvı kültürler 140 rpm, 30 C'deki havalandırılmalı çalkalayıcıda yaklaşık 18 saat üremeye bırakıldı. Ertesi sabah bu ön kültürler başlangıç OD<sub>600</sub> değeri 0.2 olacak şekilde taze sc-URA+%2 glukoz sıvı besiyerine aşılanarak, 140 rpm 30 C'deki çalkalayıcıda kültürler log faza gelip, OD<sub>600</sub> değeri 1.5-2.0 oluncaya kadar üretildi.

Log faza gelen *S. cerevisiae* transformant kültürleri, 1600 rpm'de 4 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Her bir örnek 1 ml suda suspanse edildi ve tekrar mikrosantrifüjde 12500 rpm'de 1 dk çöktürüldü oluşan üst sıvı atıldı. Hücre çökeltisi ise 200 µl break buffer (lizis tampon çözeltisinde) pipetaj yapılarak tekrar çözdürüldü. Ayrıca kontrol amaçlı kullanılmak üzere içerisinde sadece 200 µl lizis tampon çözeltisi olan bir mikrosantrifüj tüpü de hazırlandı. Hazırlanan bu lizis tampon çözeltisi hücre karışımları ve kontrol tüpü kısa süreli olarak -20 C'de muhafaza edilerek bir sonraki bölümde açıklanan β galaktozidaz enzim analizinde kullanıldı. Ayrıca hazırlanan bu lizis tampon çözeltisi hücre karışımı gerektiği takdirde -80 C'de uzun süreli olarak muhafaza edilebilmektedir.

*EST3*'de programlı ribozomal frameshiftte stres faktörlerinin ve bu faktörlerle ilgili sinyal yollarının etkisini incelemek için ise Çizelge 3.1'de verilen mutant *S. cerevisiae* suşları kullanıldı. Bu mutant *S. cerevisiae* suşlarında sinyal yollarının ilgili bileşenlerinden birisinin mutasyonu dolayısıyla ilgili yolda sinyal iletimi gerçekleşmemektedir (örneğin Δhog1 mutantında High Osmolarity Glycerol yolağının,

$\Delta$ gen2 mutant suşunda amino asit açlığı yolağının,  $\Delta$ snf1 mutantında düşük glikoz sinyal yolağının çalışmaması gibi). Stres faktörlerinin etkisini incelemek için logaritmik aşamadaki yaban tip ve mutant *S. cerevisiae* suşlarının transformantlarına bu tezin sonuçlar bölümünde ilgili tablolarda verilen konsantrasyonlarda NaCl, 3-amino triazole (3-AT) veya borik asit ilave edildi. Stres sinyal yolağlarını aktive eden bu maddelerin ilave edilmesinden sonra maya hücreleri 30 C'de çalkalamalı inkübatörede 140 devir/dk hızda 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda üreme ortamlarından maya hücreleri yukarıda açıklandığı şekilde çöktürülerek beta-galaktozidaz aktivitesi tayini için hazırlandı. NaCl, HOG sinyal yolağını aktive ederken, 3-AT ve borik asitin Gcn2 yolağını aktive ettiği bilinmektedir (Saito ve Posas 2012, Uluisik ve ark. 2011, Moehle ve Hinnebusch 1991).

#### **3.4. Transformantlarda $\beta$ -Galaktozidaz Aktivitelerinin Tayini**

Yukarıda açıklanan şekilde üretilen EST3-framefusion ve EST3-Frameshift vektörünün *S. cerevisiae* transformantlarında yapılan lacZ transkript seviyeleri bu gen füzyonuna bağlı olarak yapılan beta galaktozidaz enzim aktivitesi her bir transformants ve üreme koşulu için ayrı ayrı ölçülerek tayin edildi (Guarente 1983).

Hazırlanan transformant lizis çözeltisi karışımlarına ve kontrol için hazırlanan mikrosantrifüje, maya hücrelerini permeabilize etmek için 20  $\mu$ l %0.1 SDS ve 20  $\mu$ l saf kloroform eklendi. Elde edilen hücre lizatları  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesi tayini için daha önce açıklandığı şekilde kullanıldı (Guarente 1983).

Maya transformantlarının  $\beta$ - galaktozidaz enzim analizinde kullanılmasıyla elde edilen gen anlatım miktarlarını normalize edebilmek amacıyla, Lowry ve ark.'nın 1951'de verdiği metoda uygun olarak, daha önce anlatıldığı gibi hazırlanan maya lizatlarının toplam protein konsantrasyonu belirlendi. Hem  $\beta$ -galaktozidaz hem de Lowry deneylerinin yapılmasıyla elde edilen absorbans değerleri, ek 2'de verilen formül üzerinde kullanılarak, transforme edilen pDT261 ve pDT265 plazmitlerinden yapılan gen anlatım seviyeleri hesaplandı. *EST3* geninde meydana gelen frameshift oranını hesaplarken, EST3-FS gen füzyonundan yapılan anlatımın enzim aktivitesi değeri,

EST3-FF gen füzyonundan yapılan anlatımın enzim aktivitesi değerine bölündü ve yüzdesi bulundu. Enzim deneyleri bütün örnekler için üçerli olarak yapıldığından ve her deney en az bir kez tekrarlandığından verilen % FS sonuçları, ortalama dokuz farklı deneyin ortalamasıdır. Yapılan deneylerde sonuçların doğruluğu için standart sapmanın %10'nun altında olmasına dikkat edilmiştir.



## 4.BULGULAR

### 4.1. Stres Koşulları *EST3*'de PRF'nin Düzenlenmesine Etkileri

Çeşitli stres koşullarının telomer uzunluğu ve telomeraz aktivitesi üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca stres koşullarının programlı translasyonel frameshift (PRF) üzerinde etkili olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Telomeraz alt birimlerinden Est3p'ini kodlayan *EST3* geni mRNA'sında internal stop kodon bulunmaktadır. Tam uzunlukta fonksiyonel Est3p sentezi için *EST3* mRNA'sında bulunan bu internal stop kodonun translasyonun devam aşaması sırasında (elongasyon sırasında) belirli oranda gerçekleşen ve Programlı Ribozomal Frameshift (PRF) olarak adlandırılan moleküler olay ile anlamlı kodon şeklinde okunması gerekir. Bu da ribozomlar tarafından +1 yönünde 1 nükleotid ilerleyerek PRF ile gerçekleştirilir.

Daha önce tez danışmanım Prof.Dr. Sezai Türkel tarafında yapılan çalışmalarda PRF'in sürekli olarak aynı hızda (constitutif) yapılmadığı ve belirli metabolik ve stres sinyallerine göre kontrol edilebilen (arttırılan veya azaltılan) bir moleküler işleyiş olduğu gösterilmiştir (Türkel ve ark. 2011). Bu araştırmada *EST3* mRNA'sındaki PRF oranına ve PRF oluşumuna ve dolayısıyla da tam uzunlukta Est3p'nin translasyonuna stres koşullarının etkisi araştırıldı. Sunulan araştırmada deneysel yaklaşım olarak genomu bilinen yabancı tip *S. cerevisiae* suşu ve bu suş ile izogenik olan ve stres sinyal iletim yolları mutasyon ile inaktive edilmiş mutant maya suşları kullanıldı. *EST*'de PRF oranını ölçebilmek için materyal metod bölümünde açıklanan LacZ raportör vektörleri kullanıldı. Bu raportör plazmitler ilgili *S. cerevisiae* suşlarına transformasyon ile aktararak stabil transformantlar elde edildi. Hem yabancı tip ve hem de sinyal yolları kusurlu maya transformantlarımız normal, stressiz ortamda ve stres uygulanmış ortamda üretildi. Üreme aşamaları sonunda transformant maya suşlarında ekspresyon vektörlerinden yapılan transkript oranları tayin edilerek çeşitli koşulların *EST3*'de PRF'e olan etkileri incelendi.

Bu amaç doğrultusunda ilk olarak BY4741, yabancı tip *S. cerevisiae* suşu normal koşullar altında üretilerek *EST3*'de PRF oranı ölçüldü ve %13 olarak bulundu. Osmotik stresi ve dolayısıyla Hog1 yolağını uyaran NaCl stresi, yabancı tip hücrelere uygulandığında %23 ölçülen *EST3* geni PRF oranı, Gcn2 yolağını uyaran borik asit uygulandığında ise %25 olarak ölçüldü. Bu iki stres faktörünün de *EST3*'deki PRF oranını arttırdığı belirlendi. Snf1p düşük glukoz veya alternatif karbonhidratları içeren (sukroz, galaktoz, maltoz gibi) üreme ortamında aktive edilen çok fonksiyonlu bir protein kinazdır. Snf1 yolağını uyarmak amacıyla yabancı tip hücreler ilk olarak %2 glukoz içeren besi ortamında üretildikten sonra alternatif karbon kaynağı olarak gliserol/laktat içeren ortama aktarıldı. Bu şekilde elde edilen Snf1 yolağı uyarılmış yabancı tip maya hücrelerdeki PRF oranı ise %2 olarak ölçüldü. Bu sonuç normal koşullarda üretilen yabancı tip maya hücrelerinde Snf1 kinazın aktivasyonu ile PRF'de yabancı tip suşa göre ~6-kat azalma olduğunu göstermektedir. (Çizelge 4.1)

Bu sonuçlar yabancı tip *S. cerevisiae* suşunda NaCl ve Borik asit uygulaması ile aktive edilen Hog1p ve Gcn2p'nin *EST3*'de PRF in kontrol edilmesinde yer aldığını ve PRF'in kontrolünde işlevleri olabileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar aynı zamanda *EST3* sentezinin konstitütif olmadığını ve sinyal yolakları ile belirli koşullarda artış veya azalma şeklinde kontrol edilebileceğini de göstermektedir.

**Çizelge 4.1.** Yabancı tip *S. cerevisiae* suşunda stres koşullarının *EST3*'de PRF oranına etkisi

Üreme ortamı koşulları	Frameshift oranları $\pm$ SD (%)
Normal ortam	13 $\pm$ 1
0.8 M NaCl	23 $\pm$ 1
50 mM Borik asit	25 $\pm$ 0.3
%2 Gliserol/Laktat	2 $\pm$ 0.3

#### 4.2. Gcn2 Kompleksinin *EST3*'de PRF'nin Düzenlenmesine Etkileri

Gcn2p bir çeşit protein kinaz olup amino asit açlığı başta olmak üzere çeşitli stres uyarıcı ajanlarla da aktive edilmektedir. Gcn2p'nin ribozom üzerinde Gcn1p ve Gcn20p ile de etkileşimde olduğu, bu proteinler ile kompleks oluşturabildiği daha önceden gösterilmiştir. Bu proteinler ile etkileşimi de Gcn2p'nin aktivitesi için gereklidir. Yapılan araştırmanın bu bölümünde Gcn1, Gcn2, Gcn20 kompleksinin *EST3*'de PRF'e etkisinin olup olmadığı mutant suşlar kullanılarak incelendi. Gcn2 yolağının *EST3* geni PRF oranı üzerindeki etkisini araştırmak için Gcn mutantları kullanıldı. Gcn1 ve Gcn20 bir kompleks halinde bulunurlar ve Gcn2'nin aktivasyonu için Gcn1 gereklidir. Üçü birlikte bir kompleks meydana getirerek, protein sentezinin devam (elongation) aşamasında ribozomlar üzerine yerleşmiş olarak bulunurlar (Kubota ve ark. 2001). Gcn2 yolağı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UVC gibi çok farklı streslerle uyarılabilse de başlıca amino asit açlığı sonucu oluşan yüksüz tRNA varlığı ile uyarılmaktadır (Ando ve ark. 2017). Ayrıca 2011 yılında yapılan bir çalışmayla Gcn2 yolağının Borik asit muamelesi sonucu uyarılabildiği de gösterilmiştir (Ulusik ve ark. 2011).

Gcn2'nin *EST3* mRNA'sında translasyonun devamında oluşan PRF oranına etkisini incelemek amacıyla,  $\Delta$ gcn2 mutantları ilk olarak normal koşullarda üretilerek PRF oranı ölçüldü ve %5 olarak tespit edildi (Çizelge 4.2). Yabani tip *S. cerevisiae* hücreleri normal koşullar altında üretildiğinde PRF oranı %13 olarak ölçüldüğünden  $\Delta$ gcn2 mutantlarında normal koşullarda bile PRF oranında ~2 kat azalma olduğu gözlemlendi. Elde edilen bu sonuç Gcn2p'nin normal koşullarda da *EST3*'de PRF ve tam uzunlukta Est3 polipeptidinin translasyonu için gerekli olduğunu göstermektedir.

Gcn2p ekspresyonunun çeşitli streslerle aktive edildiği bilinmektedir. Bu nedenle  $\Delta$ gcn2 mutantı transformantlarında Hog yolağını aktive eden NaCl ve Gcn yolağını aktive eden borik asit stresi uygulanan koşullarda üretilerek PRF oranı ölçüldü. NaCl stresi uygulandığında PRF oranı %7 olarak, borik asit stresi uygulandığında ise %11 olarak ölçüldü. Yabani tip maya hücreleri NaCl ve Borik asit stresine maruz bırakıldıklarında ise PRF oranı %23 ve %25 olarak ölçülmüştü, yani strese maruz bırakılan  $\Delta$ gcn2 mutanlarının PRF değerleri, yaban tip mayaya göre 3-2 kat daha düşük olarak

belirlendi. Bu durum stres koşullarında PRF düzenlenmesinin gerçekleşebilmesi için fonksiyonel bir Gcn2 yolağına ihtiyaç olduğunu gösterdi. Fakat  $\Delta$ gcn2 mutant suşu transformantlarında PRF oranının stres şartlarında normal üreme koşullarına göre kısmen de olsa artış göstermesi %5'den %7 ve %11'e yükselmesi gibi *EST3*'de stres koşullarında Gcn2p'den kısmen bağımsız olarak da aktivasyon olduğunu göstermektedir (çizelge 4.2). Diğer bir değiş ile stres koşullarında *EST3*'de PRF'in aktive edilebilmesi için Gcn2p'ye ek olarak diğer faktörlerin de gerekli olduğu görülmektedir.

**Çizelge 4.2.** *S. cerevisiae* Gcn mutantlarında, *EST3* geni PRF oranına stres koşullarının etkisi

Üreme ortamı koşulları	Frameshift oranları $\pm$ SD (%)		
	$\Delta$ gcn2	$\Delta$ gcn1	$\Delta$ gcn20
Normal ortam	5 $\pm$ 1	8 $\pm$ 0.2	7 $\pm$ 0.3
0.8M NaCl	7 $\pm$ 1	10 $\pm$ 0.3	11 $\pm$ 1
50mM Borik asit	11 $\pm$ 0.3	10 $\pm$ 0.5	12 $\pm$ 0.3

Ribozom büyük alt biriminde Gcn2p, Gcn1p ve Gcn20p ile kompleks halde bulunduğundan,  $\Delta$ gcn1 ve  $\Delta$ gcn20 mutantlarında da normal koşullar ve stres koşullarında *EST3* geni PRF oranı araştırıldı.  $\Delta$ gcn1 mutantı normal koşullarda üretildiğinde PRF oranı %8 olarak ölçülürken, NaCl stresi uygulandığında %10 ve borik asit stresi uygulandığında ise yine %10 olarak ölçüldü.  $\Delta$ gcn1 mutantında normal koşullarda ölçülen bazal seviye PRF değeri (%8), yaban tip maya normal koşullarda ölçülen RFS oranına (%13) göre daha düşük olduğundan, Gcn1'in *EST3* geni PRF düzenlenmesinde etkili olduğunu göstermektedir, ancak bu bazal seviye değeri olan %8,  $\Delta$ gcn2 mutantı bazal seviye değeri olan %5'den büyüktür. Bu durumda Gcn2p'nin PRF'de Gcn1p ve Gcn20p'den bağımsız olarak kısmen aktivite gösterdiği veya Gcn2p aktivitesinin tam olarak Gcn1 ve Gc20p'ye bağlı olmadığı öne sürülebilir.

$\Delta$ gcn20 mutanı ise normal koşullarda üretildiğinde PRF oranı %7 olarak belirlendi. Bu mutant suşun transformantlarına NaCl ve borik asit stresi uygulandığında PRF oranı %11 ve %12 olarak ölçüldü.

Gcn2 yolağı aminoasit açlığı sonucu oluşan yüksüz tRNA'ların aktive etmesi ile de uyarıldığından, Gcn2'nin yüksüz tRNA uyarımı ile *EST3* geni PRF aktivasyonuna etkisini araştırmak amacıyla *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b suşuna 3-AT uygulanarak aminoasit açlığı yaratıldı (Çizelge 4.3). BY4741 suşu yerine,  $\Sigma$ 1278b suşunun kullanılmasının sebebi ise, BY4741 suşunun histidin mutanı olup, 3-AT'ce hedeflenen histidin biyosentez yolağına sahip olmamasıdır. Bu sebeple bir başka tip yaban suş olan ve  $\Delta$ his mutanı olmayan *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b suşu kullanılmıştır.

**Çizelge 4.3.** *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b suşunda *EST3* geni PRF oranına aminoasit açlığının etkisi

Üreme ortamı koşulları	Frameshift oranları $\pm$ SD (%)
Normal ortam	14 $\pm$ 1
10 mM 3-AT	21 $\pm$ 1
50 mM Borik asit	22 $\pm$ 1

$\Sigma$ 1278b suşunda normal koşullarda *EST3* geni PRF oranı %14 olarak ölçülürken, 3-AT veya borik asit uygulaması ile PRF oranının %21-22'ya yükseldiği belirlenmiştir. Bu sonuç *EST3*'de PRF'in amino asit açlığına yanıt olarak aktive edilen Gcn2p sinyal yolağına bağlı olarak aktive edildiğini birkez daha göstermiştir. (Çizelge 4.3).

#### 4.3. Ozmotik Stresin *EST3*'de PRF'nin Düzenlenmesine Etkileri

Ozmotik stres ve buna bağlı olarak aktive edilen Hog1p kinazın da ozmotik stres koşullarında global olarak translasyonel kontrolde yer aldığı açıklanmıştır (Teige ve ark. 2001). Bu nedenle ozmotik stres koşullarında Hog1p'nin *EST3*'de PRF kontrolünde etkisi olup olmadığı araştırıldı. Ozmotik stres oluşturup HOG yolağını aktive etmek için maya



transformantlarının üreme ortamına logaritmik aşamada son konsantrasyonu 0.8M olacak şekilde NaCl uygulandı. Yaban tip maya suşunda ozmotik stres uygulaması ile *EST3* PRF oranının %13'den %23'e çıktığı belirlenmiştir (Çizelge 4.1).  $\Delta$ hog1 mutantlarına NaCl uygulanması ile ise *EST3* PRF oranında herhangi bir artış görülmedi (Çizelge 4.4). Borik asit uygulamasıyla ise PRF oranının yabanıl tip maya suşunda olduğu gibi %21'e kadar artışı borik asit ile aktivasyonda HOG sinyal yolağının yer almadığını göstermektedir.

**Çizelge 4.4.** *S. cerevisiae* Hog1 ve Rck2 mutantlarında, *EST3* geni PRF oranına stres koşullarının etkisi

Üreme ortamı koşulları	Frameshift oranları $\pm$ SD (%)	
	$\Delta$ hog1	$\Delta$ rck2
Normal ortam	11 $\pm$ 0.5	11 $\pm$ 0.3
0.8 M NaCl	14 $\pm$ 2	22 $\pm$ 1
50 mM Borik asit	21 $\pm$ 1	29 $\pm$ 1

Osmotik stres sonucu uyarılmasıyla Hog1 protein kinaz birçok hedefi fosforlayarak osmotik strese karşı hücrenin cevap oluşturmasını sağlar. Rck2p'de Hog1p'in direkt olarak fosforlayarak translasyonel cevabın düzenlenmesini sağladığı bir protein kinaz hedefidir. (Teige ve ark. 2001) HOG yolağının translasyonel cevabı düzenlenmesinde aracı olduğu için  $\Delta$ rck2 mutanlarında da stres koşullarının *EST3* geni PRF oranına etkisi araştırıldı.

$\Delta$ rck2 mutantları normal koşullarda üretildiğinde PRF oranı %11 olarak ölçüldü. Bu sonuç normal koşullarda üretilen yabanıl tip maya suşunda tayin edilen *EST*'ün PRF oranından (%13) çok farklı değildir.  $\Delta$ rck2 mutantlarının osmotik stres koşullarında üretimesi ile de *EST3* PRF oranında yabanıl tipte görülen seviye artış olduğu tayin edildi ve PRF oranının %11'den %22'e yükseldiği bulundu. Bu sonuçlar osmotik stresin *EST*'de PRF'e olan etkisinin Rck2p aracılığı ile yapılmadığını göstermektedir. Benzer şekilde, borik asit uygulaması ile  $\Delta$ rck2 mutantında *EST3* PRF oranının yabanıl

tipte olduğu gibi artış göstermiş olması da Rck2p'nin borik asite bağlı aktivasyonda yer almadığını göstermektedir.

#### 4.4. Snf1 Kinazın *EST3*'de PRF'nin Düzenlenmesine Etkileri

Snf1p çok fonksiyonlu bir protein kinazdır. Snf1p'nin insandaki homologu da AMPK'dir. Snf1p aktivitesi de üreme ortamı koşullarına bağlı olarak kontrol edilir. Snf1p düşük glukoz ortamında aktif iken yüksek glukoz içeren ortamda inaktiftir (Ludin ve ark. 1998). Snf1p'nin Ty2 ve Ty3 maya retrotranspozonlarında +1 yönlü meydana gelen PRF'e glukoz açlığının etkisi yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Türkel ve ark. 2009, Türkel ve ark. 2011) Mayada karbon kaynağı kısıtlaması sonucu glukoz açlığı oluşarak Snf1 yolağını uyarmakta ve bu stres koşulunun üzerinden gelmek için hücrel cevap oluşturmaktadır. (Kayikci ve Nielsen 2015).

*EST*'de PRF oranı  $\Delta$ snf1 mutantlarında incelendiğinde normal koşullar altında %7 olarak ölçülmüştür ve yaban tip maya bazal seviye olan %13'den düşüktür bu da Snf1'in bazal seviye *EST3* geni PRF oranı için varlığının zorunlu olduğunu gösterir.  $\Delta$ snf1 mutantları karbon kaynağı olarak %2 Gliserol/Laktat içeren besi ortamında üretilerek, karbon açlığı oluşturulduğunda PRF seviyesinde değişiklik olmadığı ve %5 olarak bazal seviyede kaldığı belirlendi. (Çizelge 4.5.) Yabanıl tip maya suşunda ise glukoz kısıtlı koşullarda *EST3* PRF oranının bazal seviye olan %13'den %2'ye düştüğü (~6 kat azalış) görülmüştür (Çizelge 4.1). Bu durumda Snf1p'nin glukoz kısıtlamasına yanıt olarak *EST3*'de PRF'in kontrolü ve PRF oranının azaltılmasında önemli bir işlevi olduğu görülmektedir.  $\Delta$ snf1 mutanı *S. cerevisiae* suşunda *EST3* PRF oranına NaCl ve borik asit stresi de uygulanarak bu stres koşullarında Snf1'in işlevi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar bu stres koşullarında  $\Delta$ snf1 mutantında *EST3* PRF oranında yaklaşık 2 kat veya daha fazla artış olduğunu (%7'den %16-19'a) göstermektedir. Bu sonuca göre de Snf1p'nin ozmotik stres koşullarında veya borik asit stresi koşullarında *EST3*'de PRF oranının kontrol edilmesinde fazla gerekli olmadığını göstermektedir (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.5.** *S. cerevisiae*  $\Delta$ snf1 mutantında, *EST3* geni PRF oranına stres koşullarının etkisi

Üreme ortamı koşulları	Frameshift oranları $\pm$ SD (%)
Normal ortam	7 $\pm$ 0.5
%2 Gliserol/Laktat	5 $\pm$ 1
0.8 M NaCl	16 $\pm$ 1
50 mM Borik asit	19 $\pm$ 1

#### 4.5. Asc1p ve Stm1p Ribozomal Proteinlerinin *EST3*'de PRF'e Etkileri

Bu çalışma kapsamında ayrıca daha önce Ty3'de PRF'in glukoz bağımlı kontrolünde etkili oldukları gösterilen ribozom ilişkili protein Stm1p ve Asc1p'in de *EST3* geni PRF oranı düzenlenmesine etkisi araştırılmıştır. (Türkel ve ark 2011). Stm1p stres ilişkili bir protein olup, ribozom 40S alt biriminde mRNA tüneli boyunca yer alan bir *S. cerevisiae* proteindir. (Ben-Shem ve ark. 2011)

$\Delta$ stm1 mutantları normal ortamda üretildiğinde *EST3* PRF oranı %10 olarak ölçülmüş olup, yaban tip hücrelerde ölçülen bazal seviye %13 değerinden düşüktür ki bu da Stm1 proteinin *EST3*'de PRF oranı düzenlenmesinde kısmen de olsa etkili olduğunu gösterir.  $\Delta$ stm1 mutantlarına NaCl muamelesi sonucu PRF oranı %8 olarak ölçülmüş olup, bazal seviye değerinden düşüktür. Bu durum Hog1'in Stm1 proteini aracılığıyla translasyonu etkileyerek *EST3* geni PRF oranını düzenlediğini gösterir.  $\Delta$ stm1 mutantlarına borik asit muamelesi sonucu ölçülen *EST3* geni PRF oranı ise %16 olup, bazal seviye olan %10 değerine göre artış, aktivasyon vardır. Yani Gcn2 yolağı *EST3* geni PRF oranı düzenlemesine olan etkisini Stm1 proteinini hedeflemeksizin gerçekleştirmektedir (Çizelge 4.6).

**Çizelge 4.6.** *S. cerevisiae*  $\Delta$ stm1 mutantında, *EST3* geni PRF oranına stres koşullarının etkisi

Üreme ortamı koşulları	Frameshift oranları $\pm$ SD (%)
Normal ortam	10 $\pm$ 0.7
0.8 M NaCl	8 $\pm$ 0.5
50 mM Borik asit	16 $\pm$ 0.5

Asc1p de ribozom üzerinde 40S ribozom küçük alt biriminde mRNA çıkış tüneline yakın olarak bulunan bir proteindir. (Opitz ve ark. 2017)  $\Delta$ asc1 mutantında normal koşullarda *EST3* PRF oranı %3 olarak ölçülmüş olup yaban tip hücrede ölçülen %13 değerine göre ~4 kat daha düşüktür. Bu da Asc1p'in varlığının *EST3* PRF oranının düzenlenmesi için zorunlu olduğunu gösterir.  $\Delta$ asc1 mutantına NaCl stresi uygulandığında ise *EST3* geni PRF oranı %4 olarak ölçülmüş olup, bazal seviye olan %3'e yakındır. Bu da HOG yolağının *EST3*'de PRF oranı düzenlenmesini Asc1 proteini hedefleyerek gerçekleştirmektedir.  $\Delta$ asc1 mutantına borik asit uygulandığında ise *EST3* PRF oranı yine %4 olarak ölçülmüş olup, %3 olan bazal seviye değerine yakındır, yani borik asit stresi  $\Delta$ asc1 mutantında *EST3* PRF oranını aktive etmemiştir. Bu da Gcn2 yolağının da Asc1 proteinini hedefleyerek *EST3*'de PRF oranını düzenlendiğini göstermektedir (Çizelge 4.7).

**Çizelge 4.7.** *S. cerevisiae*  $\Delta$ asc1 mutantında, *EST3* geni PRF oranına stres koşullarının etkisi

Üreme ortamı koşulları	Frameshift oranları $\pm$ SD (%)
Normal ortam	3 $\pm$ 0.15
0.8 M NaCl	4 $\pm$ 0.3
50 mM Borik asit	4 $\pm$ 0.2

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Genomlarda çeşitli amaçları yerine getirmek veya çeşitli durumlarla başa çıkabilmek için (5'cap ya da poly A tail yokluğunda translasyonu gerçekleştirilebilmek için gibi) organizmalar geleneksel olmayan translasyon olayları ile protein sentezleyebilirler (Firth ve Brierley 2012). Programlı Ribozomal Frameshift de bu geleneksel olmayan olaylardan biri olup, organizmalara sınırlı genom kapasitelerini daha iyi kullanma, aynı mRNA üzerinden sentezlenen proteinler arasında olması gereken kritik kimyasal oranı sağlama ya da post-transkripsiyonel düzenleme gibi imkanlar verir (Dinman 2012).

Maya telomerazı alt birimlerinden olan Est3 proteinin anlatımı sırasında da +1 PRF olayından yararlanılarak, 181 aa uzunluğunda bir polipeptid üretilerek işlevsel EST3 proteini meydana getirilir. Eğer EST3 mRNA'sından PRF gerçekleşmezse 93 aa uzunluğunda işlevi henüz bilinmeyen bir kısa polipeptid oluşturulur (Morris ve Lundblad 1997). Telomerazın çalışabilir durumda olup, telomerde toplanarak telomerleri uzatabilmesi için işlevsel bir Est3p varlığı kesinlikle gereklidir (Hughes ve ark. 2000). Hücrede telomer uzunluğu ~500 adet gen tarafından kontrol edilip, telomer uzunluğunun korunması için tüm bileşenlere sahip ve çalışabilir durumdaki telomerazın yanı sıra hücrenin bazı stres koşullarına maruz kalmaması da önem taşımaktadır (Harari ve ark. 2017). Örneğin, asetik asit, etanol ve metanol gibi alkollere maruz kalan hücrede telomerler uzarken, kafeine maruz kalan hücrede ise telomerler kısalmaktadır (Harari ve ark. 2013). Stres faktörlerinin yanı sıra hücresel açlığın da telomer uzunluğunda etkili olduğu bilinmektedir (Ungar ve ark. 2011)

Hücreler strese maruz kaldıklarında, bu dış uyarana karşı çabuk ve adaptif bir cevap oluşturarak hayatta kalmaya çalışırlar. Hücreler çeşitli stres uyaranlarına karşı birçok sinyal yolağına sahiptir, MAPK olarak adlandırılan bu sinyal ağlarından birisi de SAPK' lerdir (Lia De Nadal ve Posas 2009). Daha önce yapılan çalışmalarda, SAPK' lerin PRF düzenlenmesinde etkili oldukları gösterilmiştir (Türkel ve ark. 2011, Türkel 2016). Bunun yanında PRF olayının gerçekleşmesi hücrenin içinde bulunduğu büyüme koşullarına ve büyüme fazına bağlı olarak değişebilmektedir (Stahl ve ark. 2004, Türkel

2009). Bu çalışmada, *EST3* geninden kodlanan *EST3* mRNA'sında +1 PRF olayına Gcn kompleksi, HOG ve Snf1 SAPK yollarının etkisi ve Stm1p ile Asc1 proteinlerinin PRF olayının gerçekleşmesindeki etkisi araştırılmıştır.

Gcn2 yolağının *EST3*'de PRF'e etkisini araştırmak amacıyla  $\Delta$ gcn2 mutanı ve Gcn2 yolağını aktive eden 3-AT ve Borik asit kullanılarak deneyler yapıldı. Yaban tip hücrede borik asit muamelesi ile PRF oranının ~2 kat azalması, Gcn2 yolağının PRF düzenlenmesinde esansiyel bir yolak olduğunu gösterdi. Ayrıca His mutanı olmayan  $\Sigma$ 1278b suşu 3-AT muamelesi ile yaratılan aa açlığı Gcn2 yolağını aktive ederek PRF bazal seviye %14'den %21'e yükselmesi de bu savı güçlendirdi. Daha önce amino asit açlığı koşullarında Ty3 +1 PRF'in Gcn2 protein kompleksi ile kontrol edildiği gösterilmişti (Türkel 2016).

Burada Gcn2, *EST3* PRF olayını regule ederken, eEF1 kompleksini ve EF3 ile eEF2 translasyon elongation faktörlerini hedefliyor olabilir. Çünkü eEF1A, eEF1B $\alpha$  ile kompleks oluşturur ve eEF1A tarafından aa-tRNA'lar ribozom A site'ye taşınırken, eEF1B $\alpha$  tarafından ise GTP hidrolizi sonrası eEF1A'nın tekrar GTP yüklenmesi sağlanır (Dinman ve Kinzy 1997, Dever ve ark. 2016). eEF1A near ve non-cognate codon yerine cognate kodon kullanımını ayırmasının yapılmasında ve yanlış okunmanın önlenerek translasyonel doğruluğun sağlanmasında etkilidir. Ayrıca eEF1A, eEF3, E-siteden deacylated-tRNA'ların salınımını kolaylaştıran elongasyon faktörü, arasındaki bozulan uyum near ve non-cognate codon aa-tRNA'ların seçimine sebep olmaktadır (Plant ve ark. 2007). eEF1A'yı kodlayan TEF1 ve TEF2 genleriyle yapılan mutant çalışmaları TEF2-2 ve TEF2-3 allellerinin ikisinin birlikte +1 PRF artışında etkili olduğunu göstermiştir (Harger ve ark. 2002). Ayrıca eEF1A'da meydana gelen mutasyonların Ty3 +1 PRF ve Ty1 +1 PRF üzerinde etkisi olduğu gösterilmiş ve TEF2-2'nin Ty1 +1 PRF uyardığı ve TEF2'nin Ty3 +1 PRF'i uyardığı gösterilmiştir (Farabaugh ve Vimaladithan 1998, Dinman ve Kinzy 1997). Bunlara ek olarak, eEF2 fonksiyonunun Ty1 +1 PRF ve dolayısıyla Ty1'in retrotransposition aktivitesini önemli seviyede etkilediği gösterilmiştir (Harger ve ark. 2001).

eEF1A Gcn2 yolağını karmaşık bir şekilde düzenleyerek, aa varlığında GAAC yolağının negatif düzenleyicisi görevi görmektedir. eEF1A Gcn2 ile direkt etkileşimde olup, aa varlığında Gcn2 aktivitesini inhibe eder ancak aa kıtlığı baş gösterdiğinde Gcn2 ve eEF1A etkileşimi bozularak, Gcn2'nin aktif halde ve translasyonel düzenleme gerçekleştirir durumdadır (Visweswaraiah ve ark. 2011)

Gcn2, Gcn1 ve Gcn20 ile kompleks oluşturarak translasyon yapan ribozomlara bağlı olarak bulunur (Kubota ve ark. 2001). Ancak Gcn2 kinaz aktivitesi için Gcn1'in varlığı gerekli değildir ve Gcn20 ise Gcn2 fonksiyonu için esansiyeldir (Visweswaraiah ve ark. 2011).  $\Delta$ gcn1 ve  $\Delta$ gcn20 normal koşullarda EST3'de PRF oranı ölçüldüğünde %8 ve %7 olarak bulundu (Çizelge 4.2.), yaban tip hücreye göre düşük olan bu değerler, EST3 +1 PRF düzenlenmesi için Gcn1 ve Gcn20 proteinleri varlığının gerekli olduğunu gösterdi. Ancak her iki mutantında bazal seviye değerinin EST3'de +1 PRF düzenlenmesinde Gcn2 mutantından büyük olması Gcn2 aktivitesinin tam olarak Gcn1 ve Gcn20'ye bağlı olmadığını ya da Gcn2 yolağının Gcn1 ve Gcn20'den bağımsız olarak kısmen aktivite gösterdiğine işaret edebilir.

Hog1p osmotik strese karşı hücrel cevap oluşturarak gen anlatımını transkripsiyonel ve translasyonel seviyede etkiler (de Nadal ve Posas 2015). Hog1p'nin translasyonel cevap oluşturarak, protein sentezinin geçici olarak baskılanması, sağlanması için Rck2 protein kinazı fosforlayarak aktif hale getirmesi gerekir (Teige ve ark. 2001). Bu çalışmada  $\Delta$ hog1 ile  $\Delta$ rck2 mutantları kullanılarak ve NaCl ile HOG yolağı aktive edilerek EST3 geni +1 PRF'e olan etkisi incelenmiştir. Yaban tip suşta NaCl ile HOG yolağının uyarılmasıyla PRF oranı ~2 kat (%13'den %23'e) artış gözlenmesi Hog1 yolağının EST3'de +1 PRF düzenlenmesinde etkili olduğu gösterir. Ancak  $\Delta$ hog1 mutantlarına borik asit uygulandığında bazal seviyenin ~2 katı kadar aktivasyon göstermesi, Hog yolağının borik asit ile uyarılan Gcn2 yolağından bağımsız olarak PRF'i aktive ettiğini gösterir.  $\Delta$ rck2 mutantlarında ise yaban tip normal koşullarda üretilen mayalardan ölçülen (%13) PRF oranından çok da farklı olmayan bazal seviye değeri (%11) ise EST3 +1 PRF düzenlenmesi için gerekli olmadığını gösterdi. Yine  $\Delta$ hog1 mutantlarıyla benzer olarak Gcn2 yolağını uyarıcı borik asit muamelesinin PRF oranında 2 kattan fazla artışa sebep olmasını Gcn2 yolağının, EST3'de +1 PRF

düzenlenmesinde Rck2 protein kinazı ile etkileşimde olmadığını gösterir. Ancak  $\Delta$ rck2 mutantında Hog1 yolağını aktive eden, NaCl uygulaması sonucu bazal seviyenin 2 katı PRF ölçülmesi Hog1 yolağının Rck2 protein kinazdan bağımsız olarak PRF’i etkilediğini gösterir. (Çizelge 4.4.)

Daha önce glukoz sinyalindeki bozuklukların Ty2’de PRF oranında azalışa sebep olduğu ve Snf1 yolağının Stm1 proteinini hedefleyerek, glukoz kaynağına bağlı olarak Ty3 +1 PRF etkinliğini kontrol ettiği gösterilmiştir. (Türkel ve ark. 2009, Türkel ve ark. 2011) Bu çalışmada da yaban tip hücreler normal ortam yerine karbon kaynağınca fakir Gly/Lact besi ortamında üretildiklerinde 5 kattan fazla düşüş belirlendi ve  $\Delta$ snf1 mutantları bazal seviye oranının yaban tip bazal seviye oranından düşük olması Snf1 yolağının EST3’de +1 PRF düzenlenmesi için gerekli olduğunu gösterir. Snf1 mutantlarına Gcn2 yolağını uyaran borik asit uygulandığında PRF oranının ~3 kat artışı ve Hog yolağı aktivasyonunu sağlayan NaCl muamelesi sonucu PRF oranının 2 kattan fazla artışı, Snf1 yolağının Hog ve Gcn yolaklarından bağımsız olarak EST3 PRF oranını düzenlediğini gösterir. Buna ek olarak, HOG ve SNF yolakları da Gcn yolağı gibi EST’de +1 PRF düzenlenmesinde transkripsiyon elongasyon faktörlerini hedefliyor olabilir.

Daha önce Snf1 ve Gcn2 yolakları arasında cross-talk olduğu ve Snf1 protein kinazın Histidin açlığı durumunda Gcn2 kinaz aktivitesini uyararak, genel protein sentezinin azalmasına ve gen anlatımının yeniden programlanmasına katkı sağladığı gösterilmiştir (Cherkasova ve ark. 2010). Bunun yanında, Snf1 ve Hog1 yolakları arasındaki cross-talk daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. ER (Endoplazmik Retikulum) stres cevabında Snf1’in Hog1 aracılı stres cevabı oluşumunu negatif yönde düzenlediği ve oksidatif stres koşullarındaysa iki yolak arasındaki iş birliğinin DOG2 (2 deoxyglucose-6-phosphate phosphatase kodlayan gen) geni anlatımını transkripsiyonel seviyede düzenlediği gösterilmiştir (Mizuno ve ark. 2015, Tsujimoto ve ark. 2000). Yapılan bu çalışmada ise Snf1 yolağının Hog1 ve Gcn2 yolaklarından bağımsız olarak, NaCl ve Borik asit stresi koşullarında EST3 +1 PRF oranını düzenlediği gösterilmesine rağmen bu yolaklar arasında farklı stres koşullarında farklı downstream hedeflerinin varlığında pozitif veya negatif yönde etkileşim olabilir ve farklı koşullar için EST3 +1



PRF düzenlenmesinde birlikte hareket edebilirler. Örneğin Snf1 yolağı sadece glukoz açlığı koşullarında değil aynı zamanda yüksek tuzluluk, alkali pH ve amino asit açlığı koşullarında da uyarılabilir (McCartney ve Schmidt 2001, Casamayor ve ark. 2012, Cherkasova ve ark. 2010).

Stm1 ve Asc1 proteinlerinin Snf1 ve PKA yolağınca hedeflenerek Ty3 +1 PRF üzerinde etkili olduğu daha önce gösterilmiştir. Stm1 ribozom 40S domaine bağlı ve mRNA tüneli boyunca P site'e kadar uzanarak mRNA ile tRNA' ların P ve A site'e bağlanmasında rol oynayarak, stres koşullarında translasyonu baskılayabilen bir proteindir (Ben-Shem ve ark. 2011) Stm1p *EST3* +1 PRF düzenlenmesinde kısmende olsa etkilidir ve *EST3* +1 PRF düzenlenmesinde Hog1 yolağı Stm1 proteini aracılığıyla translasyona etki ederken, daha önce Stm1p ve Gcn2 arasında etkileşim var olduğu raporlanmasına rağmen (Krogan ve ark. 2006), *EST3* +1 PRF düzenlenmesinde Stm1p Gcn2 yolağının hedefi değildir. Ayrıca bu çalışma kapsamında araştırılmasa da daha önce Stm1p ve Snf1 arasında etkileşim olduğu gösterilmiştir ve bu etkileşim *EST3* +1 PRF düzenlenmesinde de rol oynuyor olabilir (Ptacek ve ark. 2005).

Asc1 proteini ribozom 40S alt biriminin baş kısmında bulunan, scaffold bir protein olup aktif translasyon sırasında Stm1p ile birlikte konumlanır (Opitz ve ark. 2017). Asc1p vasıtasıyla geniş bir fosforilasyon ağı yönetilmekte olup, bu ağın hedefindeki proteinler mRNA translasyonu, protein transportu ve turnover, hücre duvarı bütünlüğü, karbon kaynağı kullanımı, transkripsiyonel düzenleme ve hücre siklusu düzenlenmesine kadar uzanan geniş bir yelpazede etkili olmaktadır. Ayrıca Asc1 proteininin Hog1 yolağı upstreaminde bulunan MAPK ile fiziksel etkileşime sahip olduğu gösterilmiştir (Schmitt ve ark. 2017). Bunlara ek olarak Asc1p'nin sinyal yolaklarının hedefindeki bir protein olup, sinyal iletim yolaklarının Asc1 ile olan fiziksel etkileşimiyle direkt olarak ribozomu kontrol ettiği düşünülmektedir (Breitkreutz ve ark. 2010, Zeller ve ark. 2007). Ayrıca Asc1p'ini Gcn4p transkripsiyonel aktivasyonunu negatif yönde etkileyerek, Gcn2 yolağının arkasında veya yanında işlev görüyor olabilir (Hoffmann ve ark. 1999) Bunun yanında Asc1p'nin translasyonel başlama faktörlerini etkilediği (eIF2 ve eIF4A) ve Gcn2p ile arasında geçici bir etkileşim olabileceği rapor edilmiştir (Valerius ve ark. 2007). Yapılan bu çalışmada ise *EST3*'de +1 PRF'e Asc1p etkisi incelendiğinde, Asc1p

varlığının EST3'de +1 PRF olayı için zorunlu olduğu ve hem Gcn2 hem de Hog1 yollarının Asc1p'ini ile birlikte ya da Asc1 proteinini hedefleyerek PRF'i etkilediği bulunmuştur.

Gerçekleştirilen bu çalışma ile PRF düzenlemesi ile ilgili var olan bilgi birikimine katkı sağlanarak, incelenen SAPK'ler insan dahil diğer memelilerde de korunmuş olduğundan, diğer canlılardaki PRF düzenleme mekanizmalarının aydınlatılmasında da etkili olabilir.

Est3 proteini varlığı telomeraz aktivitesi dolayısıyla telomer uzunluğunun korunması için zorunlu olduğundan, fonksiyonel Est3p oluşması için zorunlu olan +1 PRF'i etkileyen stres koşulları ve yolların çalışması ile kanser ve yaşlanma çalışmaları ve bu çalışmalara çözüm sağlayacak biyomedikal ürünlerin geliştirilmesinde etkili olacak veriler elde edilmiştir.

Bundan sonrasında ise bu çalışmada incelenen SAPK yollarının PRF olayını gerçekleştiren translasyon makinesi üzerindeki aktive veya deaktive edilen olası hedefleri aydınlatılarak net bir mekanizma ortaya konulabilir.

## KAYNAKLAR

- Abu Irqeba, A., Li, Y., Panahi, M., Zhu, M., Wang, Y. 2014.** Regulating global sumoylation by a MAP kinase Hog1 and its potential role in osmo-tolerance in yeast. *PloS One*, 9(2), e87306.
- Advani, V. M., Belew, A. T., Dinman, J. D. 2013.** Yeast telomere maintenance is globally controlled by programmed ribosomal frameshifting and the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Translation (Austin, Tex.)*, 1: e24418.
- Advani, V. M., Dinman, J. D. 2016.** Reprogramming the genetic code: The emerging role of ribosomal frameshifting in regulating cellular gene expression. *BioEssays*, 38: 21–26.
- Anda, S., Zach, R., Grallert, B. 2017.** Activation of Gcn2 in response to different stresses, *PloS One*. 12(8), e0182143.
- Anonim, 2018a.** URL1: <https://www.yeastgenome.org/locus/S000004223> (01.06.2018, 9:00)
- Anonim, 2018b.** URL2: <https://www.yeastgenome.org/locus/S000004310> (01.06.2018, 9:00)
- Anonim, 2018c.** URL3: <https://www.yeastgenome.org/locus/S000006432> (01.06.2018, 9:00)
- Atkins, J. F., Loughran, G., Bhatt, P. R., Firth, A. E., Baranov, P. V. 2016.** Ribosomal frameshifting and transcriptional slippage: From genetic steganography and cryptography to adventitious use. *Nucleic Acids Res.*, 44: gkw530.
- Auesukaree, C. 2017.** Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. *J. Biosci. Bioeng.*, 124: 133–142.
- Bacolla, A., Wang, G., Vasquez, K. M. 2015.** New perspectives on DNA and RNA triplexes as effectors of biological activity. *PLOS Genetics*, 11(12): e1005696.
- Bayegan, A. H., Garcia-Martin, J. A., Clote, P. 2016.** New tools to analyze overlapping coding regions. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 530.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., Yusupov, M. 2011.** The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*, 334(6062): 1524–1529.
- Biswas, P., Jiang, X., Pacchia, A. L., Dougherty, J. P., & Peltz, S. W. 2004.** The human immunodeficiency virus type 1 ribosomal frameshifting site is an invariant sequence determinant and an important target for antiviral therapy. *Journal of Virology*, 78(4): 2082–2087.
- Botstein, D., Fink, G. R. 2011.** Yeast: An experimental organism for 21st century biology. *Genetics*, 189(3): 695–704.
- Breitkreutz, A., Choi, H., Sharom, J. R., Boucher, L., Neduva, V., Larsen, B., Tyers, M. 2010.** A global protein kinase and phosphatase interaction network in yeast. *Science*, 328(5981): 1043–1046.
- Brewster, J. L., Gustin, M. C. 2014.** Hog1: 20 years of discovery and impact. *Science Signaling*, 7(343): re7-re7.
- Casamayor, A., Serrano, R., Platara, M., Casado, C., Ruiz, A., Ariño, J. 2012.** The role of the Snf1 kinase in the adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to alkaline pH stress. *The Biochemical Journal*, 444(1): 39–49.
- Castilho, B. A., Shanmugam, R., Silva, R. C., Ramesh, R., Himme, B. M., Sattlegger, E. 2014.** Keeping the eIF2 alpha kinase Gcn2 in check. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Cell Research*, 1843(9):1948–1968.
- Celik, A., He, F., Jacobson, A. 2017.** NMD monitors translational fidelity 24/7. *Current Genetics*, 63(6): 1007–1010.

- Chen, H., Xue, J., Churikov, D., Hass, E. P., Shi, S., Lemon, L. D., ... Lei, M. 2018.** Structural insights into yeast telomerase recruitment to telomeres. *Cell*, 172(1–2):331–343.e13.
- Cherkasova, V., Qiu, H., Hinnebusch, A. G. 2010.** Snf1 promotes phosphorylation of the subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 by activating Gcn2 and inhibiting phosphatases Glc7 and Sit4. *Molecular and Cellular Biology*, 30(12): 2862–2873.
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H. N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Teixeira, M., Thevelein, J. M. 2014.** Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(2): 54–299.
- de Nadal, E., Posas, F. 2015.** Osmostress-induced gene expression - a model to understand how stress-activated protein kinases (SAPKs) regulate transcription. *FEBS Journal*, 282(17): 3275–3285.
- Dever, T. E., Kinzy, T. G., Pavitt, G. D. 2016.** Mechanism and regulation of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 203(1): 65–107.
- Dinman, J. D. 2006.** Programmed ribosomal frameshifting goes beyond viruses: Organisms from all three kingdoms use frameshifting to regulate gene expression, perhaps signaling a paradigm shift. *Microbe (Washington, D.C.)*, 1(11): 521–527.
- Dinman, J. D. 2012.** Control of gene expression by translational recoding. In *Advances in protein chemistry and structural biology*, 86: 129–149.
- Dinman, J. D., Kinzy, T. G. 1997.** Translational misreading: mutations in translation elongation factor 1alpha differentially affect programmed ribosomal frameshifting and drug sensitivity. *RNA (New York, N.Y.)*, 3(8): 870–881.
- Duch, A., de Nadal, E., Posas, F. 2012.** The p38 and Hog1 SAPKs control cell cycle progression in response to environmental stresses. *FEBS Letters*, 586(18): 2925–2931.
- 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(1): 33–48.
- Duncan, C. D. S., Rodríguez-López, M., Ruis, P., Bähler, J., Mata, J. 2018.** General amino acid control in fission yeast is regulated by a nonconserved transcription factor, with functions analogous to Gcn4/Atf4. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 115(8): E1829–E1838.
- Farabaugh, P. J., Kramer, E., Vallabhaneni, H., Raman, A. 2006.** Evolution of +1 programmed frameshifting signals and frameshift-regulating tRNAs in the order Saccharomycetales. *Journal of Molecular Evolution*, 63(4): 545–561.
- Farabaugh, P. J., Vimaladithan, A. 1998.** Effect of frameshift-inducing mutants of elongation factor 1alpha on programmed +1 frameshifting in yeast. *RNA (New York, N.Y.)*, 4(1): 38–46.
- Feldmann, H. 2012.** *Yeast, Molecular and Cell Biology*. Wiley-VCH Verlag & Co. Weinheim, Germany.
- Firth, A. E., Brierley, I. 2012.** Non-canonical translation in RNA viruses. *Journal of General Virology*, 93(Pt\_7): 1385–1409.
- Gallo, S., Manfrini, N. 2015.** Working hard at the nexus between cell signaling and the ribosomal machinery: An insight into the roles of RACK1 in translational regulation. *Translation*, 3(2): e1120382.
- Guarente, L. 1983.** Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods in Enzymology*, 101: 181–191.
- Harari, Y., Kupiec, M. 2014.** Genome-wide studies of telomere biology in budding yeast. *Microbial Cell (Graz, Austria)*, 1(3): 70–80.

- Harari, Y., Romano, G.-H., Ungar, L., Kupiec, M. 2013.** Nature vs nurture: Interplay between the genetic control of telomere length and environmental factors. *Cell Cycle*, 12(22): 3465–3470.
- Harari, Y., Zadok-Laviel, S., Kupiec, M. 2017.** Long telomeres do not affect cellular fitness in yeast. *MBio*, 8(4): e01314-17.
- Harger, J. W., Meskauskas, A., Dinman, J. D. 2002.** An "integrated model" of programmed ribosomal frameshifting. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(9): 448–454.
- Harger, J. W., Meskauskas, A., Nielsen, J., Justice, M. C., Dinman, J. D. 2001.** Ty1 retrotransposition and programmed +1 ribosomal frameshifting require the integrity of the protein synthetic translocation step. *Virology*, 286(1): 216–224.
- Hayashi, H., Nagai, R., Abe, T., Wada, M., Ito, K., Takeuchi-Tomita, N. 2018.** Tight interaction of eEF2 in the presence of Stm1 on ribosome. *The Journal of Biochemistry*, 163(3): 177–185.
- Hoffmann, B., Mösch, H. U., Sattlegger, E., Barthelmess, I. B., Hinnebusch, A., Braus, G. H. 1999.** The WD protein Cpc2p is required for repression of Gcn4 protein activity in yeast in the absence of amino-acid starvation. *Molecular Microbiology*, 31(3): 807–822.
- Hohmann, S. 2015.** An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Current Genetics*, 61(3): 373–382.
- Hughes, T. R., Evans, S. K., Weilbaecher, R. G., Lundblad, V. 2000.** The Est3 protein is a subunit of yeast telomerase. *Current Biology: CB*, 10(13): 809–812.
- Ingolia, N. T., Lareau, L. F., Weissman, J. S. 2011.** Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell*, 147(4): 789–802.
- Ivanov, I. P., Gesteland, R. F., Atkins, J. F. 2006.** Evolutionary specialization of recoding: frameshifting in the expression of *S. cerevisiae* antizyme mRNA is via an atypical antizyme shift site but is still +1. *RNA (New York, N.Y.)*, 12(3): 332–337.
- Kayikci, Ö., Nielsen, J. 2015.** Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 15(6): fov068.
- Kearse, M. G., Green, K. M., Krans, A., Rodriguez, C. M., Linsalata, A. E., Goldstrohm, A. C., Todd, P. K. 2016.** CGG repeat-associated non-AUG translation utilizes a cap-dependent scanning mechanism of initiation to produce toxic proteins. *Molecular Cell*, 62(2): 314–322.
- Kepinska, M., Szyller, J., Milnerowicz, H. 2015.** The influence of oxidative stress induced by iron on telomere length. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(3): 931–935.
- Ketteler, R. 2012.** On programmed ribosomal frameshifting: the alternative proteomes. *Frontiers in Genetics*, 3: 242.
- Khan, M. F., Spurgeon, S., von der Haar, T. 2018.** Origins of robustness in translational control via eukaryotic translation initiation factor (eIF) 2. *Journal of Theoretical Biology*, 445: 92–102.
- Krogan, N. J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Greenblatt, J. F. 2006.** Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 440(7084): 637–643.
- Kubota, H., Ota, K., Sakaki, Y., Ito, T. 2001.** Budding yeast GCN1 binds the GI domain to activate the eIF2 $\alpha$  kinase GCN2. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(20): 17591–17596.

- Kumar, V., Hart, A. J., Wimalasena, T. T., Tucker, G. A., Greetham, D. 2015.** Expression of RCK2 MAPKAP (MAPK-activated protein kinase) rescues yeast cells sensitivity to osmotic stress. *Microbial Cell Factories*, 14(1): 85.
- Kupiec, M. 2014.** Biology of telomeres: lessons from budding yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(2): 144–171.
- Lageix, S., Zhang, J., Rothenburg, S., Hinnebusch, A. G. 2015.** Interaction between the tRNA-binding and C-terminal domains of yeast Gcn2 regulates kinase activity in vivo. *PLoS Genetics*, 11(2): e1004991.
- Lia De Nadal, E., Posas, F. 2009.** EMBO member's review multilayered control of gene expression by stress-activated protein kinases. *The EMBO Journal*, 29: 4–13.
- Limoncelli, K. A., Merrikh, C. N., Moore, M. J. 2017.** ASC1 and RPS3 : New actors in 18S nonfunctional rRNA decay. *RNA*, 23(12): 1946–1960.
- Loughran, G., Jungreis, I., Tzani, I., Power, M., Dmitriev, R. I., Ivanov, I. P., ... Atkins, J. F. 2018.** Stop codon readthrough generates a C-terminally extended variant of the human vitamin D receptor with reduced calcitriol response. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(12): 4434–4444.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265–275.
- Ludin, K., Jiang, R., Carlson, M. 1998.** Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 95: 6245–6250.
- Lue, N. F., Yu, E. Y., Lei, M. 2013.** A popular engagement at the ends. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(1): 10–12.
- Lundblad, V., Szostak, J. W. 1989.** A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell*, 57(4): 633–643.
- McCartney, R. R., Schmidt, M. C. 2001.** Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(39): 36460–36466.
- Meydan, S., Klepacki, D., Karthikeyan, S., Margus, T., Thomas, P., Jones, J. E., Mankin, A. S. 2017.** Programmed ribosomal frameshifting generates a copper transporter and a copper chaperone from the same gene. *Molecular Cell*, 65(2): 207–219.
- Mizuno, T., Masuda, Y., Irie, K. 2015.** The *Saccharomyces cerevisiae* AMPK, Snf1, negatively regulates the Hog1 MAPK pathway in ER stress response. *PLoS Genetics*, 11(9): e1005491.
- Moehle, C. M., Hinnebusch, A. G. 1991.** Association of RAPI binding sites with stringent control of ribosomal protein gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 11(5): 2723–2735.
- Morris, D. K., Lundblad, V. 1997.** Programmed translational frameshifting in a gene required for yeast telomere replication. *Current Biology: CB*, 7(12): 969–976.
- Murguía, J. R., Serrano, R. 2012.** New functions of protein kinase Gcn2 in yeast and mammals. *IUBMB Life*, 64(12): 971–974.
- Nagiec, M. J., Dohlman, H. G. 2012.** Checkpoints in a yeast differentiation pathway coordinate signaling during hyperosmotic stress. *PLoS Genetics*, 8(1): e1002437.
- Namy, O., Rousset, J.-P., Naphine, S., Brierley, I. 2004.** Reprogrammed genetic decoding in cellular gene expression. *Molecular Cell*, 13(2): 157–168.

**Napthine, S., Ling, R., Finch, L. K., Jones, J. D., Bell, S., Brierley, I., Firth, A. E. 2017.** Protein-directed ribosomal frameshifting temporally regulates gene expression. *Nature Communications*, 8, 15582.

**Nosek, J., Tomaska, L., Burger, G., Lang, B. F. 2015.** Programmed translational bypassing elements in mitochondria: structure, mobility, and evolutionary origin. *Trends in Genetics*, 31(4): 187–194.

**Opitz, N., Schmitt, K., Hofer-Pretz, V., Neumann, B., Krebber, H., Braus, G. H., Valerius, O. 2017.** Capturing the Asc1p/ receptor for activated C kinase 1 (RACK1) microenvironment at the head region of the 40S ribosome with quantitative BioID in yeast. *Molecular & Cellular Proteomics*, 16(12): 2199–2218.

**Pfeiffer, V., Lingner, J. 2013.** Replication of telomeres and the regulation of telomerase. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(5): a010405–a010405.

**Plant, E. P., Nguyen, P., Russ, J. R., Pittman, Y. R., Nguyen, T., Quesinberry, J. T., Dinman, J. D. 2007.** Differentiating between Near- and Non-Cognate Codons in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, 2(6): e517.

**Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Snyder, M. 2005.** Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature*, 438(7068): 679–684.

**Rachfall, N., Schmitt, K., Bandau, S., Smolinski, N., Ehrenreich, A., Valerius, O., Braus, G. H. 2013.** RACK1/Asc1p, a ribosomal node in cellular signaling. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(1): 87–105.

**Romano, G. H., Harari, Y., Yehuda, T., Podhorzer, A., Rubinstein, L., Shamir, R., Kupiec, M. 2013.** Environmental stresses disrupt telomere length homeostasis. *PLoS Genetics*, 9(9): e1003721.

**Romanov, N., Hollenstein, D. M., Janschitz, M., Ammerer, G., Anrather, D., Reiter, W. 2017.** Identifying protein kinase-specific effectors of the osmostress response in yeast. *Science Signaling*, 10(469): eaag2435.

**Rose, M. D., Winston, F. M., & Heiter, P. 1990.** Methods in yeast genetics: A laboratory course manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. USA

**Saito, H., Posas, F. 2012.** Response to hyperosmotic stress. *Genetics*, 192: 289–318.

**Schmitt, K., Smolinski, N., Neumann, P., Schmaul, S., Hofer-Pretz, V., Braus, G. H., Valerius, O. 2017.** Asc1p/RACK1 connects ribosomes to eukaryotic phosphosignaling. *Molecular and Cellular Biology*, 37(3): e00279-16.

**Shashkova, S., Welkenhuysen, N., Hohmann, S. 2015.** Molecular communication: crosstalk between the Snf1 and other signaling pathways. *FEMS Yeast Research*, 15(4): fov026.

**Shevade, A., Strogolova, V., Orlova, M., Yeo, C. T., Kuchin, S. 2018.** Mitochondrial voltage-dependent anion channel protein Por1 positively regulates the nuclear localization of *Saccharomyces cerevisiae* AMP-activated protein kinase. *MSphere*, 3(1).

**Simpson-Lavy, K., Kupiec, M. 2018.** A reversible liquid drop aggregation controls glucose response in yeast. *Current Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0805-0>

**Stahl, G., Salem, S. N. Ben, Chen, L., Zhao, B., Farabaugh, P. J. 2004.** Translational accuracy during exponential, postdiauxic, and stationary growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 3(2): 331–338.

**Sundararajan, A., Michaud, W. A., Qian, Q., Stahl, G., Farabaugh, P. J. 1999.** Near-cognate peptidyl-tRNAs promote +1 programmed translational frameshifting in yeast. *Molecular Cell*, 4(6): 1005–1015.

- Taliaferro, D., Farabaugh, P. J. 2007.** An mRNA sequence derived from the yeast EST3 gene stimulates programmed +1 translational frameshifting. *RNA (New York, N.Y.)*, 13(4): 606–613.
- Teige, M., Scheikl, E., Reiser, V., Ruis, H., Ammerer, G. 2001.** Rck2, a member of the calmodulin-protein kinase family, links protein synthesis to high osmolarity MAP kinase signaling in budding yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 98(10): 5625–5630.
- Tinoco, I., Kim, H.-K., Yan, S., Yan, S. 2013.** Frameshifting dynamics. *Biopolymers*, 99(12): 1147–1166.
- Tripodi, F., Fraschini, R., Zocchi, M., Reghellin, V., Coccetti, P. 2018.** Snf1/AMPK is involved in the mitotic spindle alignment in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 8(1): 5853.
- Tsai, T.-W., Yang, H., Yin, H., Xu, S., Wang, Y. 2017.** High-Efficiency “–1” and “–2” ribosomal frameshiftings revealed by force spectroscopy. *ACS Chemical Biology*, 12(6): 1629–1635.
- Tsujimoto, Y., Izawa, S., Inoue, Y. (2000).** Cooperative regulation of DOG2, encoding 2-deoxyglucose-6-phosphate phosphatase, by Snf1 kinase and the high-osmolarity glycerol-mitogen-activated protein kinase cascade in stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 182(18): 5121–5126.
- Türkel, S. 2016.** Amino acid starvation enhances programmed ribosomal frameshift in metavirus Ty3 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Advances in Biology*, 2016: 1–6.
- Türkel, S., Bayram, O., Arik, E. 2009.** Glucose signaling pathway and growth conditions regulate gene expression in retrotransposon Ty2. *Zeitschrift Für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 64(7–8): 526–532.
- Türkel, S., Kaplan, G., Farabaugh, P. J. 2011.** Glucose signalling pathway controls the programmed ribosomal frameshift efficiency in retroviral-like element Ty3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 28(11): 799–808.
- Ulusik, I., Kaya, A., Fomenko, D. E., Karakaya, H. C., Carlson, B. A., Gladyshev, V. N., Koc, A. 2011.** Boron stress activates the general amino acid control mechanism and inhibits protein synthesis. *PLoS ONE*, 6(11): e27772.
- Ungar, L., Harari, Y., Toren, A., Kupiec, M. 2011.** Tor complex 1 controls telomere length by affecting the level of Ku. *Current Biology: CB*, 21(24): 2115–2120.
- Valerius, O., Kleinschmidt, M., Rachfall, N., Schulze, F., López Marín, S., Hoppert, M., Braus, G. H. 2007.** The *Saccharomyces* homolog of mammalian RACK1, Cpc2/Asc1p, is required for FLO11-dependent adhesive growth and dimorphism. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 6(11): 1968–1979.
- Van Dyke, M. W., Nelson, L. D., Weilbaecher, R. G., Mehta, D. V. 2004.** Stm1p, a G 4 quadruplex and purine motif triplex nucleic acid-binding protein, interacts with ribosomes and subtelomeric Y' DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(23): 24323–24333.
- Van Dyke, N., Baby, J., Van Dyke, M. W. 2006.** Stm1p, a Ribosome-associated Protein, is Important for Protein Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* under Nutritional Stress Conditions. *Journal of Molecular Biology*, 358(4): 1023–1031.
- Van Dyke, N., Pickering, B. F., Van Dyke, M. W. 2009.** Stm1p alters the ribosome association of eukaryotic elongation factor 3 and affects translation elongation. *Nucleic Acids Research*, 37(18): 6116–6125.
- Visweswaraiyah, J., Lageix, S., Castilho, B. A., Izotova, L., Kinzy, T. G., Hinnebusch, A. G., Sattlegger, E. 2011.** Evidence that eukaryotic translation



elongation factor 1A (eEF1A) binds the Gcn2 protein C terminus and inhibits Gcn2 activity. *Journal of Biological Chemistry*, 286(42): 36568–36579.

**Wang, R., Xiong, J., Wang, W., Miao, W., Liang, A. 2016.** High frequency of +1 programmed ribosomal frameshifting in *Euplotes octocarinatus*. *Scientific Reports*, 6: 21139.

**Warringer, J., Hult, M., Regot, S., Posas, F., Sunnerhagen, P. 2010.** The HOG pathway dictates the short-term translational response after hyperosmotic shock. *Molecular Biology of the Cell*, 21(17): 3080–3092.

**Wellinger, R. J., Zakian, V. A. 2012.** Everything you ever wanted to know about *Saccharomyces cerevisiae* telomeres: Beginning to end. *Genetics*, 191(4): 1073–1105.

**Wolf, A. S., Grayhack, E. J. 2015.** Asc1, homolog of human RACK1, prevents frameshifting in yeast by ribosomes stalled at CGA codon repeats. *RNA*, 21(5): 935–945.

**Xia, X., Lei, L., Qin, W., Wang, L., Zhang, G., Hu, J. 2018.** GCN2 controls the cellular checkpoint: potential target for regulating inflammation. *Cell Death Discovery*, 4(1): 20.

**Zeller, C. E., Parnell, S. C., Dohlman, H. G. 2007.** The RACK1 ortholog Asc1 functions as a G-protein  $\beta$  subunit coupled to glucose responsiveness in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 282(34): 25168–25176.

**Zhang, N., Cao, L. 2017.** Starvation signals in yeast are integrated to coordinate metabolic reprogramming and stress response to ensure longevity. *Current Genetics*, 63(5): 839–843.

**Zhao, R. Y. 2017.** Yeast for virus research. *Microbial Cell (Graz, Austria)*, 4(10): 311–330.

## **EKLER**

**Ek 1: Deneylerde kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanması**

**Ek 2:  $\beta$ - Galaktozidaz aktivitesinin hesaplanması**

**Ek 3: Araştırmada kullanılan stres ajanlarının hazırlanması**



## EKLER

### **EK 1: Deneylerde kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanması**

#### **1) YPD (Yeast Ekstrakt, Pepton, Dekstroz)**

YPD besiyeri zengin besiyeri olup *S. cerevisiae* için üreme ortamı olarak kullanılır. YP besiyeri içeriği 10 gram Yeast Ekstrakt ile 20 gram Peptondan oluşup, toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlanarak, 121 C'de 25 dk otoklavda steril edilerek hazırlandı. YPD petrilerini hazırlamak için ise hazırlanan YP sıvı besiyerine 20 g/lit olacak şekilde agar agar eklenerek 121 C'de, 25 dk otoklavlanarak kullanıldı. Normal büyüme koşullarında, karbon kaynağı olarak glukoz kullanıldı ve %20'lik stok çözelti halinde hazırlanıp 121 C'de 25 dk otoklavda steril edildi, son konsantrasyonu %2 olacak şekilde ilave edildi.

#### **2)Sc-URA (Sentetik tam- urasil üreme ortamı)**

Elde edilen *S. cerevisiae* transformantlarının seçimine imkan veren seçici büyüme ortamıdır. İçeriğinde; 1.7 gram/litre Yeast Nitrogen Base (YNB), 5 gram/litre Amonyum sülfat ve 1.92 gram/litre urasil içermeyen amino asit karışımı (SC-Ura) (Sigma Y-1501) bulunmaktadır. 1.7 gram YNB ve 5 g/lit Amonyum sülfat distile suda çözülerek hacmi 1 lt'ye tamamlanarak otoklavda steril edildi. Deneylerde kullanımından önce disk filtre (por çapı 0.45 µm) sterilizasyonu ile steril edilen Sc-URA 1.92 g/lit olacak şekilde ilave edildi. Katı besiyerleri içeriğine ise konsantrasyonu 20g/lit olacak şekilde agar agar eklenerek, 121 C'de, 25 dk otoklavlanarak kullanıldı. Hazırlanan Sc-URA besiyerine %20'lik steril glukoz stok çözeltisinden, deneylerde açıklanan konsantrasyonlarda ve kullanımdan hemen önce eklendi.

#### **3) Lityum Asetat Çözeltileri (1M ve 0.1M)**

EST3 FS ve FF plazmitlerinin yaban tip ve mutant *S. cerevisiae* hücrelerine transformasyonu deneyinde kullanılan çözeltilerdir. Lityum asetat (Ma: 102.2) son konsantrasyonu 1M olacak şekilde 50 ml stok çözelti halinde hazırlanarak, filtre (0.45 µm por çaplı) ile sterilasyonu sağlandıktan sonra, oda sıcaklığında muhafaza edildi. 0.1 M

Lityum asetat çözeltisi transformasyon deneylerinin hemen öncesinde stok çözeltiden seyreltilerek, taze olarak kullanıldı.

#### **4) Polietilen Glikol (%50 PEG)**

3,350 molekül ağırlığındaki polietilen glikol distile suda %50'lik stok çözelti halinde hazırlanarak, 121 C'de 25 dk otoklavda steril edildi, transformasyon deneylerinde kullanıldı.

#### **5) Lizis Tampon Çözeltisi (Break Buffer)**

*S. cerevisiae* transformantlarının süspansedilmesi ve lizat elde etmek amacıyla kullanıldı. Steril distile su ile son konsantrasyonları aşağıdaki listede verildiği gibi olacak şekilde hazırlanan çözelti, +4 C'de muhafaza edildi.

İçeriği:

100 mM Tris.HCl (pH: 8)

1 mM 1,4-Dithio-DL-threitol (DTT)

%20 Gliserol

4 mM Phenylmethanesulfonyl Fluoride (PMSF)

#### **6) SDS (%0.1) ve Kloroform Çözeltileri**

*S. cerevisiae* transformantlarının permabilize edilerek hücre lizatlarının elde edilmesinde kullanılan çözeltilerdir. Kloroform çözeltisi seyreltme olmaksızın direkt olarak stoktan kullanılırken, SDS çözeltisi steril distile suda %0.1'lik stok çözelti olarak hazırlandı.

#### **7) $\beta$ -Galaktozidaz tampon çözeltisi (Z Buffer)**

*S. cerevisiae* transformantlarının  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktivitesi deneylerinde tampon çözelti olarak kullanılan çözeltinin bileşimi;

60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O,

40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O,

10 mM KCl,

1 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

50 mM  $\beta$ -Merkepto-etanol çözeltisi

Listede belirtilen son konsantrasyonlarda ve steril distile su ile hazırlanarak +4 C'de muhafaza edildi.

### **8) Lowry Çözeltileri**

*S. cerevisiae* hücrelerindeki toplam protein miktarının belirlenmesinde kullanılan çözeltilerdir.

I: Lowry A çözeltisi: 20g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 4g NaOH distile suda çözülerek son hacmi 1 lt'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

II: Lowry-B1 çözeltisi: 1 gram CuSO<sub>4</sub> distile suda çözülerek son hacmi 100 ml'ye tamamlandı ve +4 °C'de muhafaza edildi.

III: Lowry-B2 çözeltisi: 2 gram Sodyum potasyum tartarat distile suda çözülerek son hacmi 100 ml'ye tamamlandı ve +4 C'de muhafaza edildi.

IV: Lowry-C çözeltisi: Listede belirtilen miktarlarda, her deney için taze ve hemen öncesinde hazırlanan Lowry C çözeltisi Lowry A, B1 ve B2 çözeltilerinden oluşmaktadır.

Bileşimi;

24.5 ml Lowry A

250 µl Lowry B1

250 µl Lowry B2

### **9) ONPG (O-Nitrofenil β-D-Galaktopiranozid)**

Son konsantrasyonu 4 mg/ml olacak şekilde, Z-tampon çözeltisinde hazırlanan ONPG (Sigma N1127) +4 C'de muhafaza edildi.

## EK 2: $\beta$ - Galaktozidaz aktivitesi hesaplanması

**Aktivite:**  $(OD_{420} \times 1.7/0.0045)/(t \times V \times P)$

OD<sub>420</sub>: Sarı rengin absorbansı

1.7: Sarı rengin bulunduğu tüpün hacmi (980 $\mu$ l Z buffer, 20 $\mu$ l lizat, 200 $\mu$ l ONPG, 500  $\mu$ l NaCO<sub>3</sub>)

0.0045: ONPG'nin molar absorpsiyon katsayısı

t:  $\beta$ -galaktozidaz reaksiyon süresi (dakika)

V:  $\beta$ -Galaktozidaz ölçümünde kullanılan hücre lizatı hacmi (ml)

P: Hücre lizatlarının protein konsantrasyonları (mg/ml)

Verilen değerlere uygun olarak *S. cerevisiae* transformantlarından rapörtör gen olan *lacZ* geni ürünü  $\beta$ -galaktozidaz enzimi aktivitesi hesaplanmasında kullanılan formülün birimi nmol ONPG/dk/ mg protein olup, dakikada 1 mg protein tarafından hidroliz edilen nmol ONPG miktarını temsil etmektedir.

### **EK 3: Araştırmada Kullanılan Stres Ajanlarının Hazırlanması**

#### **1) NaCl**

Ozmotik stres oluşturmak amacıyla, stok konsantrasyonu 4 M olacak şekilde distile su'da çözümlenerek hazırlandı, otoklavda steril edildi ve son konsantrasyonu 0.8 M olacak şekilde sıvı kùltürlere ilave edildi.

#### **2) Borik Asit**

Boron stresi oluşturmak amacıyla, stok konsantrasyonu 500 mM olacak şekilde distile su'da çözümlenerek hazırlandı, 0.45 mikron por çaplı membran filtreden steril edildi ve son konsantrasyonu 50 mM olacak şekilde sıvı kùltürlere ilave edildi.

#### **3) 3-Amino –triazole (3-AT)**

Amino asit açlığı oluşturmak amacıyla, stok konsantrasyonu 500 mM olacak şekilde distile su'da çözümlenerek hazırlandı, 0.45 mikron por çaplı membran filtreden steril edildi ve son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde sıvı kùltürlere ilave edildi.

#### **4) Gliserol ve Laktat**

Karbon açlığı oluşturmak amacıyla, nonfermentable karbon kaynağı Gliserol ve Laktat %20'lik stok çözeltiliden son konsantrasyonu %2 olacak şekilde filtre sterilizasyonu ile sıvı kùltürlere ilave edildi

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sueda SARICA  
Doğum Yeri ve Tarihi : Akçakoca, 12.11.1992  
Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Akçakoca Anadolu Lisesi, 2007-2011  
Lisans : İstanbul Üniversitesi, 2011-2015  
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi, 2015-2018

Çalıştığı Kurum/kurumlar ve Yıl : --  
İletişim (e-posta) : sueda-sarica@hotmail.com  
Yayınları :

**1- Türkel, S., Sarıca, S. 2018.** Identification of yeast samples and yeast biodiversity from *Arbutus unedo* L. Berries. 4th International Congresson Applied Biological Sciences, 3-5 Mayıs 2018, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.

**2- Türkel, S., Sarıca, S.. 2017.** Effects of stress activated protein kinases on the expression of EST3 gene that encodes telomerase subunit in *Saccharomyces cerevisia*. *Biologia*, 72(3): 252-258.

**3- Türkel, S., Sarıca, S.. 2016.** Stres activated protein kinases regulates the ribosomal frameshift rate in EST3 gene, encoding subunit in telomerase. *The FEBS Journal*, 283 (Suppl 1): 176.