



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Schizosaccharomyces pombe*'de ENDOPLAZMİK RETİKULUM
STRESİNİN HÜCRESEL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nezahat Gökçe ÖZSAMUR

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Bedia PALABIYIK**

Haziran, 2020

İSTANBUL

Bu çalışma, 24.06.2020 tarihinde aşğıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Bedia PALABIYIK(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Semian KARAER
UZUNER
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Hızlan Hıncal AĞUŞ
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 30878 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans eğitimim başta olmak üzere bu çalışmanın gerçekleşmesinde değerli bilgilerini ve zamanını benimle paylaşan, desteğini ve samimiyetini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Bedia PALABIYIK'a teşekkür ederim ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Öğr. Üyesi Semian KARAER UZUNER ve Dr. Öğr. Üyesi Çağatay TARHAN başta olmak üzere yardımda bulunarak yol gösteren İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün tüm öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda kaynak ve yöntem açısından destekleyen ve gelecekteki hayatında çok daha başarılı olacağına inandığım kıymetli Arş. Gör. Merve YILMAZER, Arş. Gör. Burcu KARTAL ve Maya Genetiği ve Biyoteknolojisi Araştırma Laboratuvarı'ndaki çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca mikroskobik inceleme bölümünde değerli deneyimini ve desteğini esirgemeyen Bezmialem Vakıf Üniversitesi'nden Ümit Yaşar KINA'ya teşekkür ederim.

Hedeflerime ulaşmamda daima arkamda olan, azmimi destekleyen ve sevgisiyle beni yalnız bırakmayan sevgili aileme sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Haziran 2020

Nezahat Gökçe ÖZSAMUR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. MAYADA ENDOPLAZMİK RETİKULUM YAPISI VE İŞLEVİ	4
2.1.1. Mayada Endoplazmik Retikulumun Yapısı.....	4
2.1.2. Mayada Endoplazmik Retikulumun Görevleri.....	7
2.1.2.1. Protein Sentezi ve Katlanması	7
2.1.2.2. Lipid Sentezi.....	11
2.1.2.3. Kalsiyum (Ca^{2+}) Metabolizması	11
2.2. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ	12
2.3. ER STRESİNE BAĞLI GELİŞEN HÜCRE ÖLÜMÜ	19
2.3.1. Apoptoz	19
2.3.2. Otofaji.....	23
2.4. HÜCRE İSKELETİ ORGANİZASYONU	24
2.5. MODEL ORGANİZMA OLARAK <i>SCHİZOSACCHAROMYCES POMBE</i>	25
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	28
3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN ORGANİZMALAR VE BESİ ORTAMLARI.....	28
3.1.1. Organizmalar	28
3.1.2. Besi Ortamları	29
3.2. ORGANİZMALARIN ÜRETİMİ VE SAKLANMASI.....	30
3.3. GENOTİP KONTROLÜ.....	31
3.4. <i>S. pombe</i> IRKLARINDA ÜREMENİN İZLENMESİ	31
3.5. ENDOPLAZMİK RETİKULUM (ER) STRESİNİN UYGULANMASI	32
3.5.1. Deney ve Kontrol Gruplarının Hazırlanması	32

3.5.2. Endoplazmik Retikulum Stresinin Canlılık Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi	33
3.6. HÜCREİÇİ OKSİDASYON DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ	33
3.7. MİKROSKOBİK İNCELEME	34
3.7.1. Apoptozun Belirlenmesi	34
3.7.2. Aktin İskeletinin Boyanması	35
3.7.3. Otofajinin Belirlenmesi	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. ENDOPLAZMİK RETİKULUM (ER) STRESİNİN CANLILIK ÜZERİNDE ETKİSİNİN İNCELENMESİ.....	37
4.1.1. ER Stresinin Apoptoz Oluşumundaki Rolü.....	38
4.1.2. ER Stresinin Otofaji Oluşumundaki Rolü	42
4.1.3. ER Stresinin Hücre İskeletinin Organizasyonundaki Rolü	45
4.2. <i>S. pombe</i> MUTANTLARINDA ER STRESİNİN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ	49
4.2.1. <i>S. pombe</i> Mutantlarında Genotip Kontrolü	49
4.2.2. <i>S. pombe</i> Mutantlarında Üremenin İzlenmesi	50
4.2.3 <i>S. pombe</i> Mutantlarında ER Stresinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Rolü	51
4.2.4. <i>S. pombe</i> Mutantlarında ER Stresinin Hücreiçi Oksidasyon Düzeyindeki Rolü	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	54
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ	78

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** ER yapısının basit şematik hali ve elektron mikrosafı. N; nükleus, CecER; merkezi sisternal ER, TubER; tübüler ER, PmaER; plazma membra ilişkili Er (West ve diğ., 2011; Schwarz ve Blower, 2016). 5
- Şekil 2.2:** Co-translasyonel translokasyon ve Post-translasyonel translokasyona ait diyagramlar (Cooper, 2000). 7
- Şekil 2.3:** İntegral membran proteinlerinin oluşumu (Cooper, 2000). 8
- Şekil 2.4:** UPR yolağı (Gardner ve diğ., 2013). 14
- Şekil 2.5:** Ire1 protein yapısına ait diagram. SP: Sinyal peptidi, CSSR: stres algılama bölgesi, BiP bağlanma bölgesi, TM: transmembran segmenti, kinaz ve RNaz bölgesi bulunur (Hernández-Elvira ve diğ., 2018). 15
- Şekil 2.6:** *S. pombe* ve diğeri maya türlerinde UPR yolağı (Hernández-Elvira ve diğ., 2018). 17
- Şekil 2.7:** *S. pombe* yabancı ırka ait mikrosaf. Bar 5 µm'dir. 26
- Şekil 4.1:** *S. pombe* 972h⁻ ve FY29340 ırkına ait farklı konsantrasyonlarda tunikamisinin (1 µg/mL ve 5 µg/mL) farklı saatlerdeki (1,4 ve 24. saat) canlılık üzerine etkisini gösteren spotlar. K: kontrol grubu, D: deney grubu, APK: Apoptoz Pozitif Kontrol, *S. pombe* 972h⁻, 5 mM, 4 saat arsenik ile inkübe edildi. 38
- Şekil 4.2:** 1 µg/mL ve 5 µg/mL tunikamisin uygulanmış *S. pombe* yabancı ırkında konfokal mikroskop görüntüleri. Yeşil renge boyanan nükleuslar apoptotik hücrelere aittir. Leica TCS SP8 konfokal mikroskoku, 68x büyütme oranı, bar 5 µm'dir. Kırmızı oklar apoptotik hücreleri işaret eder. APK: Apoptoz Pozitif Kontrol, *S. pombe* 972h⁻, 5 mM, 4 saat arsenik ile inkübe edildi. 39
- Şekil 4.3:** 1 µg/mL ve 5 µg/mL tunikamisin uygulanmış ve uygulanmamış *S. pombe* yabancı ırkında apoptotik hücre oranı. Grafik, kontrol ve deney gruplarına ait preparatların rastgele seçilen mikroskop alanlarından ele alınan 300 hücre içindeki apoptotik hücrelerin yüzde değerini ifade eder. TN: tunikamisin. APK: Apoptoz Pozitif Kontrol, *S. pombe* 972h⁻, 5 mM, 4 saat arsenik. 42
- Şekil 4.4:** 1 µg/ml ve 5 µg/ml tunikamisin uygulanmış GFP-bağı atg8 içeren *S. pombe* (FY29340) ırkında otofagozom oluşumlarının morfolojik incelenmesi. Sitosole dağılmış parlak yeşil renkli noktalar fagozomları işaret eder. Leica TCS SP8 konfokal mikroskoku, 68x büyütme oranı, bar 5 µm'dir. 43
- Şekil 4.5:** 1 µg/mL ve 5 µg/mL tunikamisin uygulanmış *S. pombe* yabancı ırkında hücre çeperi ve aktin iskeletinin konfokal mikroskop altında morfolojik incelenmesi.

Leica TCS SP8 konfokal mikroskopu, 68x büyütme oranı, bar 5 µm'dir. APK:
Apoptoz Pozitif Kontrol, *S. pombe* 972h⁻, 5 mM, 4 saat arsenik ile inkübe edildi.....46

Şekil 4.6: *S. pombe* mutant ırklarına ait zamana bağlı hücre sayısı grafiği. 50

Şekil 4.7: *S. pombe* mutant ırklarına ait tunikamisin (1 µg/mL) farklı saatlerdeki (1,4
ve 24. saat) canlılık üzerine etkisini gösteren spotlar. 10 kat sulandırım yapıldı. K:
Kontrol grubu; D: Deney grubudur. 51

Şekil 4.8: Tunikamisin (1µg/mL, 4 ve 24 saat) uygulanan *S. pombe* mutant ırklarında
kontrole göre ROT birikimi. ROT: Reaktif Oksijen Türleri. P<0.05 (*); P<0.01
(**); P<0,001(***). 53



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Memeli ve maya hücrelerinde ER ile ilişkili hücre ölümünün tetikleyicileri (Austriaco, 2012).....	21
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan ırkların listesi.....	28
Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan besi ortamları.....	29
Tablo 3.3: MML ve MMA besi ortamlarında kullanılan çözeltiler.....	30
Tablo 3.4: Mikroskopik inceleme için kullanılan çözeltilerin listesi.	34
Tablo 4.1: <i>S. pombe</i> mutant ırklarının genotipik özelliklerinin fenotipik kontrolü. YEA: Katı zengin besi ortamı; MMA: Katı minimal besi ortamı; A: Adenin; U: Urasil; L: Lösin; +: Üreme var; -: Üreme yok.	49

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

a	: Aaaa
α	: Alfa
β	: Beta
°C	: Santigrad derece
Δ	: Delta
μ	: Mikro

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
A	: Absorbans
AA	: Asetik asit
AFT6	: Aktivite edici transripsiyon faktörü 6
APK	: Apoptoz pozitif kontrol
DAPI	: Diamidino-2-fenilindol
DCF	: Diklorofluoresine
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ER	: Endoplazmik retikulum
ERAD	: ER ile ilişkili yıkım
ER-SAD	: ER stresine bağlı hücre ölümü
ETZ	: Elektron taşıma zinciri
GFP	: Yeşil floresan proteini
HAC1	: ATF/CREB1'in homoloğu
INM	: İç nükleer membran
IRE1	: İnositol gereken enzim 1
M	: Molar
mg	: Miligram

mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
MMA	: Minimal katı besi ortamı
MML	: Minimal sıvı besi ortamı
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
OD	: Optik yoğunluk
ONM	: Dış nükleer membran
OST	: oligosakkariltransferaz
PBS	: Fosfat tamponu
PCD	: Programlanmış hücre ölümünü
PERK	: Protein kinaz RNA benzeri ER kinaz
RIDD	: Ire1'e bağlı parçalanmanın düzenlenmesi
RNA	: Ribonükleik asit
ROT	: Reaktif oksijen türleri
Sc	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SFA	: Doymuş yağ asitleri
Sp	: <i>Shizosaccharomyces pombe</i>
TdT	: Terminal deoksinukleotidil transferaz
TN	: Tunikamisin
TUNEL	: Terminal dUTP kırık ucunun işaretlenmesi
UPR	: Katlanmamış protein yanıtı
YEA	: Maya özütli katı besi ortamı
YEL	: Maya özütli sıvı besi ortamı
YES	: Zenginleştirilmiş maya özütli besi ortamı

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Schizosaccharomyces pombe'de ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN HÜCRESEL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nezahat Gökçe ÖZSAMUR

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Bedia PALABIYIK

Endoplazmik retikulum (ER) bütün ökaryotlarda bulunan ve protein sentezi ve taşınması, lipit sentezi ve kalsiyum depolanmasında görevli hücre içi bir organeldir. ER hücre içi ve hücre dışı çeşitli faktörlere karşı duyarlıdır. Strese maruz kalan ER’de homeostazinin bozulması sonucunda katlanmamış veya yanlış katlanmış protein birikimi meydana gelir. Bu durum ER stresi olarak adlandırılır. ER stresinde hücre, homeostazisini yeniden sağlamak için öncelikle katlanmamış/yanlış katlanmış protein yanıtı (UPR) yolağı oluşturur. UPR yolağı olarak insanda PERK (protein kinaz RNA benzeri ER kinaz), ATF6 (aktive edici transkripsiyon faktörü 6) ve Ire1 (inositol gerekli enzim 1) olmak üzere üç bağımsız yolak tespit edilmiştir. Mayada ise bu yolaklardan sadece Ire1 (inositol gerekli enzim 1) yüksek oranda korunmuş olarak bulunmaktadır. ER stresini azaltmak için aktiveleşen UPR yolağı proteinlerin doğru katlanmasını destekler, katlanmamış veya yanlış katlanmış protein birikimini azaltmak için protein yıkım mekanizmalarını çalıştırır. Fakat uzun süreli veya şiddetli strese maruz kalan hücrelerde, homeostaz sağlanmaz ve UPR yolağı, apoptoz ve otofaji dahil olmak üzere programlanmış hücre ölümünü tetikler.

Bu çalışmanın birinci kısmında *Schizosaccharomyces pombe*’nin yabani ırkında ER stresi ajanı olarak tunikamisin (TN) antibiyotığının farklı dozları (1 µg/mL ve 5 µg/mL) 1, 4 ve 24 saat uygulanarak ER stresinin hücresel etkileri araştırıldı. İkinci kısımda ise, UPR (*ire1* ve *gpt1*), otofaji (*atg8*, *atg15* ve *trs85*), apoptoz (*aif1*), sinyal iletimi (*prz1*) ve hücre iskeleti (*myo51* ve *myo52*) süreçlerinde rol alan genlerin delesyonlu olduğu mutant ırklar kullanılarak

tunikamisinin (1 µg/mL; 1, 4 ve 24 saat) hücre canlılığı ve hücre içi oksidasyon düzeyine etkisi araştırıldı.

S. pombe yabani ırkında TN'nin tetiklediği ER stresine bağlı gelişen hücre canlılığının düzenlenmesinde apoptozdan ziyade otofajinin etkin olabileceği sonucuna varıldı. Artan TN dozu ve süresine bağlı olarak artan aktin yama organizasyonunun fagozom oluşumu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Diğer taraftan, mutant ırklarda yapılan deneyler sonucunda, *ire1Δ*, *gpt1Δ*, *atg8Δ*, *myo51Δ* ve *myo52Δ* mutantlarının doz bağımlı olmaksızın tunikamisine duyarlı, *atg15Δ* ve *trs85Δ* mutantlarının ise dirençli olduğu, ancak *aif1Δ* ve *prz1Δ* mutantlarının doz bağımlı olarak duyarlı olduğu belirlendi. Sonuç olarak, ER stresine karşı oluşan hücrel yanıtın apoptoz yerine otofaji olduğunu öneren hipotezi sonuçlarımız desteklemektedir.

Haziran 2020, 93 sayfa.

Anahtar kelimeler: ER stresi, UPR, Tunikamisin, *S. pombe*.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF CELLULAR EFFECTS OF ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN *Schizosaccharomyces pombe*

Nezahat Gökçe ÖZSAMUR

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Bedia PALABIYIK

The endoplasmic reticulum (ER) is an intracellular organelle in all eukaryotes and is responsible for protein synthesis and transport, lipid synthesis, and calcium storage. ER is sensitive to a variety of intracellular and extracellular factors. When ER exposed to stress, unfolded protein accumulation occurs as a result of disruption of homeostasis. This condition is called ER stress. Primarily the cell effectuates an unfolded protein response (UPR) pathway to restore homeostasis under ER stress. Three independent UPR pathways have been discovered in humans: PERK (protein kinase RNA-like ER kinase), ATF6 (activating transcription factor 6), and Ire1 (inositol essential enzyme 1). In yeast, only Ire1 (inositol essential enzyme 1) is highly conserved among these pathways. The UPR pathway, which is activated to reduce ER stress, supports the correct folding of proteins and utilizes protein degradation mechanisms to reduce unfolded protein accumulation. However, the cells, exposed to prolonged or severe stress, do not achieve homeostasis, and UPR pathway trigger the programmed cell death including apoptosis and autophagy.

In the first part of this study, the cellular effects of ER stress were investigated by applying different doses of tunicamycin (TN) antibiotics (1 µg/mL and 5 µg/mL) as an ER stress agent for 1, 4 and 24 hours in *Schizosaccharomyces pombe* wild type strain. In the second part, the effect of tunicamycin (1 µg/mL; 1, 4 ve 24 hours) on cell viability and intracellular oxidation level was investigated by deleting the genes which are they not to involve in UPR (*ire1* and

gpt1), autophagy (*atg8*, *atg15* and *trs85*), apoptosis (*aif1*), signal transduction (*prz1*) and cytoskeleton (*myo51* and *myo52*) processes.

It was concluded that autophagy rather than apoptosis may be effective in the regulation of cell viability under ER stress triggered by TN in *S. pombe* wild type strain. Also, it suggests that increased actin patch organization due to increased TN dosage and duration may be associated with phagosome formation. On the other hand, *ire1Δ*, *gpt1Δ*, *atg8Δ*, *myo51Δ* and *myo52Δ* mutants were found tunicamycin-sensitive in a dose-independent manner. *atg15Δ* and *trs85Δ* mutants were found tunicamycin-resistant. But, *aif1Δ* and *prz1Δ* mutants were found tunicamycin-sensitive in a dose-dependent manner. In conclusion our results fully support that the hypothesis that suggest that the cellular response to ER stress was autophagy instead of apoptosis.

June 2020, 93 pages.

Keywords: ER stress, UPR, Tunicamycin, *S. pombe*.

1. GİRİŞ

Endoplazmik retikulum (ER) ökaryotik hücrelerde nükleus membranından sitoplazmaya yayılmış tabaka ve kanal sistemiyle hücrede çeşitli görevlerin gerçekleştiği önemli bir organeldir (Hu ve diğ., 2011). Hücrede genel olarak protein sentezi ve taşınması, lipit sentezi ve kalsiyum depolanması görevlerinde rol oynar (Rapoport, 2007; Fagone ve Jackowski, 2009; Braakman ve Hebert, 2013). ER'nin yapısı nükleer zarf ve birbirine bağlı tabaka ile tübüleri içeren periferik ER'den oluşur (Voeltz ve diğ., 2002). ER tabakalarının sitosolik yüzeyinde yüksek yoğunlukta ribozom bulunur ve granüllü ER olarak da adlandırılır (Shibata ve diğ., 2006). Bu bölge salgılanan veya membrana bağlı proteinler için sentez, katlanma ve translayon sonrası modifikasyonların yapıldığı ana yerdir (Shibata ve diğ., 2011; West ve diğ., 2011). ER tübüllerinin membranında ise çok az sayıda ribozom bulunur ya da hiç ribozom bulunmaz ve granülsüz ER olarak adlandırılır (Shibata ve diğ., 2006). Lipit sentezi, kalsiyum depolanması gibi süreçlerde ise ER tübüllerinde meydana gelir (Baumann ve Walz, 2001).

ER'de sentezlenen proteinler oligosakkaritlerin eklenmesi (N-glikosilasyon) ve disülfür bağlarının oluşumu gibi kimyasal modifikasyonlara uğradıktan sonra görev alacağı hedef bölgeye taşınır. Proteinlerin doğru katlanmasına yardımcı olmak için şaperon ve katlanma enzimleri görev alır (Araki ve Nagata, 2011). En çok bulunan ER şaperonu Bip1, yeni sentezlenmiş polipeptitlerin translokasyonunu, de novo protein katlanmasını, yanlış katlanmış proteinlerin belirlenmesi ve kalsiyum homeostazını korunmasını içeren birçok fonksiyonda yer alır (Hendershot, 2004).

Bazı fizyolojik, çevresel veya patojenik durumlar ER'nin protein sentezi, modifikasyonu ve taşınması görevini yerine getirememesine neden olur. Bu durum ER lümeninde katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesiyle sonuçlanır (Hernández-Elvira ve diğ., 2018). ER lümenindeki doğru bir şekilde katlanamamış protein birikimini önlemek için proteinler öncelikle ER'den sitosole aktarılır ve ER ile ilişkili yıkım (ERAD) yoluyla kullanılarak parçalanır (Smith ve diğ., 2011). ERAD yoluyla ile katlanamamış protein birikimi hafifletilemediğinde ve ER homeostazı sağlanamadığında ER stresi oluşur (Walter and Ron, 2011). ER stresini önlemek ve protein homeostazını korumak için, ökaryotik hücreler katlanmamış protein yanıtını (UPR) geliştirmiştir (Kozutsumi ve diğ., 1988). UPR başlatılarak

protein katlama kapasitesini artırmak için şaperon ve katlama enzimlerinin miktarı artırılır, yeni protein sentezi traslasyonel inhibisyon ile durdurulur, seçili mRNA'lar yıkılır, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler parçlanır (Harding ve diğ., 1999; Travers ve diğ., 2000; Hollien ve Weissman, 2006). Uzun süreli ve şiddetli ER stresi altında UPR, ER homeostazını sağlayamazsa hücre ölüm mekanizmaları indüklenerek hücre ölümü meydana gelir (Lin ve diğ., 2007).

Metazoanlarda UPR yolağında görevli üç farklı algılayıcı vardır. Bunlar inositol gereken enzim 1 (Ire1), protein kinaz RNA benzeri ER kinaz (PERK) ve aktivite edici transripsiyon faktörü 6 (ATF6)'dır (Walter ve Ron, 2011). Bu UPR algılayıcıları ER membranına yerleşik bulunan transmembran proteinlerdir ve ER lümeni ile sitosol arasındaki iletişimi sağlarlar (Wu ve diğ., 2014). Mayada UPR algılayıcılarından sadece Ire1 bulunur ve ökaryotlar arasında yüksek derecede korunmuştur (Mori, 2009). Ire1, ER lümenindeki bölgesiyle katlanmamış proteinleri tespit ederken sitosoldeki bölgesiyle kinaz ve endoribonükleaz tepkimelerini gerçekleştirir (Mori ve diğ., 1993; Sidrauski ve Walter, 1997). Ire1'in aktivitesi Bip1 şaperonuyla düzenlenir. Normal koşullar altında Bip1, Ire1'in N-terminal bölgesine bağlıdır, ama ER stresi ortaya çıktığında Ire1'den ayrılarak UPR'yi başlatır (Bertolotti ve diğ., 2000; Okamura ve diğ., 2000). Bip1 şaperonunun Ire1'den ayrılarak katlanmamış proteinlere bağlanması Ire1'lerin dimerizasyon oluşturmaya neden olur (Credle ve diğ., 2005). Ire1 dimerizasyonu sonrası meydana gelen yapısal değişiklik Ire1'in endoribonükleaz bölgesini aktifleştirir (Korennykh ve diğ., 2009). Endoribonükleaz tepkimesiyle özellikle belli mRNA'lar kesilir. Bunlar metazoanlarda XBP1 (X-kutusu bağlı protein 1), *S. cerevisiae*'de ise HAC1 (ATF/CREB1'in homoloğu) mRNA'sıdır (Cox ve Walter 1996; Yoshida ve diğ., 2001). Daha sonra bu mRNA'lar, şaperon veya katlanma enzimi gibi ER stresini hafifletecek bileşenleri kodlayan genleri düzenleyen transkripsiyon faktörünü üretir (Sidrauski ve diğ., 1996; Travers ve diğ., 2000). *S. pombe*'de Ire1 için özelleşmiş bir mRNA bulunmamaktadır. Bu nedenle UPR, transkripsiyonel yeniden düzenleme aracılığıyla yapılmak yerine Ire1'e bağlı parçalanmanın düzenlenmesi (RIDD, "Regulated Ire1-Dependent Decay") mekanizmasıyla translasyonel inhibisyon gerçekleşir (Kimmig ve diğ., 2012).

ER stresine karşı UPR'nin aktivasyonu ile protein yükü ve şaperon kapasitesi arasındaki dengenin tekrar sağlanması için genellikle yeterli olur. Fakat uzun süreli devam eden ER stresi durumunda UPR, apoptoz ve otofaji dahil olmak üzere programlanmış hücre ölümünü (PCD,

“Progammed Cell Death”) tetikleyebilir (Tabas ve Ron, 2011; Austriaco, 2012). Proteinlerin katlanma modifikasyonlarından biri olan N-glikosilasyonu inhibe ederek ER stresine yol açtığı bilinen Tunikamisin (TN) antibiyotiği ile muamele edilen yabani ırk *S. cerevisiae*’de apoptoz benzeri hücre ölümü gerçekleşir (Takatsuki ve diğ., 1971; Hauptmann ve diğ., 2006; Hauptmann ve Lehle, 2008). Bu tez çalışmasında, TN’nin bu etkisini *S. pombe*’de araştırılması amaçlandı.

S. pombe yabani ırkı ve UPR (*ire1* ve *gpt1*), otofaji (*atg8*, *atg15* ve *trs85*), apoptoz (*aif1*), sinyal iletimi (*prz1*) ve hücre iskeleti (*myo51* ve *myo52*) süreçlerine dahil olan genleri delesyonlu mutant ırklarında TN’nin farklı dozları (5 µg/mL ve 1 µg/mL) 1, 4 ve 24 saat uygulanarak ER stresi izlendi. *S. pombe* yabani ırkında ER stresinin canlılık üzerine etkisi, apoptoz ve otofaji oluşumundaki rolü ve hücre iskeleti organizasyonundaki rolü araştırıldı. *S. pombe* mutant ırklarında ise ilgili yollarda oynadıkları rolleri belirlemek amacıyla ER stresinin hücre canlılığı ve hücre içi oksidasyon düzeyine etkisi araştırıldı.

Bu kapsamdaki çalışmalarda, *S. pombe* yabani ırkında yapılan morfolojik ve fizyolojik deneylerin sonucunda TN’nin tetiklediği ER stresine bağlı gelişen hücre canlılığının düzenlenmesinde apoptozdan ziyade otofajinin etkin olabileceği sonucuna varıldı. Aktin organizasyonuna bakıldığında ise artan TN doz ve süresine bağlı olarak aktin kümelerinin artması ve hücre uçlarında kalınlaşan hücre çeperinin gözlenmesi fagozom oluşumu ile de ilişkili olabileceğini akla getirdi. *S. pombe* mutant ırkalarında artan ROT seviyeleri ER stresine karşı geliştirilen yanıtta önemli olduğu tespit edildi. Ayrıca doz bağımlı olmaksızın *ire1Δ*, *gpt1Δ*, *atg8Δ*, *myo51Δ* ve *myo52Δ* mutantlarının duyarlı, *atg15Δ* ve *trs85Δ* mutantlarının ise dirençli olmasına karşın, *aif1Δ* ve *prz1Δ* mutantlarının, parental ırktaki gibi doz bağımlı olarak duyarlı olması, ER stresine bağlı gelişen ve hücre canlılığının düzenlenme sürecinde, apoptozdan ziyade otofajinin etkin olduğunu düşündürmektedir.

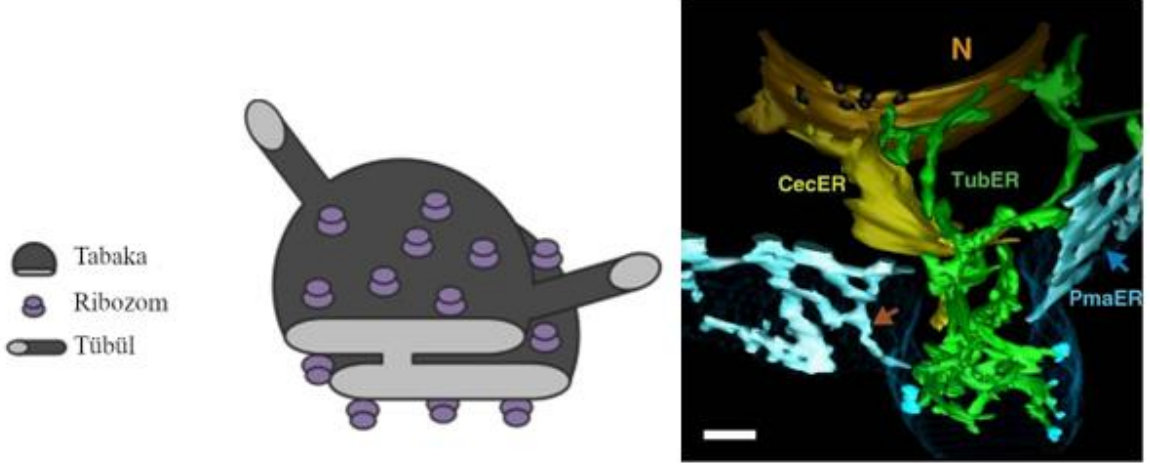
2. GENEL KISIMLAR

2.1. MAYADA ENDOPLAZMİK RETİKULUM YAPISI VE İŞLEVİ

Endoplazmik retikulum (ER) büyüklüğü, dinamik yapısı ve çeşitli görevlerde rol almasıyla hücre için önemli bir organeldir. Protein sentezi ve taşınması, protein katlanması, lipit ve steroid sentezi, karbonhidrat metabolizması ve kalsiyum depolanması görevlerinin hücrede gerçekleştiği ana yerdir (Clapham, 2007; Rapoport, 2007; Fagone ve Jackowski, 2009; Braakman ve Hebert, 2013). Organelin bu çok yönlü işlevselliğinden dolayı hücre çekirdeğinden sitoplazmaya yayılmış geniş yüzeyi ve çok sayıda kanalları içeren eşsiz fiziksel bir yapısı vardır. Bu farklı yapısal alanlar belirli bir işlevle ilişkilidir (Westrate ve diğ., 2015).

2.1.1. Mayada Endoplazmik Retikulumun Yapısı

Endoplazmik retikulum (ER) ökaryotik hücrelerde membrana bağlı olarak bulunan en büyük organeldir (Friedman ve Voeltz, 2011; Hu ve diğ., 2011). ER genel olarak nükleer zarf ve birbirine bağlı tabaka ile tübülleri içeren periferik ER'den oluşur (Şekil 2.1) (Voeltz ve diğ., 2002). Membran ile birbirine bağlı bir ağ olarak tanımlansa da ER'yi oluşturan farklı yapılar hücre içinde çeşitli fonksiyonlar gerçekleştirir. Tomurcuklanan mayada iletim elektron mikroskobu ve çift eksenli elektron tomografisi ile yapılan son çalışmada ER'nin yapısal olarak üç farklı ana alana bölünebileceğini ortaya koyulmuştur: plazma membran ilişkili ER (pmaER), merkezi sisternal ER (cecER) ve tübüler ER (tubER; West ve diğ., 2011).



Şekil 2.1: ER yapısının basit şematik hali ve elektron mikrografi. N; nükleus, CecER; merkezi sisternal ER, TubER; tübüler ER, PmaER; plazma membra ilişkili Er (West ve diğ., 2011; Schwarz ve Blower, 2016).

Nükleer zarf, iç nükleer membran (INM) ve dış nükleer membran (ONM) olarak çift lipit tabakadan oluşur ve periferik ER ile ortak bir lümen paylaşır. ONM ve INM'nin etrafını kaplayan yüzlerce nükleer pordan RNA ve protein dahil birçok molekülün geçişi gerçekleşir. Bu geçiş molekülün boyutuna bağlı olarak farklı hızda ve şekilde olabilir. Nükleer zarf, periferik ER'nin parçasını oluşturan tabaka ve sisterna ile bağlantılıdır (Schwarz ve Blower, 2016). Periferik ER tabakaları aralarında lümen bulunan çift lipit katmandan oluşan kavisli bölgelerdir. Bu tabakaların uzunluğu değişebilir ancak kalınlığı çok tutarlıdır, genellikle memelilerde yaklaşık 50 nm ve mayada 30 nm'dir (Bernales ve diğ., 2006). Tabakalar genellikle istiflenmiş bir konformasyonda gözlenir ve bükülmüş kenarların membranları vasıtasıyla birbirlerine bağlanır (Terasaki ve diğ., 2013). ER tabakalarının sitosolik yüzeyinde yüksek yoğunlukta ribozom bulunur ve granüllü ER olarak da adlandırılır (Shibata ve diğ., 2006). Bu bölge salgılanan veya membrana bağlı proteinler için sentez, katlanma ve translasyon sonrası modifikasyonların yapıldığı ana yer olarak görev yapar (Shibata ve diğ., 2011; West ve diğ., 2011). ER tübüllerinin membranında ise çok az sayıda ribozom bulunur ya da hiç ribozom bulunmaz ve granülsüz ER olarak adlandırılır (Shibata ve diğ., 2006). Tübüller sürekli yeniden düzenlenen ve büyüyen dinamik bir ağıdır. ER tabakaları ve tübülleri çok farklı yapısal ve işlevsel özelliklere sahip olmalarına rağmen lümenleri benzerdir (Bernales ve diğ., 2006; West ve diğ., 2011).

Periferik ER'nin tabaka ve tübülleri bütün ökaryotik hücrelerde bulunur (Staehelin, 1997). Ama birbirlerine oranları farklı hücre tiplerinde değişiklik gösterir ve bu hücrelerin farklı fonksiyonlarını yansıtır. Örneğin pankreas salgı hücreleri ve B hücreleri büyük miktarda salgı proteini sentezledikleri için bu hücrelerdeki ER'nin yapısında tabakalar çoğunlukta bulunur. Lipit sentezi, kalsiyum depolanması gibi süreçlerde yer alan hücreler öncelikle tübüllerden oluşan bir ER'ye sahiptir (Baumann ve Walz, 2001).

Periferik ER yapısının düzenlenmesinde yer alan moleküler bileşenler ER'nin yapısı kadar çeşitlidir. ER'nin yapısını oluşturan birçok protein yakın zamanda tespit edilmiştir. En iyi bilinen protein grubu retikulon ailesine ait proteinlerdir. Retikulon proteinleri bir transmembran proteinidir ve ER membranına yerleştiğinde saç tokası topolojisi oluşturarak membranın bükülmesine katkıda bulunur (Voeltz ve diğ., 2006; Shibata ve diğ., 2010). Bu proteinler oligomer oluşturma eğilimindedir ve diğer ER membran proteinlerine göre daha az hareketlidir (Shibata ve diğ., 2008). Retikulonların azalması yani membranın bükülme yeteneğinin azalması ER tübüllerinin sayısını azaltırken ER tabakalarının genişlemesine yol açar (De Craene ve diğ., 2006; Voeltz ve diğ., 2006; Anderson ve Hetzer, 2008). Bu nedenle, bir hücre içinde retikulon düzeyi ER tübüllerin miktarını ve yapısını belirler. Retikulon proteinleri tomurcuklanan mayada Rtn1p ve Rtn2p olarak tanımlanmıştır (Voeltz ve diğ., 2006).

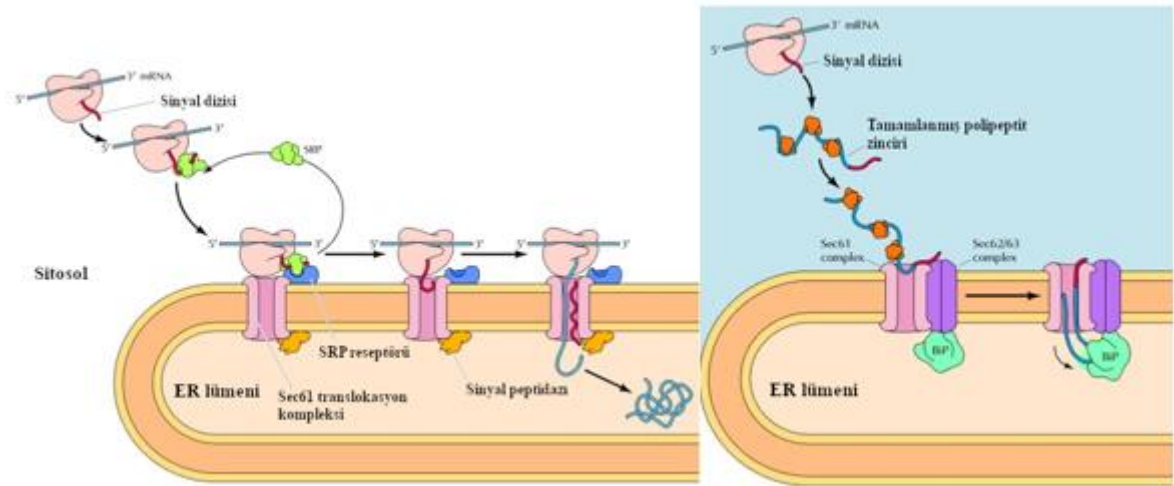
Periferik ER yapısının düzenlenmesinde retikulon proteinlerinin yanında DP1/Yop1p protein ailesi üyelerinin de katkısı bulunur (Shibata ve diğ., 2008). Bu protein ailesi özellikle tübüllerde ve tabakaların kenarlarında konumlanır ve ER yapılarının büyümesinde görev alır (Schwarz ve Blower, 2016). DP1/Yop1p proteinleri retikulonlar ile benzer bir transmembran saç tokası mimarisini paylaşır (Voeltz ve diğ., 2006; Shibata ve diğ., 2008).

ER tübülleri oluşturulduktan ve şekillendirildikten sonra yan yana duran iki özdeş membranın homotipik füzyon yoluyla birbirine bağlanması gerekir. Bu homotipik füzyon işlevinde görevli protein mayada Sey1p olarak, memelilerde ise dinamin benzeri GTPaz sınıfına ait atlastin olarak tanımlanmıştır (Hu ve diğ., 2009; Orso ve diğ., 2009; Anwar ve diğ., 2012). Füzyon reaksiyonu farklı membranlarda bulunan Sey1p proteinin GTPaz bölgesinin birbirine bağlanıp dimer oluşturmasıyla başlar. Böylece membranlar birbirine bağlanır (Orso ve diğ., 2009; Bian ve diğ., 2011).

2.1.2. Mayada Endoplazmik Retikulumun Görevleri

2.1.2.1. Protein Sentezi ve Katlanması

Bütün ökaryotik organizmalarda ER protein sentezi ve katlanması, lipid sentezi ve kalsiyum dengesinin sağlanması gibi işlevleri gerçekleştirir. ER’de sentezlenen proteinler başlıca salgı proteinleri ve integral membran proteinleridir (Jan ve diğ., 2014). Protein sentezi için ribozomların ER’nin sitosolik yüzüne yerleşmesi gerekmektedir (Schwarz ve Blower, 2016). Daha sonra yeni sentezlenen polipeptitler ER membranından ya co-translasyonel translokasyon ya da post-translasyonel translokasyon yolağını kullanarak ER lümenine geçer (Şekil 2.3) (Zimmermann et al., 2011).

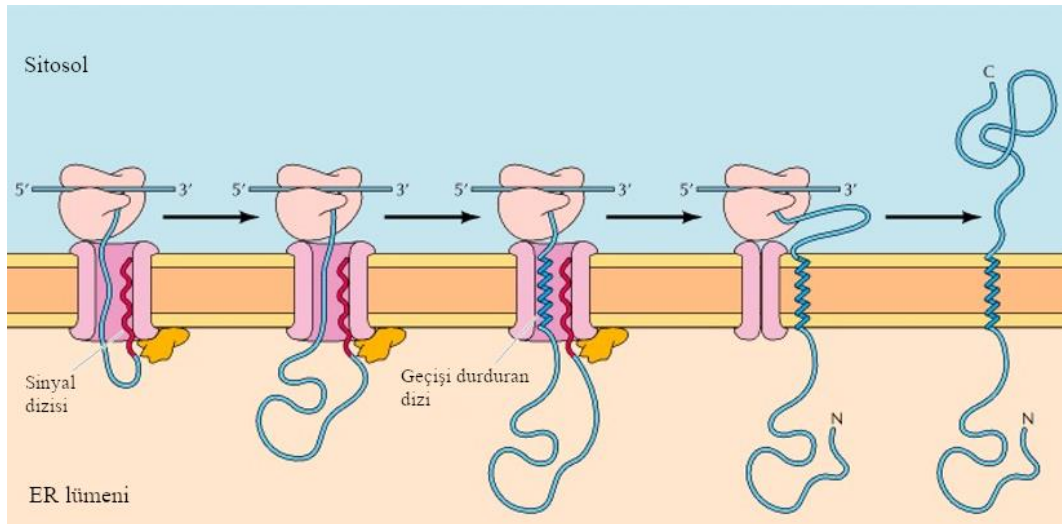


Şekil 2.2: Co-translasyonel translokasyon ve Post-translasyonel translokasyona ait diyagramlar (Cooper, 2000).

Co-translasyonel translokasyonda mRNA-ribozom kompleksinde yeni sentezlenen polipeptidin amino ucunda yer alan sinyal dizisi sinyal tanıma parçacığı (SRP, “Signal Recognition Particle”) tarafından tanınır ve bağlanır (Walter ve Blobel, 1981). SRP, mRNA-ribozom kompleksine bağlandıktan sonra ER membranında bulunan SRP reseptörüne bağlanır (Walter ve Blobel, 1981; Meyer ve diğ., 1982; Barlowe ve Miller, 2013). ER membranına SRP reseptörü aracılığıyla yerleşen mRNA-ribozom kompleksinde translasyon devam eder ve sec proteinleri, mayada başlıca Sec61p, tarafından oluşturulan kanallar ile ER lümenine yeni

sentezlenen proteinin geişı sağlanır. (Lyman ve Schekman, 1996; Rapoport, 2007). Translasyon tamamlandıktan sonra bir sinyal peptidaz yeni sentezlenen polipeptitten ER lümenine girişı sağlayan kısa sinyal dizisini keser (Evans ve diğ., 1986). Post-translasyonel translokasyonda ise sitosolik şaperonlar kritik bir rol oynar. Bu şaperonlar sitoplazmada serbest halde bulunan ribozomlarda sentezlenen katlanmamış polipeptitleri hidrofobik sinyal dizisinden tanıyarak bağlanır ve ER membranına taşır (Barlowe ve Miller, 2013). Mayada Post-translasyonel translokasyonda görevli şaperon ATPaz aktivitesi olan Hsp70 proteinidir (Chirico ve diğ., 1988; Barlowe ve Miller, 2013). Translokasyonun tamamlanması heterotrimerik Sec61p kompleksi ve ER lümeninde bulunan Kar2p şaperonu, diğer adıyla BiP, yardımıyla gerçekleşir (Lyman ve Schekman, 1996; Austriaco, 2012).

Eğer polipeptit bir integral membran proteini olacaksa hidrofobik bakiyelerinden veya membran geçişini durduran dizi (“stop-transfer sequence”) bölgesinden tanınır ve translokasyon duraklatılır (şekil 2.3) (Blobel, 1980). Bu polipeptitlerin de animo ucunda sinyal dizisi bulunur ve yine Sec61 kanalının sinyal peptidazı ile kesilir. Membran geçişini durduran dizinin tanınmasıyla Sec61 kanalı kapanır. Böylece polipeptidin hareketi kısıtlanır ve karboksil ucundan sitosole doğru sentezi tamamlanır. Daha sonra polipeptit ER membranı üzerinde lateral olarak kaydırılır ve fosfolipid tabakası içine sabitlenir (Blobel, 1980; Cooper, 2000).



şekil 2.3: İntegral membran proteinlerinin oluşumu (Cooper, 2000).

Polipeptitler sinyal dizileri kesilmeden de ER membranına yerleştirilebilir. Bu sinyal dizileri daha önce açıklandığı gibi SRP tarafından tanınarak ER membranına proteinleri taşımak için kullanılmaktadır. Sinyal peptidaz ile kesilmeyen sinyal dizileri, ER membranına bağlanmada işlev görür. Bu sayede polipeptit zincirinin sitosoldeki bölümü amino ucu veya karboksil ucu olması gibi alternatifler sunar (Cooper, 2000). Aynı zamanda hem sinyal dizisinin kesilmemesi hem de membran geçişini durduran dizinin varlığıyla polipeptit ER membranını birden fazla geçer ve ilmek yapısı oluşur (Cooper, 2000). Translasyon tamamlandıktan sonra ribozomlar tekrar sitosole salınır (Seiser ve Nicchitta, 2000).

Protein sentezinin ve ER lümenine translokasyonunun ardından proteinlerin şaperonlar ve katlanma enzimleri yardımıyla uygun katlanma ve modifikasyonlara uğraması gerekir. Bu modifikasyonlar N-glikosilasyonu, disülfid bağının oluşması ve oligomerizasyonu içerebilir (Braakman ve Hebert, 2013). Ökaryotik salgı yolağındaki birçok proteinin asparagin bakiyesine N-bağılı oligosakkarit eklenmesiyle modifiye edilir. Polipeptitin korunmuş Asn-X-Ser/Thr dizisine oligosakkariltransferaz (OST) enzimiyle oligosakkarit eklenir (Nilsson ve Heijne, 1993). OST, sekiz geçişli integral membran polipeptitinden oluşur ve Sec61 kanalının yanında yer alır (Kelleher ve Gilmore, 2006). Böylece polipeptidin translokasyonu, sinyal dizisinin kesilmesi ve N-glikosilasyonun gerçekleşmesi sırasıyla olur (Chen ve diğ., 2001). Hidrofilik N-bağılı glikanlar, ER’de yeni sentezlenmiş proteinlerin termodinamik kararlılıklarını ve çözünürlüklerini etkiler. Ayrıca N-bağılı yapı proteinlerin katlanmasına ve yanlış katlanmış glikoproteinlerin düzeltilmesine yardımcı olmaktadır (Schwarz ve Aeby, 2011). N-glikosilasyona ek olarak bazı proteinler O-glikosilasyon ile modifiye edilir. Proteinin Ser/Thr amino asit bakiyesine mannosil vericisi olarak dolikol fosfat mannoz kullanarak protein O-mannosiltransferaz(PMT) enzimiyle mannoz eklenir (Orlean, 1990; Willer ve diğ., 2003). Salgı proteinlerindeki O-bağılı mannosil modifikasyonu mayada esansiyeldir ve hücre duvarının bütünlüğünün sağlanmasında gereklidir (Gentzsch ve Tanner, 1996; Strahl-Bolsinger ve diğ., 1999).

Proteinlerin translasyon sonrası bir diğer modifikasyonu da karboksil uçlarına glikosilfosfatidilinositol (GPI) eklenerek membran lipidine tutunmasıdır. ER’deki bu modifikasyon 20’den fazla gen ürününün rol aldığı çoklu bir yolakla gerçekleşir (Orlean ve Menon, 2007). GPI sentezi ve tutunması maya için elzem bir işlemdir. Hücre yüzeyindeki GPI bağılı proteinlerin hücre morfolojisinde ve hücre duvarının yapısında kritik rol oynadığı

düşünülmektedir (Leidich ve diğ., 1994; Pittet ve Conzelmann, 2007). N-bağlı oligosakkaritlerde olduğu gibi GPI, lipide bağlı olarak sentezlenir ve daha sonra GPI transamidaz kompleksi tarafından hedef proteine aktarılır (Fraering ve diğ., 2001). Hedef proteinin karboksil ucunda yaklaşık 30 amino asitlik tanıma bölgesi bulunur ve bu bölge çıkarılarak GPI bağlanır (Udenfriend ve Kodukula, 1995). Bu sinyal diziyi içeren proteine GPI eklenmezse veya dizi kesilmezse proteinin ER'den çıkışı gerçekleşmez (Nuoffer ve diğ., 1993).

Yeni sentezlenen polipeptitler ER lümeninin oksitleyici ortamına taşındığında disülfid bağları oluşur. ER'de oluşan disülfid bağları salgı ve membran proteinlerinin yapısında önemli rol oynar. Polipeptit zincirinde bulunan sistein amino asitleri arasında oluşan disülfid bağı, protein disülfid izomerazlar (PDI) tarafından katalizlenen reaksiyonla gerçekleştirilir. Mayada Pdi1, disülfid izomerazı, salgı ve hücre yüzeyi proteinlerinde doğru disülfid bağlarının oluşumu için gerekli olan esansiyel bir proteindir (Farquhar ve diğ., 1991; Laboissiere ve diğ., 1995). Pdi1, ER membranının lümen yüzüne bağlı esansiyel flavoenzim Ero1'den disülfid oluşumu için oksitleyici eşdeğerlerini elde eder (Sevier ve diğ., 2007). Ero1, Pdi1 ve hedef proteinleri arasında elektronların yer değiştirmesiyle protein disülfid bağ oluşumu için Ero1 ve Pdi1 ana yolu oluşturur (Tu ve Weissman 2002; Gross ve diğ., 2006). Oksidoredüktaz aktivitesine ek olarak, Pdi1, disülfid bağları olmayan proteinler için bile protein katlanmasında moleküler bir şaperon görevi görebilir (Wang ve Tsou, 1993). Daha yakın zamanlarda, Pdi1 ve bu ailenin diğer üyelerinin, kalneksin (Cne1) ve Kar2 de dahil olmak üzere ER katlama bileşenleriyle ve ayrıca kalite kontrol mannosidaz enzimi, Htm1 ile etkileşime girdiği bildirilmiştir (Kimura ve diğ., 2005; Gauss ve diğ., 2011).

ER lümenine taşınmış yeni sentezlenen polipeptitlerin katlanması Hsp70 ATPaz sistemi tarafından yönetilir. Genel olarak Hsp70 proteinleri, protein katlanmasını kolaylaştırmak için katlanmamış polipeptitlerin hidrofobik bölgelerine bağlandığında ATP hidroliz eder. ADP salınımı gerçekleşene kadar Hsp70 katlanmamış polipeptide bağlı olarak kalır, daha sonra polipeptitten ayrılarak protein katlanması tamamlanır (Hartl, 1996; Bukau ve Horwich, 1998). Mayada, Hsp70 Kar2 ve ilgili Hsp70 proteini Lhs1 ile uyum içinde ER katlanmasında belirgin bir rol oynar (Baxter ve diğ., 1996; Steel ve diğ., 2004). Kar2 şaperon aktivitesi PDI, kalnexin ve glikan kırpma yollarıyla sıkı bir şekilde bağlantılıdır. Son olarak, Kar2 aynı zamanda, terminal olarak yanlış katlanmış proteinleri uzaklaştırmak için ER ile ilişkili bozulma (ERAD) yollarında da önemli bir rol oynamaktadır (Nishikawa ve diğ., 2001). Kar2'nin biyokimyasal

aktivitesi iyi biliniyor olsa da ER lümenindeki Kar2'ye bağlı katlanma ve modifikasyon süreçlerinin kontrolü araştırılmaya devam etmektedir.

ER'deki proteinlerin sentezleri, translokasyonları ve modifikasyonları doğru bir şekilde tamamlandıktan sonra proteinlerin ER'den çıkışının gerçekleşmesi gerekmektedir. ER membranında bu işlem için özelleşmiş bölge ER çıkış bölgesi (ERES) olarak adlandırılır (Palade, 1975). ER membranı tarafından oluşturulan vesikül COPII kaplama proteinleri ile kaplanır (Barlowe, 1994). Böylece proteinler ER'den golgi aparatına taşınır (Watson ve Stephens, 2004).

2.1.2.2. Lipid Sentezi

Salgı ve membran proteinlerinin sentezlendiği ER'de membran lipidlerinin üç ana sınıfı olan sfingolipidler, fosfolipidler ve sterollerin sentezi de yapılmaktadır (Fagone ve Jackowski, 2009; Henry ve diğ., 2012). Örneğin mayada triaçilgliserollerin biyosentetik adımlarının çoğu ER'de gerçekleşir. Genel olarak tüm membran fosfolipidlerinin ve nötr gliserolipitlerin sentezinde ilk adımı katalizleyen başlıca gliserol-3-fosfat açıltransferazlardan (GPAT) olan Gat1p ve Gat2p hem nükleer zarfta hem de periferik ER'de bulunur (Bratschi ve diğ., 2009). Ek olarak, iki ER membran proteini olan Orm1p ve Orm2p'nin sfingolipid sentezi ve fosfolipid homeostazında rol oynadığı gösterilmiştir (Han ve diğ., 2010). Bunlar, mayadaki lipid biyosentezine dahil olduğu bilinen çok sayıda ER'de bulunan gen ürününden sadece birkaçıdır.

Membranların ana lipid bileşeni olan fosfolipitler üretildikten sonra Golgi aparatına yakın olan ER bölgesine transfer edilir ve biyokimyasal olarak değiştirilir (Glick ve Nakano, 2009). ER-Golgi ara bölmesi (ERGIC) olarak bilinen bu bölge, tübüller ve vesiküller bakımından zengindir (Fagone ve Jackowski, 2009). Lipitler ERGIC'e taşındıktan sonra organel temasları veya salgı vesikülleri yoluyla dağıtılır (Appenzeller-Herzog ve Hauri, 2006).

2.1.2.3. Kalsiyum (Ca^{2+}) Metabolizması

ER, çeşitli biyomoleküllerin sentezlenmesi ve taşınması için ana bölge olmasının yanı sıra hücre içi kalsiyum iyonunun (Ca^{2+}) ana deposudur (Jaffe, 1983). Ökaryot hücrelerde Ca^{2+} , hücre çoğalması, kas kasılması, programlanmış hücre ölümü gibi biyolojik işlemleri düzenleyen hücre içi haberciler olarak işlev görür (Berridge ve diğ., 1998). Kalsiyum homeostazı sistemi sitosolde ve diğer organellerde en uygun konsantrasyonda Ca^{2+} 'nin bulunması için düzenlenmiş

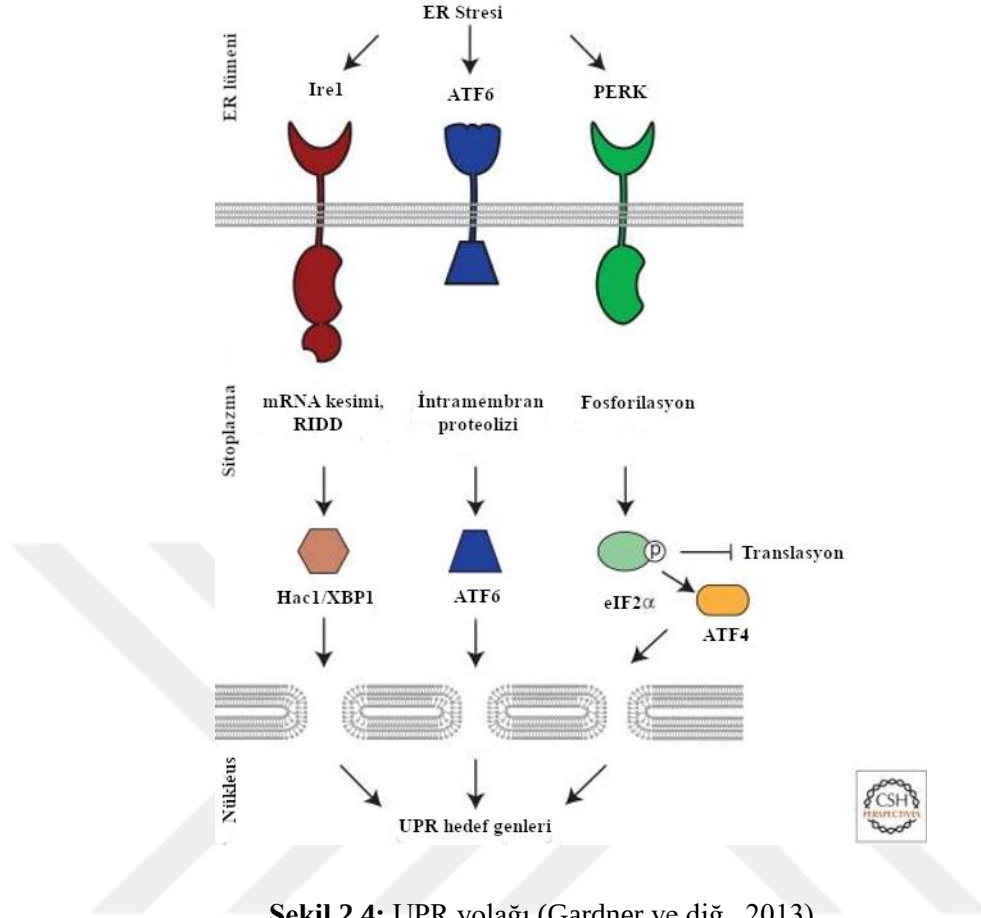
metabolik yolaktır. Örneğin normal bir maya hücresinin sitosolinde kalsiyum konsantrasyonu 50 – 200 nM arasındadır (Bonilla ve Cunningham, 2002; Cui ve Kaandorp, 2006). Hücre dışı uyaranlar sitosolik Ca^{2+} seviyesinin düzenlenmesinde etkilidir. ER membranında hücre içindeki kalsiyum miktarı azaldığında ER'den sitoplazmaya kalsiyum pompalayacak birçok kanal vardır (Clapham, 2007). Bir P-tipi ATPaz olan Pmr1, Ca^{2+} 'nin seviyesinin düzenlenmesinde rol aldığı bilinmektedir (Sorin ve diğ., 1997; Strayle diğ., 1999). ER'de konumlanan bir başka P-tipi ATPaz olan Cod1/Spf1 de ER işlevini ve homeostazını korumak için Pmr1p ile birlikte çalışır (Vashist ve diğ., 2002). ER'deki Ca^{2+} seviyesi, yerleşik luminal proteinlerin tutulmasında, salgı proteinlerinin taşınmasında, protein katlanmasında ve yıkımında, ER şaperon Kar2p'nin yanlış katlanmış proteinlerle birleştirilmesinde rol oynamaktadır (Durr ve diğ., 1998).

2.2. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ

Salgı ve transmembran proteinleri, endoplazmik retikulum (ER) membranına bağlanan ribozomlarda sentezlenir ve ER lümenine geçerek katlanır ve işlenir. Protein katlanması, oligosakkaritlerin eklenmesi (N-glikosilasyon) ve disülfür bağlarının oluşumu dahil olmak üzere kimyasal modifikasyonlarla gerçekleştirilir. Bu modifikasyonlar proteinlerin doğru çalışması için gereklidir ve proteinlerin görev aldıkları hedef organelere taşınmadan önce ER'de yapılır. Bazı fizyolojik, çevresel veya patojenik durumlar, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olabilir (Hernández-Elvira ve diğ., 2018). Doğru bir şekilde katlanamayan proteinler ER ile ilişkili yıkım (ERAD) için ER'den sitosole aktarılır ve ubiquitin-proteazom sistemi aracılığıyla parçalanır (Smith ve diğ., 2011). Proteinlerin doğru katlanmasına yardımcı olmak ve ER lümeninde birikimini önlemek için çeşitli şaperon ve katlanma enzimleri görev alır (Araki ve Nagata, 2011). Özellikle şaperonlar, ER kalite kontrolünün her alanında yer almaktadır. En çok bulunan ER şaperonu bip1 yeni sentezlenmiş polipeptitlerin translokasyonunu, de novo protein katlanmasını, yanlış katlanmış proteinleri ERAD sistemine iletilmesi ve kalsiyum homeostazını korunmasını içeren birçok fonksiyonda yer alır (Hendershot, 2004). ER'de protein katlama homeostazını sürdürmek için hücre, ER protein katlama yükünü yeterli ER protein katlamada görevli moleküllerle, özellikle bip1 gibi şaperonlarla dengelemelidir. Şaperonların yanı sıra doğru modifiye edilmemiş proteinlerin glukoz bakiyeleri UDP-glukoz: Glikoprotein glikoziltransferaz (UGGT) enzimi tarafından çıkartılır veya yeniden düzenlenir (Kaufman, 1999).

Birden fazla fizyolojik ve patolojik durum ER'deki proteinlerin kalite kontrolünü etkileyebilir ve ER'de yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olabilir. Katlanmamış proteinlerin bu şekilde artması, "ER stresi" olarak adlandırılır ve hücre için zararlı sonuçlar doğurabilir (Walter and Ron, 2011). ER stresiyle baş etmek ve protein homeostazını korumak için, ökaryotik hücreler katlanmamış protein yanıtını (UPR) geliştirmiştir (Kozutsumi ve diğ., 1988). UPR, protein katlama kapasitesini artırmak ve homeostazıyı yeniden sağlamak için translasyonel inhibisyon, seçili mRNA yıkımı, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin yıkımı, şaperon ve katlama enzimlerinin miktarının artırılması gibi süreçlere başvurur (Harding ve diğ., 1999; Travers ve diğ., 2000; Hollien ve Weissman, 2006). Bu nedenle UPR, hücrelerin ER protein katlanmasını engelleyen gelişimsel ve çevresel koşullara adapte olmalarına izin veren sitoprotektiftir. Bununla birlikte, şiddetli ve uzun süreli ER stresi sırasında UPR, sitoprotektif olmaktan ziyade, apoptozu indükleyerek sitotoksik hale gelebilir (Lin ve diğ., 2007). ER stresine bağlı apoptoz diyabet, nörodejeneratif hastalıklar, ateroskleroz ve böbrek hastalığı dahil olmak üzere birçok yaygın hastalıkta önemli bir patojenik faktördür (Tabas ve Ron, 2011). UPR'nin hücre kaderini belirlemedeki merkezi rolü nedeniyle, UPR'yi terapötik faydada kullanacak küçük moleküller modülatörleri tanımlamak için birçok çalışma yapılmıştır (Fribley ve diğ., 2011; Papandreou ve diğ., 2011; Volkmann ve diğ., 2011; Cross ve diğ., 2012; Mimura ve diğ., 2012).

UPR yolağının birçok bileşeni ve mekanizması türler arasında korunmuştur. Metazoanlarda her biri ER stresi uyarıcısını algılamak için görev alan proteinin adını taşıyan üç ana UPR algılayıcısı vardır. Bunlar inositol gereken enzim 1 (Ire1), protein kinaz RNA benzeri ER kinaz (PERK) ve aktivite edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6)'dır (Şekil 2.4) (Walter ve Ron, 2011). Bu UPR algılayıcıları ER membranına bağlı transmembran proteinlerdir. ER lümenindeki anormal durumları algılayıp bu bilgiyi sitosoldeki bir dizi transkripsiyon faktörüne iletir. Böylece transkripsiyon faktörleri nukleusa ulaşarak burada UPR ile ilgili genleri aktive eder (Wu ve diğ., 2014).



Şekil 2.4: UPR yolağı (Gardner ve diğ., 2013).

UPR'nin üç ana algılayıcısından en korunmuş olanı Ire1'dir ve mayada sadece bu mekanizma bulunur (Mori, 2009). *Saccharomyces cerevisiae*'de Ire1 (ScIre1), 1115 amino asit bakiyesi olan bir transmembran proteinidir (Hernández-Elvira ve diğ., 2018). Bu proteinin amino (N) terminal ucu ER lümeninde bulunup katlanmamış proteinlerle etkileşime girerken, karboksil (C) terminal ucu sitosolde bulunur ve serin-treonin kinaz bölgesi ile endoribonükleaz bölgesini içerir (Mori ve diğ., 1993; Sidrauski ve Walter, 1997). Tek bir transmembran bölgesi, luminal N-terminal algılama bölgesi ile sitoplazmik kinaz ve endoribonükleaz bölgelerini birbirine bağlar (Şekil 2.5). ScIre1'in aktivitesi ER lümeninde bulunan ScKar2 (BiP) şaperonuyla düzenlenir. Normal koşullar altında ScKar2, ScIre1'in N-terminal bölgesine bağlıdır, ama ER stresine yanıt olarak ayrılır (Bertolotti ve diğ., 2000; Okamura ve diğ., 2000). ScKar2'nin ScIre1'den ayrılarak katlanmamış proteinlere bağlanması ScIre1'lerin stres algılama çekirdeği bölgesinden (CSSR "core stress-sensing region") birbirlerine bağlanarak dimerizasyon oluşturmaya neden olur (Credle ve diğ., 2005; Oikawa ve diğ., 2007; Kimata ve diğ., 2007). *S. cerevisiae*'deki CSSR'nin kristal yapısı katlanmamış proteinleri yakalayabilecek oluk

oluşturabildiğini göstermektedir (Credle ve diğ., 2005). Katlanmamış proteinlerle olan bu etkileşim ScIre1'in aktivasyonu için gerekli olabilir (Gardner ve Walter, 2011).



Şekil 2.5: Ire1 protein yapısına ait diagram. SP: Sinyal peptidi, CSSR: stres algılama bölgesi, BiP bağlanma bölgesi, TM: transmembran segmenti, kinaz ve RNaz bölgesi bulunur (Hernández-Elvira ve diğ., 2018).

İlk olarak ScIre1, inositol yokluğunda büyüme için gerekli olduğu düşünülerek izole edildi (Nikawa ve Yamashita, 1992). Daha sonra ScIre1 bakımından yoksun olan hücrelerde ER stresi uyaranları varlığında hücre için ölümcül olduğu tespit edildi (Cox ve diğ., 1993). Ire1'den yoksun olan bir *S. cerevisiae* mutanını inositol için oksotrofiktir, çünkü inositol-1-fosfat sentaz (Ino1)'in yeterli ekspresyonunu yapamamaktadır (Nikawa ve Yamashita, 1992). İnositol yokluğunda yabancı ırk maya hücrelerinde UPR tetiklenir ve ScIre1'e bağlı bir şekilde Ino1 ekspresyonu yapılır (Cox ve diğ., 1997). Normal şartlar altında hücre büyümesi için ScIre1 gerekli olmasa da ER stresi uyaranları varlığında büyüme için zorunludur (Cox ve diğ., 1997; Chen, 2005).

Katlanmamış proteinlerin bağlanma bölgesindeki veya oligomerizasyonu etkileyen mutasyonlar ER stresi yanıtını da etkiler (Kimata ve diğ., 2007; Gardner ve Walter, 2011). Ayrıca kinaz ve RNaz aktivitelerini engelleyen mutasyonlar, ER stresinin artmasına neden olur (Shamu ve Walter, 1996; Van Anken ve diğ., 2014). Yapılan bu çalışmalarla, *S. cerevisiae*'de üç Ire1 aktivitesinin hepsinin, yani katlanmamış protein sensörünün, kinaz aktivitesinin ve RNaz aktivitesinin olduğunu gösterir. Yani UPR yolağında Ire1'in işlevi için zorunludur ve uygun ER stresi yanıtı için gereklidir.

ER stresine bağlı Ire1 dimerizasyonu sonrası meydana gelen yapısal değişiklik Ire1'in RNaz bölgesini aktifleştirir (Korennykh ve diğ., 2009). Daha sonra Ire1'in RNaz'ı özellikle belli mRNA'ları keser. Bunlar metazoanlarda XBP1 (X-kutusu bağlı protein 1), *S. cerevisiae*'de ise HAC1 (ATF/CREB1'in homoloğu) mRNA'sıdır (Cox ve Walter 1996; Yoshida ve diğ., 2001).

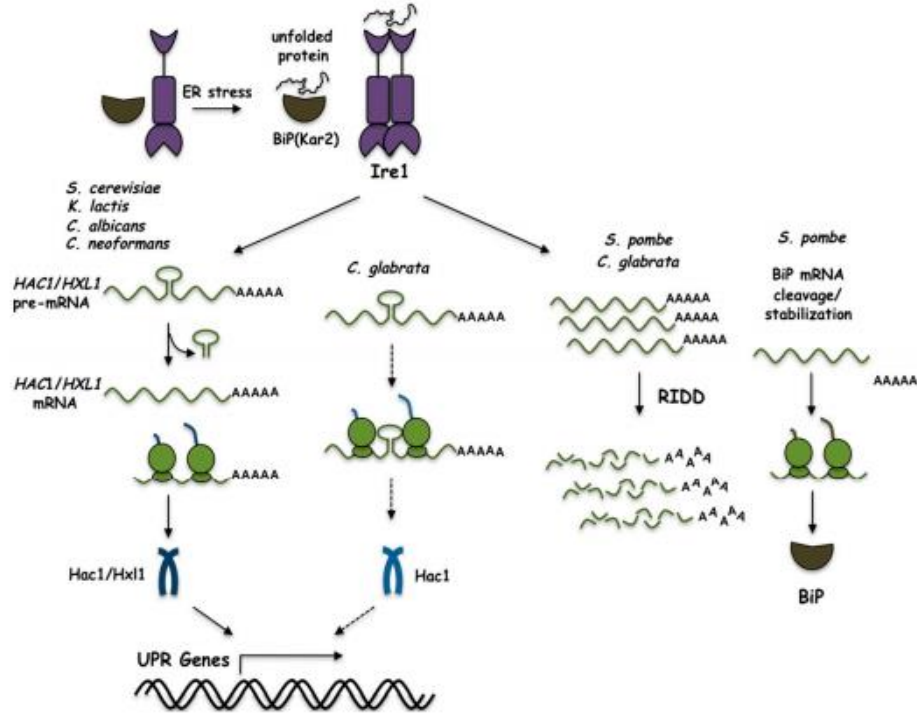
Kesilen mRNA parçalarının tRNA ligaz tarafından birleştirilerek oluşturduğu olgun mRNA, ER kalite kontrol bileşenlerini kodlayan genleri düzenleyen transkripsiyon faktörünü üretir (Sidrauski ve diğ., 1996; Travers ve diğ., 2000; Yoshida ve diğ., 2001).

ScIre1 aktif olduktan sonra, 238 amino asit içeren ve bazik lösün fermuar (bZIP “basic-leucine zipper”) ailesine ait olan transkripsiyon faktörü Hac1p’yi aktive eder. Hac1p’de 20 amino asitlik lösün fermuar motifi ve 21 amino asitlik DNA bağlanma bölgesi bulunur (Mori ve diğ., 1996). ER stresi varlığında, ScHac1 UPR hedef genlerinin promotörlerine katlanmamış protein cevabı element (UPRE) motifi olarak adlandırılan dizi aracılığıyla bağlanır (Mori ve diğ., 1996; Fordyce ve diğ., 2012). ScHac1’in uzun ve kısa UPR'lere farklı mekanizmalarla bağlandığı ve UPR gen transkripsiyonunun düzenlediği öne sürülmüştür (Fordyce ve diğ., 2012). DNA bağlanma bölgesindeki korunmuş asparajin ve lösün bakiyeleri palindromik veya semi-palindromik UPRE dizisi DNA hedef bölgesinin tanınması için esastır. Bu bakiyeler DNA'nın büyük oluşu ile doğrudan temas eder (Fujii ve diğ., 2000; Miller, 2009).

S. pombe, fisyon mayası, hücresel fizyolojinin farklı yönlerini analiz etmek için kullanılan model organizmadır. UPR ile ilişkili protein Ire1 *S. pombe*'de de korunmuştur (Wood ve diğ., 2002). Fakat *S. pombe*'de HAC1 bulunmamasına rağmen ER stresine karşı Ire1 önemli bir rol oynar (Kimmig ve diğ., 2012). *S. pombe* Ire1 (SpIre1)'i ScIre1 ile yapısal özellikleri bakımından benzerdir. Lümende bir bölgesi ve kinaz ile endoribonükleaz domeni içeren sitozolik bir kısmı vardır. SpIre1'in dizisi ScIre1 ile sadece %24'lük bir benzerlik gösterir (Hernández-Elvira ve diğ., 2018). SpIre1'de bulunan K682 (lizin) and N1014 (asparjin) bakiyeleri sırasıyla kinaz ve RNaz aktiviteleri için esastır (Mori ve diğ., 1993; Shamu ve Walter, 1996; Van Anken ve diğ., 2014). Fakat varsayılan RNA bağlanma bölgesindeki motifi oluşturan R (arjinin) bakiyesi diğer maya türlerinde iyi bir şekilde korunmuşken SpIre1'de bulunmamaktadır. Bu durum SpIre1'in spesifik bir RNA molekülüne bağlanmadığını göstermektedir (Goffin ve diğ., 2006; Van Anken ve diğ., 2014).

S. cerevisiae ve diğer maya türlerinin aksine, SpIre1 için spesifik bir substrat tanımlanmamıştır, bu da *S. pombe*'nin bir Hac1 ortologuna sahip olmadığını gösterir. *S. pombe*'de UPR, transkripsiyonel yeniden düzenleme aracılığıyla yapılmak yerine SpIre1 RNaz aktivitesiyle gerçekleşir. Bu işlem Ire1'e bağlı parçalanmanın düzenlenmesi (RIDD, “Regulated Ire1-Dependent Decay) olarak adlandırılır (Kimmig ve diğ., 2012; Şekil 2.6). SpIre1'in hedeflediği mRNA'larda UG/CU konsensüs dizisinin çevrelediği kesilme bölgesi bulunur (Hernández-

Elvira ve diğ., 2018). Bu kesilme bölgesi mRNA'nın kodlama dizisinin içindedir (Kimmig ve diğ., 2012). *SpIre1*, 5'-3' yönünde ekzoribonükleaz ve 3'-5' yönünde ekzozom ile mRNA'ların konsensüs bölgesinden keserek 5' ve 3' ucu açık mRNA fragmentleri oluşur (Hollien ve Weissman, 2006; Iqbal ve diğ., 2008). Ribozomlar 3' ucu kesilmiş mRNA ile karşılaşınca translasyon duraklatılır. Bu şekilde translokasyonun devam etmediği mRNA-ribozom kompleksinden no-go decay (NGD) yolağı ile mRNA'lar serbest kalır ve protein sentezi gerçekleşmez. (Doma ve Parker, 2006; Shoemaker ve Green, 2012; Tsuboi ve diğ., 2012). Böylece ER'deki protein yükü hafifletilir.



Şekil 2.6: *S. pombe* ve diğer maya türlerinde UPR yolağı (Hernández-Elvira ve diğ., 2018).

RIDD mekanizması tarafından düzenlenen mRNA'ların yaklaşık %31'i lipid metabolizmasında ve özellikle sterol metabolizmasında rol oynayan proteinleri kodlar (Kimmig ve diğ., 2012). Sterol sentezindeki azalmanın ER stresi ile ilişkili toksisiteyi nasıl düzenlediği bilinmemekle birlikte, sterol sentezindeki azalma ER'nin temel fonksiyonlarını yerine getirmeye devam

etmesi için önemli olduğu düşünülmektedir. ER stresi vesiküler taşınmayla sterolün çıkışını sınırlayarak uygun membran akışkanlığını korur (Kimmig ve diğ., 2012).

Diğer bir RIDD substratı Grp78 şaperonunun ortoloğu BİP1'i kodlayan mRNA'dır (Pineau ve diğ., 2009; Kimmig ve diğ., 2012). *SpIre1*, BİP1 mRNA'sını 3' ucundaki kodlanmayan bölgesinde bulunan UG/CU konsensüs dizinden kestiğinde poli-A kuyruğunun kaybına neden olur. Bu durum *SpBİP1* mRNA'sının parçalanması yerine translasyon etkinliğinin artmasına neden olur (Hernández-Elvira ve diğ., 2018). *S. pombe*'de *Bip1*, 663 amino asitten oluşan ve hücre canlılığı için gerekli bir proteindir. N-terminal ucunun yanında ATPaz bölgesi vardır (Bukau ve Horwich, 1998). ATPaz aktivitesi, ER membranından proteinlerin translokasyonu için gereklidir (Vogel ve diğ., 1990). Ayrıca ER stresi altında, *SpIre1*'den ayrılarak katlanmamış proteinlere bağlanır ve UPR yolağının başlamasına yol açar (Okamura ve diğ., 2000; Kimata ve diğ., 2003). Katlanmamış protein varlığı ile sentezi düzenlenen temel ve bol bulunan bir proteindir.

Ire1 gibi transmembran proteini olan PERK, UPR yolağında görevlidir. PERK'nin lümenal stres algılayıcı alanı yapısal ve işlevsel olarak *Ire1* ile benzerdir. ER stresine yanıt olarak trans-otofosforilasyona uğrayan sitosolik kinaz alanı içerir. Ancak *Ire1*'den farklı olarak PERK, ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 α (eIF2 α)'yı fosforile eder. EIF2 α 'nın fosforilasyonu, genel protein sentezinin azalması ve dolayısıyla ER'ye giren proteinlerin yükünün azalması ile sonuçlanır (Harding ve diğ., 1999). Ayrıca transkripsiyon faktörü ATF4'ün sentezi yapılır (Jackson ve diğ., 2010). ATF4, GADD34 (büyümeyi durdurma ve DNA hasarı uyarabilen 34 "growth arrest and DNA damage-inducible 34") ve CHOP (transkripsiyon faktörü C/EBP homolog protein) gibi UPR hedef genleri aktive eder (Harding ve diğ., 2000; Scheuner ve diğ., 2001). GADD34, eIF2 α 'yı fosforile eden protein fosfataz PP1C kompleksinin düzenleyici alt birimini kodlar ve böylece PERK yolağını etkisizleştirmek için negatif feedback olarak rol oynar (Novoa ve diğ., 2001). Transkripsiyon faktörü CHOP, apoptozda yer alan genleri aktive eder (Wang ve diğ., 1998; Zinszner ve diğ., 1998). Böylece PERK, ER stresine karşı hücrenin yaşam veya ölüm karar mekanizmasını destekler.

ATF6, ER stresine bağlı şaperonların ve katlanma enzimlerin sentezlenmesinden ve ERAD mekanizmasından sorumlu metazoan hücrelerinde bulunan UPR yolağı bileşenidir. (Adachi ve diğ., 2008; Bommiasamy ve diğ., 2009). *Ire1* ve PERK'den farklı olarak ATF6, karboksi-terminal stres algılayıcı bir lümen bölgesi ve bir amino-terminal bZip transkripsiyon faktörü

içeren transmembran proteinidir. ER stresine yanıtta ATF6, ER'den Golgi'ye geçiş yapar, burada amino terminal transkripsiyon faktörü alanını membrandan geçirmek için site-1 ve site-2 proteazları (S1P ve S2P) tarafından sırayla proteolize edilir (Haze ve diğ., 1999). Serbest kalan amino terminal bölgesi (ATF6-N), ER stres yanıt elemanına (ERSE) bağlandığı nukleusa gider ve UPR hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive eder (Yoshida et al. 1998).

2.3. ER STRESİNE BAĞLI GELİŞEN HÜCRE ÖLÜMÜ

Hücre içi ve hücre dışı çeşitli faktörler ER işlevini bozabilir. Bu faktörler ER'de yerleşik şaperonların kapasitesini aşan ER lümenindeki protein miktarının artması, uzun zincirli doymuş yağ asitlerine (SFA) maruz kalma, ER lümeninde kalsiyum seviyelerinde değişiklikler ve ER redoks dengesinde bozulması olabilir (Ron ve Walter, 2007; Parmar ve Schroder, 2012). Bu durumda ER stresi oluşur ve strese karşı hücrede UPR yolağı başlatılır (Ron ve Walter, 2011). UPR'nin aktivasyonu, protein katlaması için yeni bileşenler sentezleyerek ve ER'nin kendisini genişleterek ER stresini hafifletebilir (Cox ve diğ., 1997; Schuck ve diğ., 2009). Bu aktive edilmiş UPR ile hücrede öncelikli olarak ER'de yerleşik şaperonların, katlama enzimlerinin ve ERAD yolağı için görevli bileşenlerin üretimi için transkripsiyonel cevap oluşturulur (Trusina ve diğ., 2008). ER'deki protein yükü ve şaperon kapasitesi arasındaki dengenin tekrar sağlanması için bu cevap genellikle yeterli olur. Fakat uzun süreli devam eden ER stresi durumunda UPR, hücreyi sağkalım yanlısı bir durumdan ölüm yanlısı duruma taşıyan çeşitli sinyaller gönderir (Tabas ve Ron, 2011; Woehlbier ve Hetz, 2011). Bu durum memelilerde mitokondriyal hücre ölüm yolağını tetikleyen Bcl2 protein ailesinin üyelerinin transkripsiyonel ve translasyonel aktivasyonunu içeren apoptoz ile sona erer (Oakes ve diğ., 2003; Bassik ve diğ., 2004). Mayada ise apoptoz ve otofaji dahil olmak üzere programlanmış hücre ölümünü (PCD, “programmed cell death”) tetikleyebilir (Austriaco, 2012).

2.3.1. Apoptoz

Mayada apoptoz ilk kez AAA-ATPaz enzimini kodlayan CDC48 geninde mutasyon taşıyan hücrelerde tanımlanmıştır. Bu enzim hücre bölünmesinde, ERAD yolağında ve vesikül taşınmasında görevlidir (Madeo ve diğ., 1997). Apoptoz geçiren maya hücrelerinde DNA kırılması, kromatin yoğunlaşması, fosfatidilserin atılımı, reaktif oksijen türlerinin (ROT) birikimi, mitokondrinden sitokrom c salımı ve kaspaz aktivasyonu gibi karakteristik belirteçler görülür (Kerr, 2002; Severin ve diğ., 2008). Bu işlem maya popülasyonundan yaşlı ve sağlıklı

hücreleri çıkararak genç ve sağlıklı hücreler için besinin miktarının artmasına katkı sağlar (Fröhlich ve Madeo, 2000). Hücresel fonksiyonlardaki bozulmalar, H_2O_2 ve asetik asit gibi hücre içi ve dışındaki uyaranlar apoptoza neden olur (Madeo ve diğ., 1999; Ludovico ve diğ., 2001). Memelilerde bulunan apoptoz yolağından sorumlu Bax ve Bcl genleri mayada bulunmamasına rağmen apoptozun düzenlenmesinde AIF1, MCA1/YCA1/PCA1 ve NUC1/PNU1 gibi ortolog genler bulunmaktadır (Carmona-Gutierrez ve diğ., 2010).

Asetik asit (AA), mayada alkolik fermantasyonu sırasında kültür ortamında biriken ana alt ürünlerden biridir. *S. cerevisiae* asetati karbon kaynağı olarak kullanabilmesine rağmen, yüksek asetik asit konsantrasyonu, tüm apoptotik işaretlerin eşlik ettiği hücre ölümüne (AA-PCD, “Acetic Acid – Programmed Cell Death”) neden olur (Giannattasio ve diğ., 2013). Mayada, memeli hücrelerinde olduğu gibi, mitokondri AA-PCD'de birincil rol oynar. Asetik aside maruz kalan maya hücrelerinde mitokondriyal şişlik, membran depolarizasyonu, ROT üretimi, sitokrom oksidaz aktivitesinin azalması ve sitokrom c salınımı meydana gelir (Pereira ve diğ., 2008; Giannattasio ve diğ., 2013).

ER işlevinin bozulmasıyla oluşan ER stresine karşı homeostasi sağlanamazsa hücre ölümü gerçekleşir (Tablo 1). Mayada ER stresi üç UPR yolağından sadece İre1p tarafından algılanır (Sidrauski ve Walter, 1997). ER stresine bağlı hücre ölümüne (ER-SAD, “ER stress associated cell death”) inositol açlık, lipid toksisitesi ve N-glikosilasyon inhibisyonu neden olabilir (Austriaco, 2012).

Tablo 2.1: Memeli ve maya hücrelerinde ER ile ilişkili hücre ölümünün tetikleyicileri (Austriaco, 2012).

ER İşlevi	Organizma	Hücre Ölümünün Tetikleyicileri	İlgili ER Proteinleri
Protein translokasyonu ve katlanması	Memeli	Protein birikmesi İskemi reperfüzyonu β -merkaptoetanol (BME) Tunikamisin (TN) Dithiothreitol (DTT)	IRE1 α ATF6 PERK BI GRP78/Bip
	Maya	Isı şoku β -merkaptoetanol (BME) Tunikamisin (TN) Dithiothreitol (DTT)	Ire1p Bxi1p Kar2p/Bip
Lipit Sentezi	Memeli	Yüksek serbest yağ asitleri	IRE1 α ATF6 PERK
	Maya	Yüksek doymuş yağ asitleri İnositol açlık	Ire1p Cnx1p
Kalsiyum dengesi	Memeli	Thapsigargin Kalsiyum fazlalığı	PERK SERCA
	Maya	Kalsiyum açlığı	Pmr1p

Fizyon mayası *S. pombe*'de fosfolipid ve sinyal moleküllerinin öncüsü olan inositolden yoksun bırakıldığında apoptoz benzeri özellikler içeren hücre ölümü gerçekleşir (Guerin ve diğ., 2009). *S. pombe*'de tek kaspaz benzeri protein kodlayan gen *Pca1* (*S. cerevisiae*'de *Yca1*) veya UPR yolağından sorumlu gen *Irel*'deki delesyon inositol içermeyen besi ortamında hücrenin hayatta kalmasını arttırdığı ve böylece bu iki genin hücre ölüm yolağında yer aldığı öne sürülmüştür. Ayrıca ER şaperonlarından kalneksin proteinini kodlayan gen *Cnx1*'de inositol açlığa bağlı hücre ölümünde yer almaktadır (Guerin ve diğ., 2009).

Tomurcuklanan maya *S. cerevisiae* doymuş yağ asidi olan palmitat (C16:0) bulunan ortamda üretildiğinde ER stresi tetiklenir ve büyüme yavaşlayarak hücre ölümü meydana gelir (Pineau ve diğ., 2009). Palmitatın hücre kültürüne eklenmesiyle ER'nin genişlemesi, ER tabakasının plasma membranından ayrılması gibi elektron mikroskopunda gözlemlenebilen morfolojik değişimler oluşur. Hem UPR'nin indüklediği hem de lipid toksisitesiyle hücre ölüm 4-fenil bürirat moleküler şaperonunun eklenmesiyle ortadan kalkar. Bu durum lipid toksisitesiyle oluşan ER stresinin ER'deki protein katlanma kapasitesini aştığını gösterir. Memeli hücrelerinde lipid toksisitesinin apoptozu indüklediği bilinmektedir (Kharroubi ve diğ., 2004; Diakogiannaki ve diğ., 2008). Cunha ve diğ. (2008) yaptığı çalışmada palmitatın pankreatik

beta hücrelerinde IRE1A, PERK VE ATF6 yolaklarını aktive ederek apoptozu indüklediği gösterilmiştir.

ER lümenindeki oligosakkariltransferaz (OST) enziminin mutasyonu veya hücrelerin UDP-N-asetilglukozamin-1-P transferaz (Alg7p) enzimini bloke eden bir antibiyotik olan tunikamisin (TN) ile muamele edilmesi proteinlerin N-glikosilasyonuna engel olarak yabancı ırk *S. cerevisiae*'de apoptoz benzeri hücre ölümüne neden olur (Takatsuki ve diğ., 1971; Hauptmann ve diğ., 2006; Hauptmann ve Lehle, 2008). Ölen hücrelerde nukleusun yoğunlaşması, DNA'nın parçalanması ve fosfatidilserinin açığa çıkması gözlenir. N-glikosilasyondaki kusurlar hem kaspaz benzeri aktivitenin ortaya çıkmasına hem de ROT üretilmesine neden olur (Hauptmann ve diğ., 2006). Golgide yerleşik Kex1p proteaz enzimi de N-glikosilasyondaki kusurlara bağlı apoptoz benzeri hücre ölümünde rol oynar. Delesyonlu KEX1, tunikamisin içeren hücre kültüründe kaspaz benzeri aktivitenin ortaya çıkması ve ROT birikimi azalmıştır (Hauptmann ve Lehle, 2008).

Tunikamisinin, kalsiyuma bağımlı fosfataz ve kalsinörinin daha önce etkisiz hale getirilmediği sürece, yabancı ırk hücrelerde hücre ölümüne neden olmadığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Bonilla ve diğ., 2002; Bonilla ve Cunningham, 2003). Bu anlaşmazlığı çözmek için Dudgeon ve diğ., (2008), sadece tunikamisin içeren ortamlarda büyüme ile ilişkili hücre ölümünü analiz etmek için gelişmiş boyama yöntemleri kullanmıştır. Verilerine göre, tunikamisinin sadece düşük osmolit maya-pepton-dekstrozu (YPD "yeast-peptone-dextrose") besli ortamında yetiştirilen hücrelerde hücre ölümüne neden olabileceğini ama sentetik ortamda üretilen hücrelerde hücre ölümünün olmadığını gösterdi. Ölen hücrelerde DNA'nın parçalanması ve fosfatidilserin açığa çıkması gibi apoptoz belirteçleri bulunmamaktadır. Bu durum hücre ölümünün belirteçleri bakımından apoptoz olmadığı yönündedir (Dudgeon ve diğ., 2008). Yabancı ırk tomurcuklanan maya hücrelerinde tunikamisin, elektron taşıma zincirine (ETZ) bağımlı veya bağımsız olmak üzere iki farklı şekilde hücre ölümüne neden olur. Tunikamisine yanıt olarak hücre ölümünde apoptozla ilişkili faktörler Yca1p, Nuc1p, Nma111p ve Ste20p'in bulunmaması bu hücre ölümünün apoptoz olmadığını gösterir. Bunun yerine hücre ölümü işlemi iki Ca^{2+} /kalmodulin bağımlı protein kinazdan biri olan Cmk2p ve tomurcuklanan mayadaki ana ısı şoku şaperonlarından biri olan Hsp90p tarafından düzenlenmiştir (Dudgeon ve diğ., 2008). Bir diğer bulgu tunikamisinin maya hücrelerinin vakuolar membranlarını geçerek hücre ölümüne neden olduğu ve bu hücre ölümünün vakuolü asitleştiren V-ATPaz

içerdiği (Kim ve diğ., 2012). Vakuol membran geçirgenliğini içeren bu tunikamisin kaynaklı hücre ölümü, kalmodulin tarafından bloke edilebilir.

2.3.2. Otofaji

Otofaji, molekülleri ve organelleri vakuole veya lizozomlara ileterek sitoplazmik bileşenlere parçalanması ve geri dönüşümü için gerekli olan korunmuş bir yoldur. Sitoplazmik bileşenlerin rastgele (seçici olmayan otofaji) veya seçici olarak (seçici otofaji) çift membranlı bir vesikül içine alınmasıyla oluşan otofagosom, otofajinin morfolojik özelliğidir. Seçici otofaji, kümeleşmiş (aggregated) proteinleri uzaklaştırarak ve işlev bozukluğu olan veya hasarlı mitokondri (mitofaji), peroksizom (peroksifaji), lipid (lipofaji) ve ER'yi (ER-faji) parçalayacak hücre canlılığını korur (Falcone ve Mazzoni, 2016). Otofaji besin değişikliği ve açlık sırasında artar (Suzuki, 2013). Normal veya indükleyici koşullar altında otofagosomların boyutu ve sayısı otofajinin düzenlenmesinde belirleyicidir. Birçoğu ökaryotlarda korunmuş olarak bulunun 30'dan fazla otofajiyle ilişki protein (ATG "autophagy-related protein") mayada tanımlanmıştır (Falcone ve Mazzoni, 2016). Besin varlığında ATG genlerinin çoğu aktivatörlerin inhibe edilmesi veya otofaji baskılayıcıların aktivasyonu nedeniyle transkripsiyonel düzeyde baskılanır (Jin ve Klionsky, 2014).

Bunlar arasında ubikuitin benzeri protein Atg8 (insanlarda LC3 / GABARAP proteinleri olarak adlandırılır) merkezi bir rol oynar. Atg8, proteaz Atg4 ile işlenmesi dahil, E1-benzeri enzim Atg7, E2-benzeri enzim Atg3 ve E3-benzeri kompleks Atg12-Art5-Atg16 'nın aktivasyonu ile bir seri enzimatik reaksiyon aracılığı ile membran lipiti fosfatidiletanolamine (PE) bağlanır (Ichimura ve diğ., 2000, Hanada ve diğ., 2007). Atg8'in lipitlere bu kovalent bağlanmasına lipitleşme denir. Otofajik membranlardaki lipitlenmiş Atg8, otofagosom oluşumu için kritik öneme sahiptir (Kirisako ve diğ., 1999) ve aynı zamanda seçici otofaji reseptörleri için bir toplanma platformu görevi görür (Shintani ve diğ., 2002).

Metilotropik maya *Pichia pastoris*'te, Atg8 kaybı, Atg8 lipidasyonunda kusurlu iki mutant olan *atg7* ve *atg8-G116A*'da anormal vakuol morfolojisine neden oldu (Mukaiyama ve diğ., 2004; Tamura ve diğ., 2010). *S. pombe*, Atg8 kaybının ayrıca tübüler şekilli vakuollerin oluşumu dahil anormal vakuol morfolojilerine neden olduğu gösterilmiştir (Mikawa ve diğ., 2010).

ER stresi ve otofaji arasındaki doğrudan bağlantı disülfid bağ oluşumunu inhibe eden dithiothreitol veya N-glikosilasyonu inhibe eden tunikamisin gibi farklı ER stresi ajanlarıyla

muamele edilen *S. cerevisiae*'de keşfedildi (Hamasaki ve diğ., 2005; Yorimitsu ve diğ., 2006). ER stresine karşı yanıtta sentezlenen Hac1 transkripsiyon faktörü Atg5, 7, 8 ve 19 proteinlerinin üretimini sağlar (Bernales ve diğ., 2006). Böylece UPR'yi tetikleyen konsantrasyonlarda dithiothreitol ve tunikamisin, ATG genlerinin ekspresyonunu ve ayrıca Atg1 kinaz ve ATG'ye bağlı otofajinin aktivasyonunu tetikler (Bernales ve diğ., 2006; Yorimitsu ve diğ., 2006). Bunun yanında IRE1 ve HAC1, ER stresine yanıtta ATG genlerinin sentezlenmesi için elzem değildir (Travers ve diğ., 2000). ER stresi sırasında birikmiş proteinlerin otofagosomlar ile ortamdan uzaklaştırılması hücrenin hayatta kalmasına yardımcı olur. Yüksek konsantrasyonda tunikamisin varlığında *S. cerevisiae*'nin hayatta kalması için otofaji gereklidir. Bu durum, ER stresi ile başa çıkmada otofaji yanıtının sitoprotektif bir fonksiyona hizmet ettiğini gösterir. Ayrıca ER stresi sonrası genişleyen ER'nin normal boyutuna ulaşması için otofaji görev yapabilir (Bernales ve diğ., 2006).

Son yıllarda, ER'nin otofajik yıkımının, *S. cerevisiae*'de periferik ve nükleer ER'ye özgü otofajik reseptörlerle seçici olarak düzenlendiği açıklanmıştır. Buna göre, Atg39 nükleer, Atg40 ise periferik ER'de lokalize olarak otofagozom oluşumunu yönlendirmektedir ve hatta Atg39 aracılı otofagozom oluşumu ile nükleusun seçici otofajisi de ilişkilendirilmiştir (Mochida ve diğ., 2015). Bu noktada, otofagozom oluşumunda, Atg11 ve Atg8'in merkezi rol oynadığı çok yeni araştırmalarda ortaya çıkarılmıştır (Johansen ve Lamark, 2019; Zientara-Rytter ve Subramani, 2019; Nakatogawa, 2020).

2.4. HÜCRE İSKELETİ ORGANİZASYONU

Ökaryotik hücrelerde hücre iskeleti, sitoplazmaya yayılmış protein yapıdaki filamentlerden oluşur. Hücre iskeleti hücre şeklini korur, organel ve hücre içi bileşen trafiğini düzenler, hücrenin dış ortamla fiziksel ve biyokimyasal olarak iletişimini devamlı kılar, hücre bölünmesi ve hareketinde mekanik destek sağlar. Bu fonksiyonları gerçekleştirebilmek için birkaç farklı bileşen hücre iskeletinin yapısına katılır. Böylece hücre iskeleti yeniden düzenlenen dinamik bir yapıda bulunur (Cooper ve Hausman, 2006; Alberts ve diğ., 2013).

Hücre iskeleti farklı büyüklük ve protein içeriklerinden oluşan üç temel sınıftan oluşur. Bunlar mikrotübüller, aktin filamentleri ve ara filamentlerdir. Mikrotübüller yaklaşık 25 nm genişliğiyle en büyük filamenttir ve tübülün olarak adlandırılan proteinlerden oluşur. Tübülünün, α ve β tübülün alt birimleri heterodimer oluşturur ve daha sonra bu heterodimerler bir araya

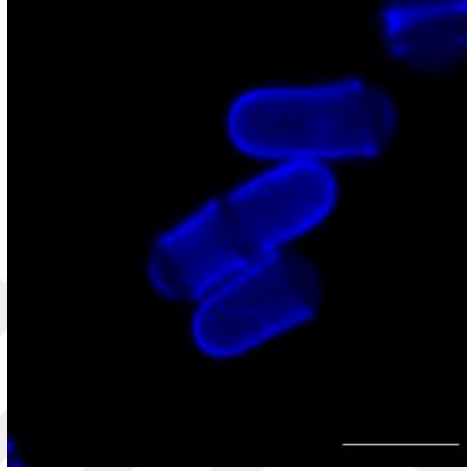
gelerek uzun içi boş silindirik yapıdaki mikrotübüller oluşur. Hem α hem de β tübüline GTP bağlanması polimerizasyona, GTP hidrolizi ise depolimerizasyona neden olarak mikrotübülün dinamik yapısını düzenler (Cooper, 2000). Mikrotübüller hücre bölünmesi sırasında kromozom ayrılması, hücre içi bileşenlerin taşınması, nükleus ve organellerin hareketi gibi birçok hücresel süreçte rol oynar (Martin, 2009; Piel ve Tran, 2009).

Aktin filamentleri büyüme ve hücre döngüsünde önemli bir rol oynar. *S. pombe*'de tek aktin geni act1 bulunur ve memeli iskelet kası aktini ile yaklaşık %90 oranında benzerdir (Mertins ve Gallwitz, 1987). Mikrotübüllerde olduğu gibi aktin filamentleri de polimerizasyona ve depolimerizasyona uğrayarak dinamik bir yapı oluşturur. Bunun için ATPaz aktivitesini kullanır (Takaine and Mabuchi, 2007). Aktin polimerleri ve bunların fonksiyonları çeşitli aktin-bağlama proteinleri (ABP, "actin-binding proteins") tarafından düzenlenir. ABP olarak Arp2/3 kompleksi, profilin, formin ve aktin-depolimerasyon faktörü, tropomiyozin ve aktinle ilişkili motor proteinleri (diğer adıyla miyozin) işlev görür (dos Remedios ve diğ., 2003; Pollard ve diğ., 2000). Aktin filamentlerinin organizasyonu aktin yamaları, aktin kabloları ve sitokinetik aktomiyozin halkasını (CAR, "cytokinetic actomyosin ring") içeren üç farklı aktin yapısından oluşur (Marks ve Hyams, 1985). Aktin yamaları büyüyen *S. pombe* hücrelerinin uçlarında lokalize olur ve aktin polimerizasyon bölgesidir (Pelham ve Chang, 2001). Ayrıca ABP ile birlikte endositoz bölgesini oluşturur (Kaksonen ve diğ., 2003). Hücre bölünmesinden sonra hücrenin eski ucunda görülür (Marks ve Hyams, 1985). İnterfaz sırasında aktin kabloları hücrenin boyunca uzanır ve genellikle aktin yamaları ile ilişkilidir (Kamasaki ve diğ., 2005). Tip V miyozin motor proteinleri Myo51 ve Myo52 yardımıyla aktin kablolarından hücre içi bileşenler taşınır (Motegi ve diğ., 2001). Mitoz sırasında ise aktin filamentleri hücrenin merkezinde yoğunlaşarak sitokinetik aktomiyozin halkasını oluşturur. Hücreyi daraltarak hücre bölünmesinden sorumludur. Sitokinez tamamlandığında ortadan kalkar (Takaine ve Mabuchi, 2007).

2.5. MODEL ORGANİZMA OLARAK *Schizosaccharomyces pombe*

Mantarların Ascomycetes sınıfına ait bir maya türü olan *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) ilk olarak Saare ve meslektaşları tarafından Doğu Afrika'da darı birasından izole edilmiştir. Daha sonra Paul Lindner tarafından saf bir kültür elde edilmiştir ve detaylı bir şekilde tanımlanmıştır. Tomurcuklanan mayadan ayırmak için Lindner, bu mayayı *Schizosaccharomyces* olarak isimlendirmiştir ve sonuna Svahili dilinde bira anlamına gelen

“pombe” eklenmiştir (Lindner, 1893). *S. pombe* uçlardan yuvarlaklaşan silindir şeklinde, yaklaşık boyu 7-14 μm ve eni 4 μm uzunluğunda tek hücreli ökaryotik bir organizmadır (Şekil 2.7). Hem eşeyli hem de eşeysiz üreme yoluyla çoğalabilirler. Eşeysiz olarak ortadan ikiye bölünerek çoğaldığından fizyon mayası (“fission yeast”) olarak da adlandırılır (Mitchison, 1990).



Şekil 2.7: *S. pombe* yabani ırka ait mikrograf. Bar 5 μm 'dir.

Fizyon mayasının minimal ve kompleks besi ortamında 36°C–25°C’da 2-4 saat üreme süresiyle ve G1, S, G2 ve mitoz fazlarından oluşan hızlı bir yaşam çevrimi vardır (Petersen ve Russell, 2016). Besi ortamındaki hücreler, besinler sınırlanıncaya kadar mitotik hücre döngüsünü sürdürür ve sonra bölünmenin durmasıyla sabit faza girer (Hagal ve diğ., 2016). Yaşam çevriminde haploid veya diploid olarak bulunabilir. Azot açlığında hücreler yaşam çevriminin G1 fazında kalır ve zıt eşey tipine [h^- (972), h^+ (975)] sahip haploid hücreler nücleer füzyona uğrayarak diploid zigot oluşturur. Bu zigot S fazını takiben iki ardışık mayoz bölünme geçirerek dört tane haploid spor oluşturur (Yamashita ve diğ., 2016). Besin koşulları normalleştiğinde bu sporlar mitotik hücre döngüsüne girer ve çoğalmaya devam eder. Diploid *S. pombe* hücresi azot açlığı bulunmayan besi ortamında çoğalmayı diploid halde sürdürür. Böylece *S. pombe* hem haploid hem de diploid olarak çalışılabilen bir organizmadır (Hayles ve Nurse, 2018).

S. pombe, genom dizilemesi tamamlanmış 4. ökaryottur. Toplam genom boyutu 12.57 Mb olup 5118 protein kodlayan gen bulunur ve bu genlerin %67’si insanlarda korunmuştur (Wood ve

diğ., 2002). *S. pombe* genomunda kromozom I, II ve III olmak üzere 3 tane kromozom bulunur ve bunların boyutları sırasıyla 5.6, 4.8 ve 3.6 Mb'dır (Robinow, 1977; Hiraoka ve diğ., 1984; Petrova ve diğ., 2013). *S. pombe*'deki sentromerler yüksek ökaryotlardaki gibi birçok tekrarlayan dizi içerir. Kromozom I, II ve III'deki sentromerler sırasıyla ~35 kb, ~65 kb ve ~110 kb uzunluğundadır ve bu üç kromozom arasında ~%48 benzerlik oranına sahip merkez çekirdeğini (CEN "central core") içerir. CEN bölgeleri tekrarlanan dizilerden oluşur ((Niwa ve diğ., 1989; Wood ve diğ., 2002). Telomerik DNA ~300 baz çifti uzunluğundadır ve korunmuş TTAC(A)GG(G1-4) dizi tekrarından oluşur (Nandakumar ve Cech, 2013). Fizyon mayası genlerinin yaklaşık %50'sinde en az bir intron bölgesi vardır. Toplamda 5300 intron, 2510 protein kodlayan gen içinde bulunur (<http://www.pombase.org/status/statistics>).

Ökaryot olarak *S. pombe*, organel biyosentezi ve hücre iskeleti organizasyonu gibi insanda korunmuş olan süreçleri incelemek için model organizma olarak kullanılır. Ayrıca transkripsiyon, translasyon ve DNA replikasyonu gibi mekanizmaları araştırmak için de kullanılır (Hoffman ve diğ., 2015). Moleküler genetik çalışmaları için haploid maya suşu istenen fenotipi oluşturan mutant alellerin izlenmesinde kullanışlıdır. Bir genin mutant alellerinin çoğu, fonksiyonunun azalması veya kaybedilmesiyle yabani tip allelede resesif olacağından, bunlar bir diploid suşunda tespit edilemez, ancak bir haploitte kolayca gözlenir. Diploid maya suşu ise mutant bir alelin kalıtımının baskın mı çekinik mi gerçekleştiğinin belirlenmesinde yardımcı olur. Kromozomlarının az sayıda ve büyük olması, karmaşık olmayan replikasyon orjininin bulunması, gen anlatımının düzenlenmesinde epigenetik mekanizmaların bulunması, hücre döngüsünün kontrolü, DNA tamiri ve rekombinasyon gibi özellikleri bakımından memelilere benzerlik gösterir (Wixon, 2002; Forsburg, 2005). Bu nedenle memelilerdeki biyolojik sistemlerin aydınlatılmasında *S. pombe* sıklıkla kullanılmaktadır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN ORGANİZMALAR VE BESİ ORTAMLARI

3.1.1. Organizmalar

Bu çalışmada kullanılan Fungi aleminin Ascomycetes sınıfında yer alan tek hücreli ökaryotik bir organizma olan *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) Linder liquifaciens maya türüne ait ırklar Tablo 3.1.'de genotipik ve fenotipik özellikleri ile listelendi. Çalışmada kullanılan *S. pombe* yabani ırkı İ.Ü Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonundan, *S. pombe* mutant ırkları ticari olarak BIONEER firmasından sağlandı. FY29340 ırkı (Matsuhara ve Yamamoto, 2016) ise Hızlan Hıncal AĞUŞ (Yeni Yüzyıl Üniversitesi)'un hediyesidir.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan ırkların listesi.

İrklar	Genotipleri	Özellikleri
<i>S. pombe</i>	972h ⁻	Yabani ırk
ED666	<i>ade6-M210 ura4-D18 leu1-32</i>	Fosforibosilaminoimidazol karboksilaz, orotidin 5'-fosfat dekarboksilaz, 3-izopropilmalat dehidrojenaz enzimlerini şifreleyen gen delesyonlu
<i>ire1Δ</i>	<i>h⁺ ire1::kanMX6 ade6-M210 ura4- D18 leu1-32</i>	Serin/treonin protein kinazı şifreleyen gen delesyonlu
<i>gpt1Δ</i>	<i>h⁺ gpt1::kanMX6 ade6-M210 ura4- D18 leu1-32</i>	UDP-glukoz-glikoprotein glukosiltransferaz enziminin şifreleyen gen delesyonlu
<i>atg8Δ</i>	<i>h⁺ atg8::kanMX6 ade6-M210 ura4- D18 leu1-32</i>	Otofaji ile ilişkili protein 8'i şifreleyen gen delesyonlu
<i>atg15Δ</i>	<i>h⁺ atg15::kanMX6 ade6-M210 ura4- D18 leu1-32</i>	Otofaji ile ilişkili protein 15'i şifreleyen gen delesyonlu
<i>trs85Δ</i>	<i>h⁺ trs85::kanMX6 ade6-M210 ura4- D18 leu1-32</i>	TRAPP kompleksi alt birim Trs85b'i şifreleyen gen delesyonlu
<i>aif1Δ</i>	<i>h⁺ aif1::kanMX6 ade6-M210 ura4- D18 leu1-32</i>	Apoptoz indükleyici faktör 1'i şifreleyen gen delesyonlu
<i>prz1Δ</i>	<i>h⁺ prz1::kanMX6 ade6-M210 ura4- D18 leu1-32</i>	Kalsinörine duyarlı transkripsiyon faktörü 1'i şifreleyen gen delesyonlu
<i>myo51Δ</i>	<i>h⁺ myo51::kanMX6 ade6-M210 ura4- D18 leu1-32</i>	Miyozin tip 5'i şifreleyen gen delesyonlu

Tablo 3.1 (devamı): Çalışmada kullanılan ırkların listesi.

<i>myo52Δ</i>	<i>h⁺ myo52::kanMX6 ade6-M210</i>	Miyozin tip 5'i şifreleyen gen delesyonlu
	<i>ura4- D18 leu1-32</i>	
FY29340	<i>h⁻ lys1+::Pnmt41-GFP-atg8+</i>	GFP ile işaretlenmiş atg8 proteini

3.1.2. Besi Ortamları

Çalışmada kullanılan organizmaların üretiminde kullanılan besiy ortamları Tablo 3.2'de verilmiştir. Tüm besiy ortamı içerikleri distile su ile çözülerek hazırlandı ve otoklavda 121°C'da 1 atmosfer basınçta 15 dakika steril edildi. Besiy ortamları sterilasyon sonrası cam tüplere dökülerek eğri besiy ortamları ve petri kaplarına dökülerek katı besiy ortamları hazırlandı. Sıvı besiy ortamları ise steril cam erlenlerde muhafaza edildi.

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan besiy ortamları.

Besiy Ortamının Adı	İçeriği	Derişimi
Maya özütü sıvı besiy ortamı (YEL)	Maya özütü Glukoz	5 g/L 30 g/L
Maya özütü katı besiy ortamı (YEA)	Maya özütü Glukoz Agar	5 g/L 30 g/L 20 g/L
Zenginleştirilmiş Maya özütü besiy ortamı (YES)	Maya özütü Glukoz Adenin Urasil Lösin Lizin Histidin H ₂ PO ₄	5 g/L 30 g/L 50 mg/L 50 mg/L 50 mg/L 50 mg/L 50 mg/L 6,5 mL/L
Minimal sıvı besiy ortamı (MML)	A2* 3a* 3b* Glukoz Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	100 mL/L 1 mL/L 1 mL/L 10 g/L 1 g/L
Minimal katı besiy ortamı (MMA)	A2* 3a* 3b* Glukoz Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O Agar	100 mL/L 1 mL/L 1 mL/L 10 g/L 1 g/L 20 g/mL

*Çözeltilerin içerikleri Tablo 3.3'te verildi.

Tablo 3.3: MML ve MMA besi ortamlarında kullanılan çözeltiler.

Çözeltilerin Adı	İçeriği	Derişimi
A1	H ₃ BO ₄	50 mg
	CuSO ₄ .5H ₂ O	4 mg
	KI	10 mg
	FeCl ₃ .6H ₂ O	20 mg
	MnSO ₄ .4H ₂ O	53 mg
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	19,5 mg
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	40 mg
A2	KH ₂ PO ₄	1 g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
	NaCl	0,1 g
	CaCl ₂ .6H ₂ O	0,15 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
	Stok A1	1 mL
3a	Kalsiyum pantotenat	100 mg
	Nikotinik asit	1 g
	Mezoinositol	1 g
3b	Biotin	1 mg
	%50 etanol	100 mL

S. pombe yabani ırkı YEL ve YEA besi ortamında, *S. pombe* ED666 mutant ırkları adenin, urasil ve lösün metabolitleri bakımından oksotrof olduğu için YES besi ortamında, FY29340 ırkı ise nmt41 promotörünün tiaminli ortamda anlatım yapmamasından dolayı MML ve MMA besi ortamında üretildi. Ayrıca mutant ırkların genotip kontrolünü yapmak için MMA besi ortamına son derişimi 50 mg/L olacak şekilde adenin, urasil, lösün metabolitleri eklenerek kullanıldı.

3.2. ORGANİZMALARIN ÜRETİMİ VE SAKLANMASI

Çalışmada kullanılan organizmaların üretimi ve saklanması Gutz ve diğ. (1974) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. *S. pombe* yabani ırkı silika jel içerisinde 4°C’da saklanan stoklardan alınarak YEL besi ortamında, *S. pombe* mutant ırkları ise %30 gliserol içerisinde -80°C’da saklanan stoklardan alınarak YES besi ortamında 30°C’da 180 devir/dakika çalkalamalı etüvde 3 gün boyunca üremeye bırakıldı. Üreyen hücreler alt kültür yapıldıktan sonra azaltma ekim ile katı besi ortamına ekilerek tek koloniler elde edildi. Rasgele seçilen yabani ırka ait koloni YEA besi ortamına, mutant ırka ait koloniler ise YES besi ortamına ekildi ve 30°C’da 2 gün üretildi. Elde edilen kültürler çalışma boyunca 4°C’da saklandı.

3.3 GENOTİP KONTROLÜ

S. pombe ED666 mutant ırklarının uygun besi ortamında 2 gün boyunca üreyen kültürlerinden azaltma yöntemiyle tek koloni elde etmek için YEA besi ortamı içeren petri kaplarına ekimi yapıldı. Kolonilerin oksotrofluk kontrolünün yapılması için seçici besi ortamları hazırlandı. Bunun için MMA besi ortamı steril edildikten sonra son derişimi 50 mg/L olacak şekilde adenin, urasil ve lösin metabolitleri farklı kombinasyonlarla (MMA+AL, MMA+LU, MMA+AU, MMA+AUL) eklendi. Tek pertilerde üreyen tek kolonilerden rasgele seçilen birkaçı hazırlanan seçici besi ortamına ekildi ve 2 gün 30 C'da inkübe edildi. Seçici besi ortamlarındaki üremeleri karşılaştırılarak istenilen genotipe sahip olduğu doğrulan koloniler eğri YEA besi ortamına ekilerek 2 günlük kültürler elde edildi ve çalışma boyunca +4 C'da saklandı.

3.4. *S. pombe* IRKLARINDA ÜREMENİN İZLENMESİ

 remeleri izlenecek *S. pombe* ırklarına ait hücreler öncelikle eğri YEA besi ortamında 2 gün 30 C'da inkübe edilerek  remeye bırakıldı. Kültürdeki hücreler 5 mL steril distile su ile süspanse edilerek toplandı ve daha sonra hücrelerin sayımı için 1000 kat seyreltildi. Malassez Lamı (0,0025 mm², Superior, Marienfeld) kullanılarak hücreler sayıldı. Yabani ırk YEL, mutant ırklar ise YES besi ortamına 10⁶ hücre/mL olacak şekilde ekim yapıldı. Hazırlanan kültürler çalkalayıcı etüvde 180 devir/dakika 30 C'da  remeye bırakıldı. Hücrelerin  remesindeki artış 2 saatte bir alınan örneklerin spektrometre cihazında (EON, Biotek Instruments Inc.) 600 nm dalga boyundaki optik yoğunluğunun (OD)  l  lmesiyle belirlendi.  l  m verilerine göre her bir ırk için ayrı grafik çizildi. Tüm deney düzeneği iki kere tekrarlandı.

OD değerlerini hücre/mL cinsine çevirmek için mililitresindeki hücre sayısı bilenen her bir ırka ait kültürden sulandırım serileri hazırlanarak OD₆₀₀ değeri ölçüldü ve standart grafikleri oluşturuldu. Standart grafikten yararlanılarak zamana bağlı hücre sayısı artış grafiği hazırlandı. Denklem 3.1 kullanılarak hücrelerin kaç bölünme geçirdiğini belirten jenerasyon sayısı (n) ve hücre sayısının iki katına çıkması için gerekli süreyi belirten jenerasyon süresi (S_t) hesaplandı (Boyd, 1984; Moat ve Foster, 1988).

$$\text{Jenerasyon Sayısı (n): } \frac{\log_{10} N_2 - \log_{10} N_1}{\log_{10} 2} \qquad \text{Jenerasyon Süresi (S_t): } \frac{T_2 - T_1}{n} \qquad (3.1)$$

N1: Kültürdeki üremenin başlangıcındaki hücre sayısı

T1: Logaritmik üremenin başlama zamanı

N2: Logaritmik üreme sonundaki hücre sayısı

T2: Logaritmik üremenin bitiş zamanı

3.5. ENDOPLAZMİK RETİKULUM (ER) STRESİNİN UYGULANMASI

3.5.1. Deney ve Kontrol Gruplarının Hazırlanması

Endoplazmik retikulum stresi uygulanacak *S. pombe* yabani ırkı eğri YEA besi ortamında 2 gün 30°C'da üretildi. Kültürden taze YEL besi ortamına 10⁶ hücre/mL olacak şekilde ekim yapıldı ve çalkalamalı etüvde 180 devir/dakika 30°C'da inkübe edildi. Logaritmik fazın ortasına (15. saat) kadar üretilen hücre kültürleri ikiye ayrılarak deney ve kontrol grupları oluşturuldu. Deney gruplarına tunikamisin (Sigma) ajanı 1 µg/mL ve 5 µg/mL olmak üzere iki farklı konsantrasyonda eklenerek 1, 4 ve 24 saat uygulandı (Özarabacı, 2019). Ek olarak, Apoptozu indüklediği bilinen 5 mM arsenik asit aynı ırkın 15 saatlik taze kültürüne (logaritmik fazın ortası) eklenerek 4 saat uygulandı (Agus ve diğ., 2018). Bu koşul, Apoptoz Pozitif Kontrol (APK) olarak adlandırıldı. Tüm gruplar çalkalamalı etüvde 180 devir/dakika 30°C'da inkübe edildi. Hem deney grubundan hem de kontrol grubundan örnek alınıp 5000 xg'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü ve taze besi ortamına alınıp aynı santrifüj değeri kullanılarak yıkandı.

S. pombe ED666 mutant ırkları YES besi ortamında 2 gün 30°C'da üretildi. Kültürden taze YES besi ortamına 10⁶ hücre/mL olacak şekilde ekim yapıldı ve çalkalamalı etüvde 180 devir/dakika 30°C'da inkübe edildi. Logaritmik faza kadar üreyen yaklaşık 10⁷ hücre/mL kültür deney ve kontrol gruplarını oluşturmak üzere ikiye ayrıldı. Deney gruplarına 1 µg/mL tunikamisin eklenerek 1, 4 ve 24 saat hücre kültürleri çalkalamalı etüvde 180 devir/dakika 30°C'da inkübe edildi. Hem deney grubundan hem de kontrol grubundan tunikamisinin eklenmesinden sonraki 1., 4. ve 24. saatte örnek alınıp 5000 xg'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü ve taze besi ortamına alınıp aynı santrifüj değeri kullanılarak yıkandı.

S. pombe FY29340 ırkı ise MMA besi ortamında 2 gün 30°C'da üretilen hücrelerden 10⁶ hücre/mL olacak şekilde taze MML besi ortamına ekimi yapıldı ve çalkalamalı etüvde 180 devir/dakika 30°C'da inkübe edildi. Logaritmik faza kadar üreyen yaklaşık 10⁷ hücre/mL kültür

deney ve kontrol gruplarını oluşturmak üzere ikiye ayrıldı. Deney gruplarına 1 µg/mL ve 5 µg/mL olmak üzere farklı derişimde tunikamisin eklenerek ER stresi oluşturuldu. Süreç diğer ırklardaki gibi tekrarlandı.

3.5.2. Endoplazmik Retikulum Stresinin Canlılık Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

ER stresinin canlılık üzerindeki etkisinin belirlenmesi için öncelikle Bölüm 3.5.1’de anlatıldığı gibi hazırlanan deney ve kontrol guruplarına ait hücrelerden alınan örnekler steril besi ortamı ile 5000 xg’de 5 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Sonra steril distile su ile 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 olacak şekilde 10 kat seyreltildi. Hazırlanan *S. pombe* yabancı ırka ait hücre örnekleri YEA besi ortamı, *S. pombe* ED666 mutant ırka ait hücre örnekler agar (20 g/L) katkılı katı YES besi ortamı, *S. pombe* FY29340 ırkı ise MMA besi ortamı bulunan petri kaplarına ekimi (spot ekim) yapıldı. Tüm petriler 30°C’da 2 gün inkübe edildi. Çalışma tüm ırklarda en az üç kere tekrarlandı.

3.6. HÜCREİÇİ OKSİDASYON DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ

S. pombe yabancı ve ED666 mutant ırklarında hücreiçi oksidasyon düzeyinin belirlenmesi için reaktif oksijen türlerinin (ROT) indikatörü olan karboksifluoresin diasetat (H_2DCFDA) kullanıldı. H_2DCFDA hücreye pasif difüzyon ile girer ve hücre içindeki ROT varlığında oksidasyona uğrayarak diklorofluoresine (DCF) dönüşür (Wu ve diğ., 2011). Eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 490 ve 524 nm’de DCF flouresans ışımaya verir. Böylece spektrofloreometre veya floresans mikroskopunda DCF’nin tespiti yapılarak hücreiçi oksidasyon düzeyi belirlenir. Bu amaçla Bölüm 3.5.1’de anlatıldığı gibi ER stresi uygulanmış deney ve uygulanmamış kontrol grupları oluşturuldu ve stres uygulandıktan sonra 1., 4. ve 24. saatte alınan 1 mL örnek steril besi ortamı ile 5000 xg’de 5 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Üst sıvı atıldıktan sonra steril besi ortamı ile süspanse edildi. Örnekler 1,5 mL’lik santrifüj tüplerine alınıp son derişimi 10 µM olacak şekilde karboksifluoresin diasetat (H_2DCFDA) çözeltisi eklendi ve çalkalamalı etüvde 180 devir/dakika 30°C’da 1 saat bekletildi. Bu süre sonunda örnekler steril distile suyla 5000 xg’de 5 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Üst sıvı atıldıktan sonra 1 M fosfat tamponunda (PBS) süspanse edilen örnekler spektrofloreometre (Shimadzu, RF-1501) cihazında serbest radikallerin etkisiyle oluşan diklorofluoresinin (DCF) yaydığı flouresans ölçüldü. Ölçülen değerler kontrol grubu için ROT miktarı %100 kabul

edilerek, deney grubunun ROT miktarı kontrole kıyasla % olarak hesaplandı. Deney 3 kez tekrar edilip değerlerin ortalaması alınarak grafik oluşturuldu.

3.7. MİKROSKOBİK İNCELEME

ER stresinin hücresel etkilerinin belirlenmesi için öncelikle Bölüm 3.5.1’de anlatıldığı gibi hazırlanan *S. pombe* hücrelerinde çeşitli floresan boyalar kullanıldı ve konfokal mikroskopunda (Leica TCS SP8) görüntülendi. *S. pombe* yabancı ırkına ait 1, 4 ve 24 saatlik kontrol ve deney grubu hücreleri boyama işlemine geçmeden önce, kullanılan tüm boyalar için ortan olan ön hazırlık (hücrelerin fiksasyonu) işleminden geçirildi. Kullanılan çözeltiler Tablo 3.4’te verildi. Bu amaçla, %1 paraformaldehid (pH 7,4) hücrelere eklenip oda sıcaklığında 30 dakika bırakıldı ve 5000 xg’de 5 dakika 4°C’da santrifüjlenerek çöktürüldü. Fikse edilen hücreler, aynı santrifüj değerinde fosfat tamponu (PBS “Phosphate Buffered Saline”, 1 M) ile yıkandı ve fosfat tamponu içinde saklandı.

Tablo 3.4: Mikroskopik inceleme için kullanılan çözeltilerin listesi.

Çözeltinin Adı	İçeriği	Derişimi
Fosfat Tamponu (PBS)	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ NaCl	55 g/L 13.5 g/L 117 g/L
Zymolizaz Enzimi Çalışma Tamponu	Potasyum fosfat β -merkapto etanol	50 mM 10 mM
“mounting media”	<i>p</i> -fenilenediamin PBS	10 mg/mL 9 mL
PM Tamponu	K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄	49.7 mM 50,3 mM 0.5 mM

3.7.1. Apoptozun Belirlenmesi

Fikse edilen hücrelerde sferoplast oluşumu için, zymolizaz enzimi (Zymo Research, 5 U/ μ L) çalışma tamponu ile muamele edilip 37°C’da tutuldu. Fosfat tamponu ile 3000 xg’de 3 dakika 4°C’da santrifüjlenerek yıkandıktan sonra saklandı. Hücrelerin apoptoz düzeyinin incelenmesi DNA fragmentlerinin açık uçlarının boyanması temeline dayanan TUNEL (Terminal dUTP kırık ucunun işaretlenmesi, “Terminal dUTP Nick-End Labeling”) deneyi ile yapıldı. Bunun için ticari bir kit “ApopTag® Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit S7111”

(Millipore, Billerica, MA) kullanıldı. Kitin temel çalışma prensibi, DNA zincirinin açık 3'-OH ucuna, terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi tarafından "digoxigenin" işaretli nükleotitlerin rastgele eklenmesi ve eklenen nükleotitlere işaretli antikorların ("Anti-Digoxigenin Fluorescein") bağlanmasıdır. Bu şekilde işaretlenen DNA fragmentleri izlenir. TUNEL deneyi için üretici firmanın önerdiği talimatlar uygulandı. Bunun için, 1 mL hücre süspansiyonu iki defa PBS tamponu ile yıkandıktan sonra 50 µL örnek poli L-lizin kaplı lam üzerinde kurutuldu. Lam -20°C'da etanol-asetik asit (2:1 v/v) içerisinde 5 dakika bekletilip iki kez PBS ile 5 dakika yıkandı. Örneklerin üzerine 15 µL "Equilibration Buffer" eklenip 10 saniye boyunca oda sıcaklığında tutuldu. Daha sonra 11 µL terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi eklenip nemli ortamda 1 saat 37°C'da inkübe edildi. "Stop/Wash Buffer" içinde 10 dakika tutulan örnekler üç kere PBS ile 1 dakika yıkandı. Boyama için 13 µL "Anti-Digoxigenin Fluorecein" eklenip karanlık ve nemli ortamda 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra dört kere PBS ile 2 dakika yıkandı. Nükleer DNA'nın belirlenmesi için son konsantrasyonu 1 µg/mL olan DAPI (diamidino-2-fenilindol), "mounting media" ile karıştırılarak örnek üzerine eklendi ve lamel ile kapatılıp konfokal mikroskopunda (Leica TCS SP8), 480-490 nm dalga boyunda görüntü alındı. Alınan görüntüler daha sonra Leica Application Suite X programında 5x büyütme yapılarak düzeltildi.

3.7.2. Aktin İskeletinin Boyanması

S. pombe yabani ırkında aktin iskeletinin incelenmesi ise "Alexa Flour 488-Phalloidin" (İnvitrogen) boyası ile gerçekleştirildi. Bu amaçla, fıkse edilen 1 mL hücre süspansiyonu iki defa PM tamponu ile 5500 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldıktan sonra 500 µL PM tamponu içinde çözdürüldükten sonra son konsantrasyonu 5 µg/mL "calcoflour" (Sigma) ve 1 µg/mL "Phalloidin" eklenip 1 saat oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 50 µL örnek son konsantrasyonu 0,1 mg/mL olan concavalin-A (Sigma) ile kaplanmış lama damlatıldı. Son konsantrasyonu 1 µg/mL olan DAPI (diamidino-2-fenilindol) "mounting media" ile karıştırılarak örnek üzerine eklendi ve lamel ile kapatılıp konfokal mikroskopunda (Leica TCS SP8), 480-490 nm dalga boyunda görüntü alındı. Alınan görüntüler daha sonra Leica Application Suite X programında 5x büyütme yapılarak düzeltildi.

3.7.3. Otofajinin Belirlenmesi

Otofajinin belirlenmesi için FY29340 ırkı kullanıldı. Bu ırkta, otofaji yolağında otofagozomların oluşmasında görevli proteinlerden biri olan Atg8 ile yeşil floresan proteini (GFP “green flourescent protein”) birleşmiş halde bulunan GFP-atg8 hücrelerinde otofaji oluşursa floresan ışık altında yeşil renk ile otofagozomlar belirlenir (Matsuhara ve Yamamoto, 2016). Hazırlanan kontrol ve deney grubu hücreleri son konsantrasyonu 0,1 mg/mL olan concavalin-A (Sigma) ile kaplanmış lama damlatıldı. Örneklerin üzerine “mounting media” konuldu ve lamel ile kapatıldı. Konfokal mikroskobunda (Leica TCS SP8), 480-490 nm dalga boyunda görüntü alındı. Alınan görüntüler daha sonra Leica Application Suite X programında 5x büyütme yapılarak düzeltildi.

4. BULGULAR

4.1. ENDOPLAZMİK RETİKULUM (ER) STRESİNİN CANLILIK ÜZERİNDE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

S. pombe'de Endoplazmik Retikulum (ER) stresinin canlılık üzerindeki etkisinin belirlenmesinde, spot analizi yöntemi kullanıldı. Bunun için Bölüm 3.5.2'de anlatıldığı gibi, logaritmik fazın ortasına kadar üretilen yabancı ırka (972h⁻) ve FY29340 ırkına ait hücrelere 1, 4 ve 24 saat tunikamisin (1 ve 5 µg/mL) uygulandıktan sonra, tunikamisin uygulanmış (deney) ve uygulanmamış (kontrol) gruplardan alınan örneklerin katı besi ortamına spot ekimleri yapıldı. Ayrıca apoptoz pozitif kontrol 5 mM arsenik ile 4 saat inkübe edildi ve katı besi ortamına spot ekimi yapıldı.

S. pombe yabancı ırkı için spot analizine göre 1 µg/mL tunikamisinin 1 saatlik uygulama sonucunda hücre canlılığına öldürücü etkisi olmadığı, ancak 4 ve 24 saat uygulandığı zaman hücre canlılığı üzerinde öldürücü etkisi olduğu saptandı. Tunikamisin dozunun 5 µg/mL ye yükseltilmesinin ise hücre canlılığını daha da düşürdüğü gözlemlendi (Şekil 4.1). FY29340 ırkı ise yabancı ırka benzer profil sergilediği gözlemlendi. Tunikamisinin doz ve uygulama süresi arttıkça hücre canlılığını azalttığı belirlendi.

Özarabacı (2019) tarafından *S. pombe* 972h⁻ ırkında yapılan yüksek lisans çalışmasında, 1 µg/mL tunikamisinin 1 saatlik uygulama sonucunda hücre içi oksidasyon düzeyini 6 kat, 4 ve 24 saatlik uygulamalarda ise yaklaşık 3.000 kat arttırdığı rapor edilmiştir. Bu çalışmada da bu veriler dikkate alındı.

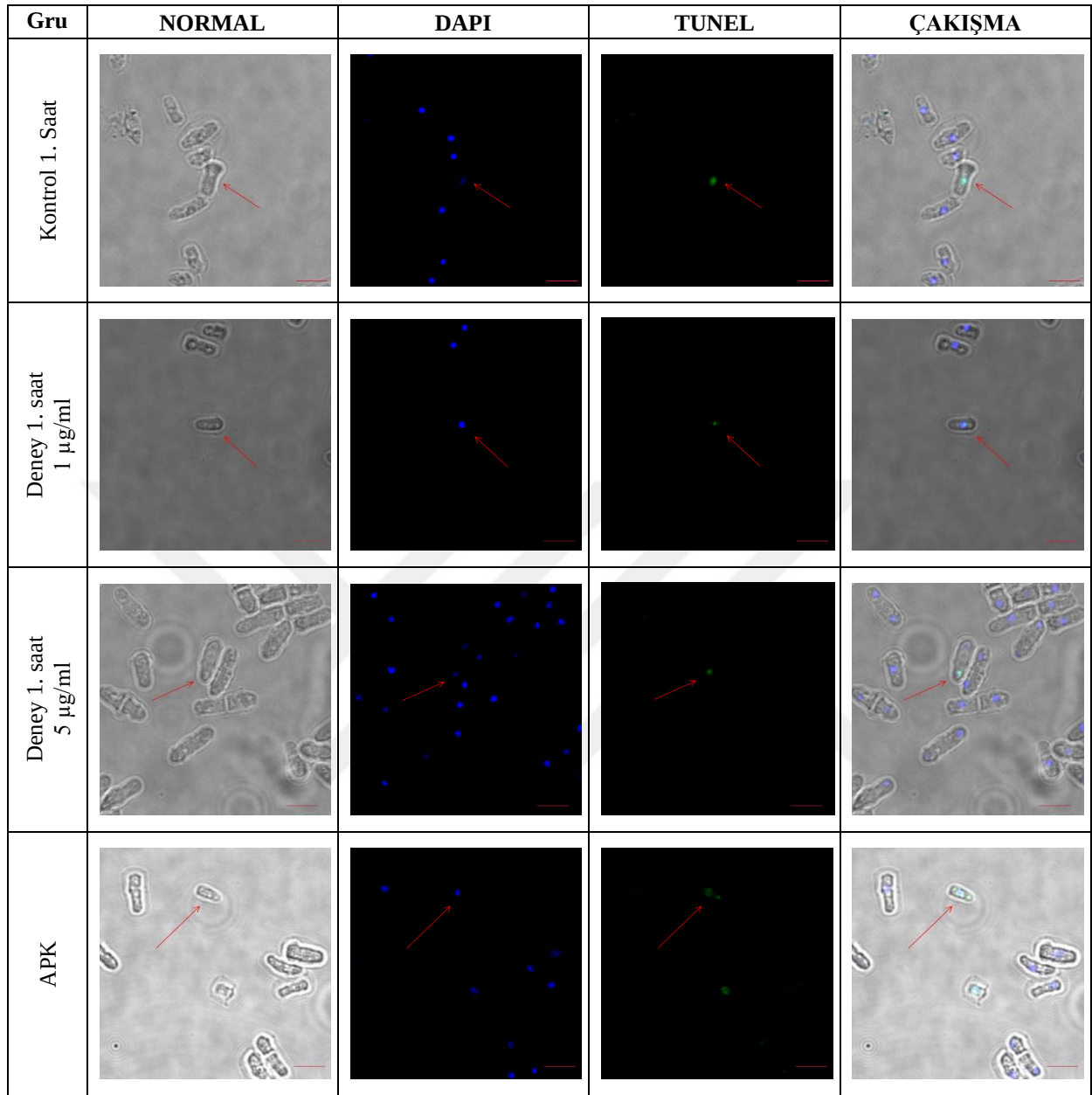
Hücre canlılığının, artan stres ve yaşa bağlı olarak, apoptozu ve otofajiyi düzenleyen moleküler mekanizmaların dengeli bir şekilde işletilmesiyle belirlendiği bilinmektedir.

		1 saat						4 saat						24 saat					
		10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
972h 1 µg/mL	K																		
	D																		
972h 5 µg/mL	K																		
	D																		
FY29340 1 µg/mL	K																		
	D																		
FY29340 5 µg/mL	K																		
	D																		
APK	K																		
	D																		

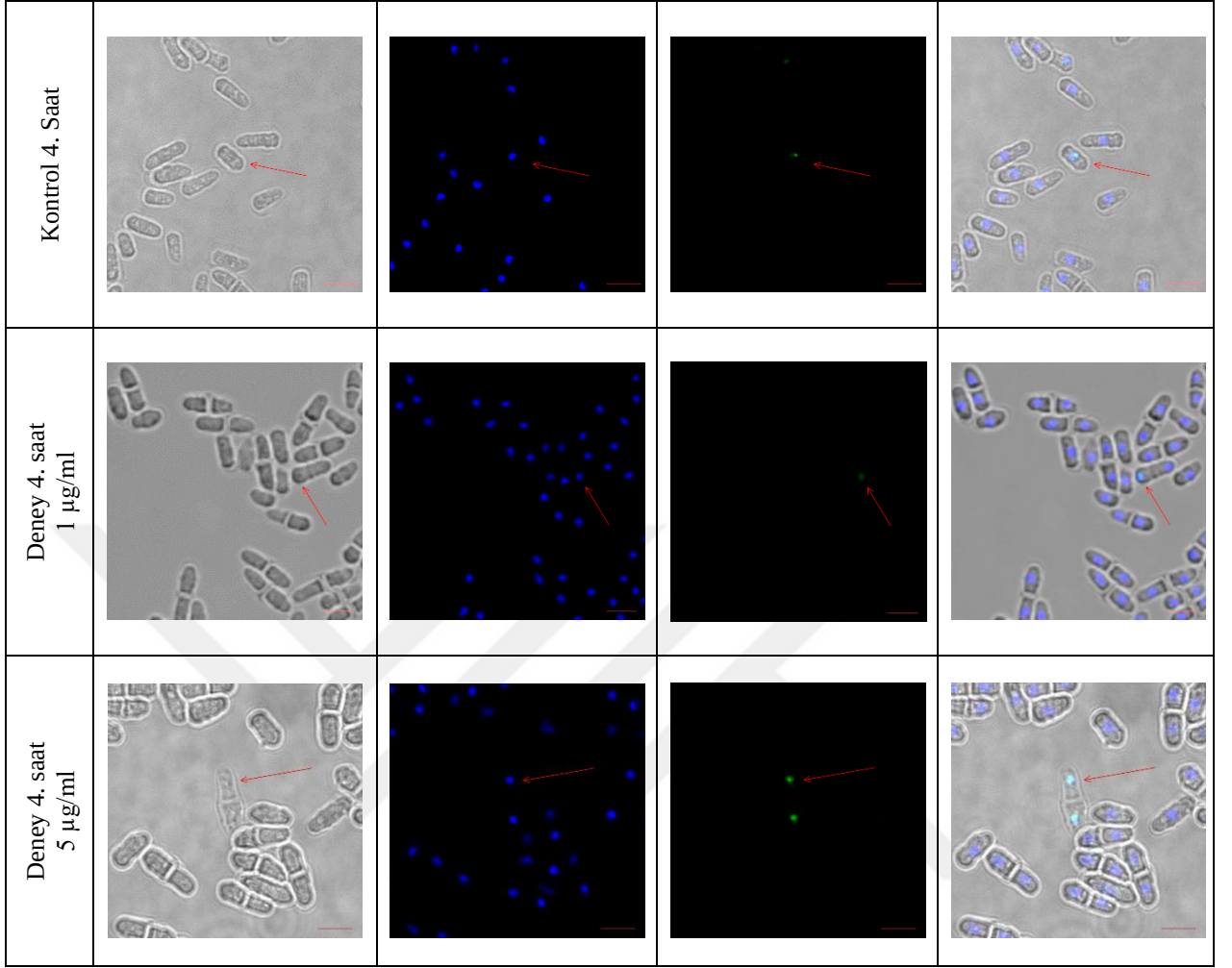
Şekil 4.1: *S. pombe* 972h⁻ ve FY29340 ırkına ait farklı konsantrasyonlarda tunikamisin (1 µg/mL ve 5 µg/mL) farklı saatlerdeki (1,4 ve 24. saat) canlılık üzerine etkisini gösteren spotlar. K: kontrol grubu, D: deney grubu, APK: Apoptoz Pozitif Kontrol, *S. pombe* 972h⁻, 5 mM, 4 saat arsenik ile inkübe edildi.

4.1.1. ER Stresinin Apoptoz Oluşumundaki Rolü

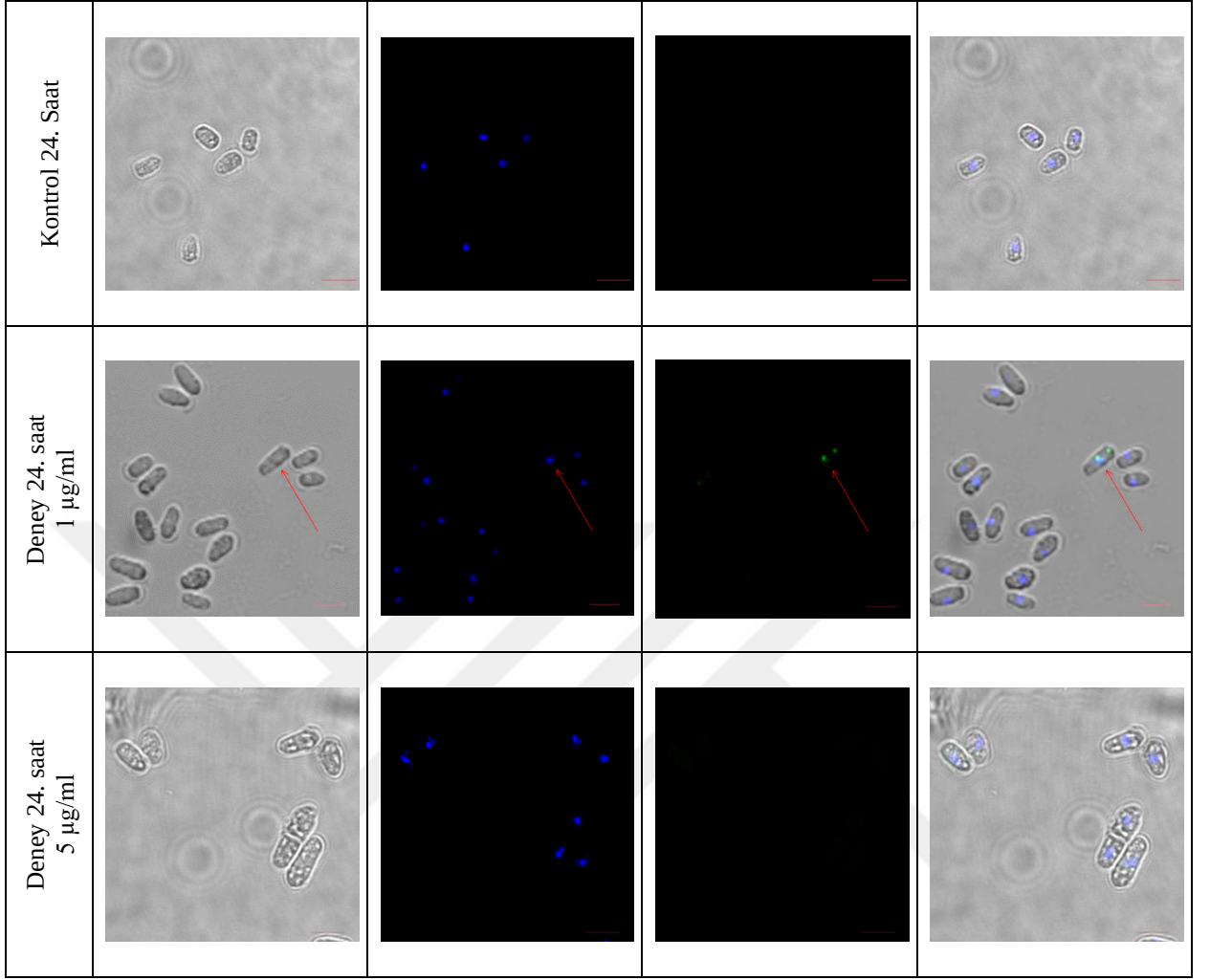
Apoptozun belirlenmesi Bölüm 3.7’de anlatıldığı gibi TUNEL testi ile yapıldı. Nükleer DNA’nın boyanması için DAPI kullanılarak mavi ışık yayması, DNA kırıkları için TUNEL kullanılarak yeşil ışık yayması sağlandı. Rastgele seçilen alanlara ait konfokal mikrografları Şekil 4.2’de verildi ve kırmızı ok ile apoptotik hücreler gösterildi. Hücre morfolojileri incelendiğinde, deney grubundaki hücreler kontrol grubuna göre daha büyük olduğu ve uzama gösterdiği tespit edildi. Apoptoz pozitif kontrolde ise hücre boyutunda büyüme gözlenmedi.



Şekil 4.2: 1 µg/mL ve 5 µg/mL tunikamisin uygulanmış *S. pombe* yabani ırkında konfokal mikroskop görüntüleri. Yeşil renge boyanan nukleuslar apoptotik hücelere aittir. Leica TCS SP8 konfokal mikroskopi, 68x büyütme oranı, bar 5 µm'dir. Kırmızı oklar apoptotik hüceleri işaret eder. APK: Apoptoz Pozitif Kontrol, *S. pombe* 972h⁻, 5 mM, 4 saat arsenik ile inkübe edildi.

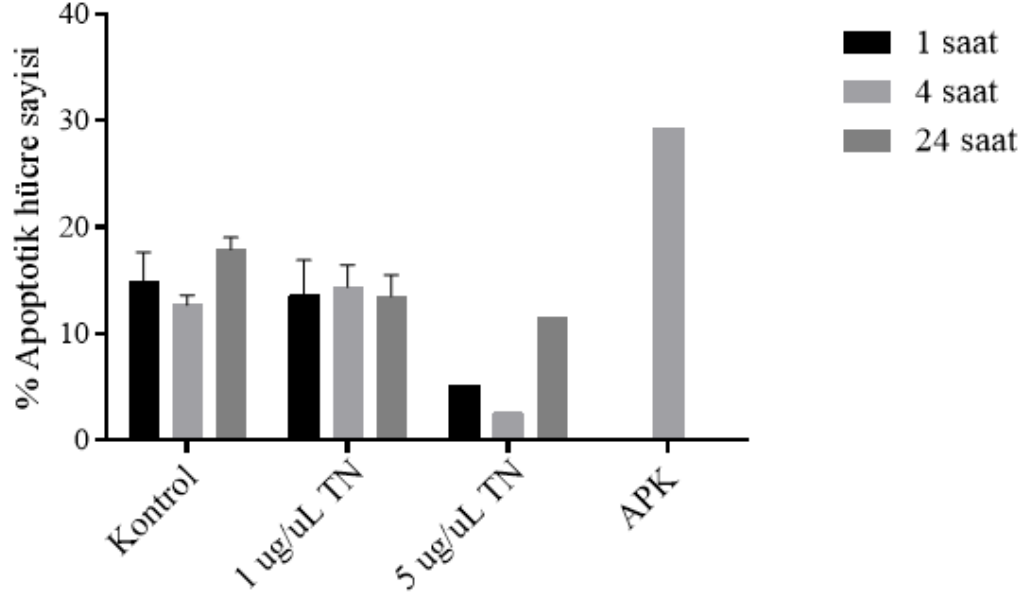


Şekil 4.2 (devamı): 1 µg/mL ve 5 µg/mL TN uygulanmış *S. pombe* yabani ırkında konfokal mikroskop görüntüleri. Yeşil renge boyanan nukleuslar apoptotik hücelere aittir. Leica TCS SP8 konfokal mikroskopi, 68x büyütme oranı, bar 5 µm'dir. Kırmızı oklar apoptotik hüceleri işaret eder. APK: Apoptoz Pozitif Kontrol, *S. pombe* 972h, 5 mM, 4 saat arsenik ile inkübe edildi.



Şekil 4.2 (devamı): 1 µg/mL ve 5 µg/mL TN uygulanmış *S. pombe* yabani ırkında konfokal mikroskop görüntüleri. Yeşil renge boyanan nukleuslar apoptotik hücelere aittir. Leica TCS SP8 konfokal mikroskopi, 68x büyütme oranı, bar 5 µm'dir. Kırmızı oklar apoptotik hüceleri işaret eder. APK: Apoptoz Pozitif Kontrol, *S. pombe* 972h⁻, 5 mM, 4 saat arsenik ile inkübe edildi.

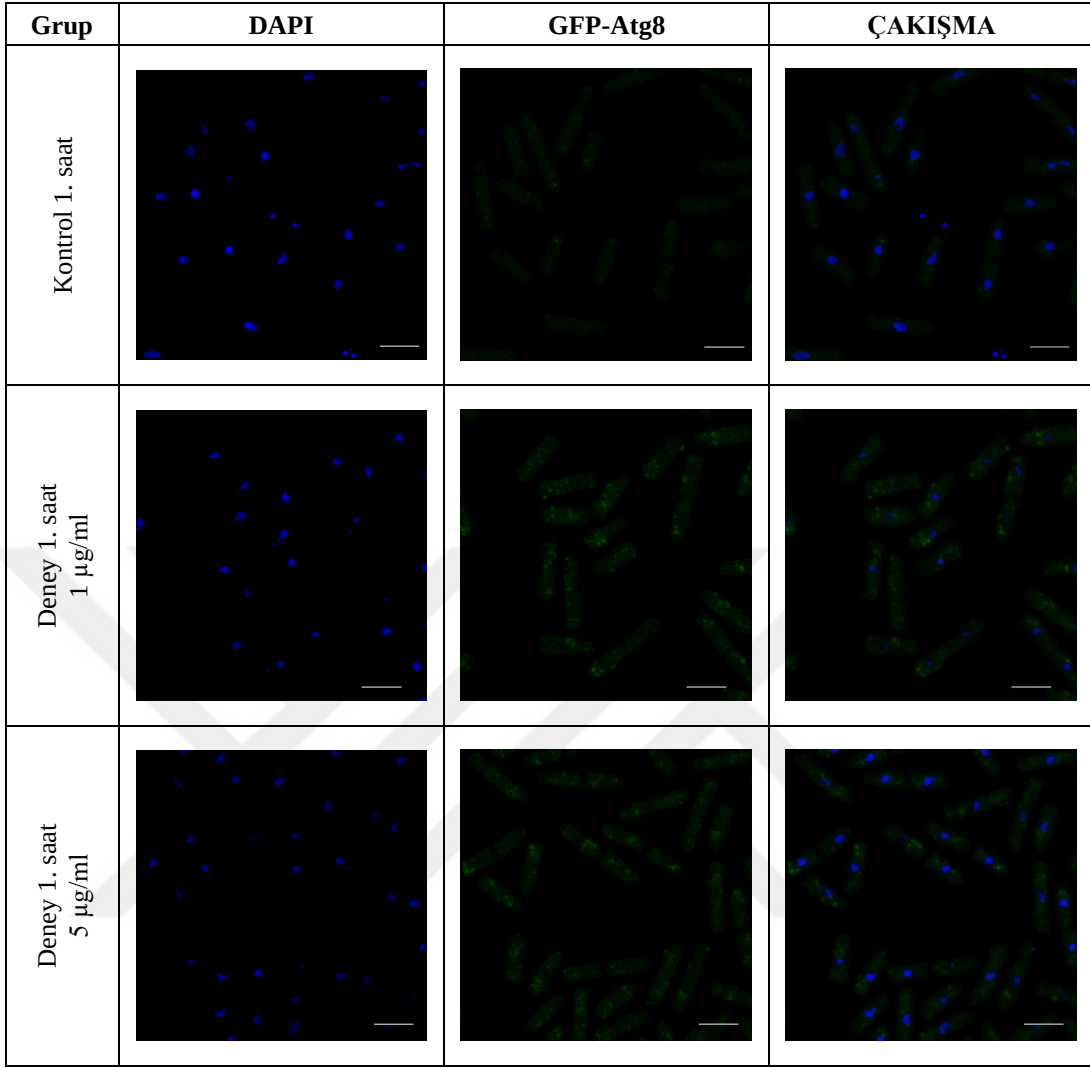
Yüzde olarak apoptoz oranının belirlenmesi için, mikroskopta rastgele seçilen alanlardan yaklaşık 300 hücre incelendi ve apoptotik hücre sayısı toplam hücre sayısına oranlanarak apoptoz oranı hesaplandı. Bu oranlar kullanılarak GraphPad6 programında çizilen grafik Şekil 4.3'te verildi. Sonuçlara göre, apoptoza yol açtığı bilinen arseniğin (5 mM, 4 saat) yaklaşık %30 apoptoza yol açtığı gözlemlendi. Ancak, 1 ve 5 µg/mL tunikamisin uygulanan örneklerdeki apoptoz oranlarının kontrol grubunda gözlenen apoptoz oranlarından fazla olmadığı tespit edildi.



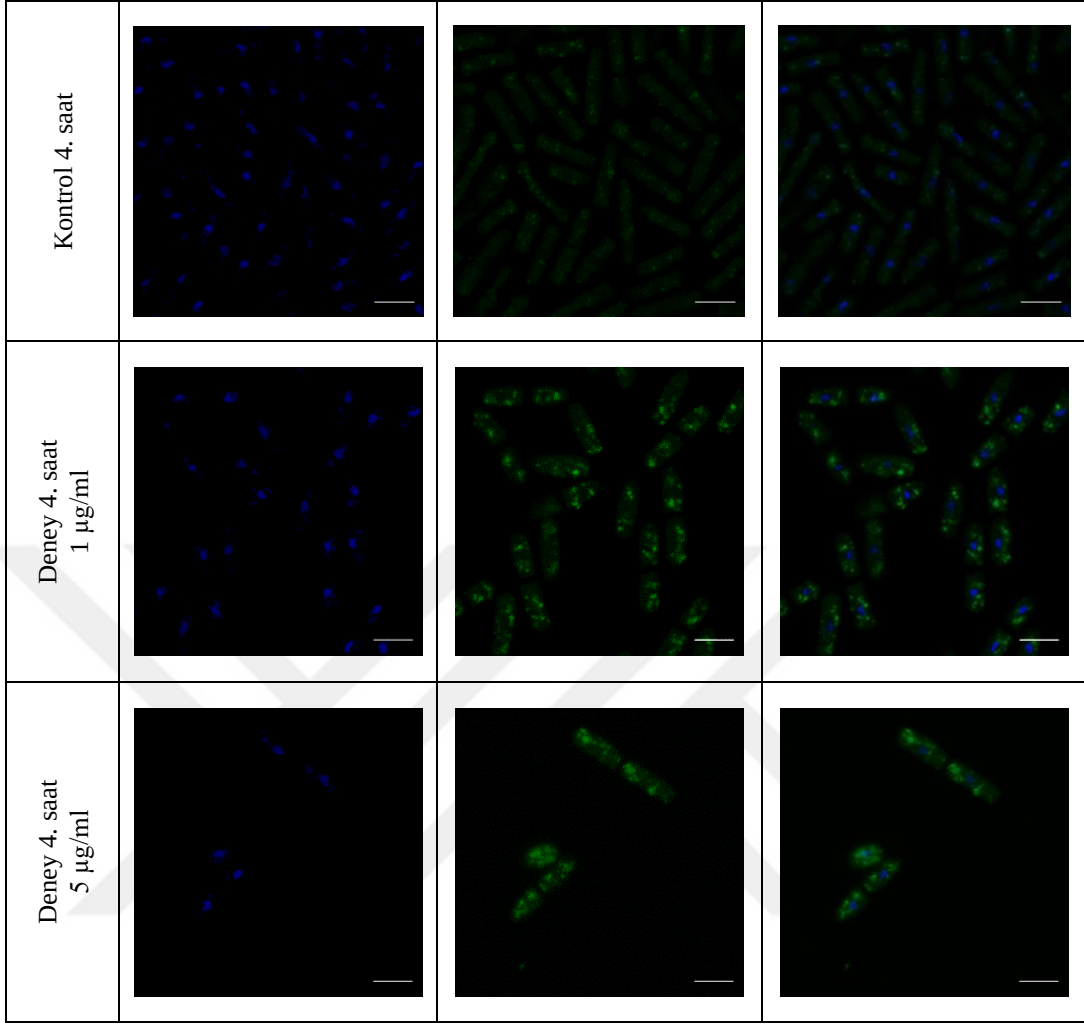
Şekil 4.3: 1 µg/mL ve 5 µg/mL tunikamisin uygulanmış ve uygulanmamış *S. pombe* yabani ırkında apoptotik hücre oranı. Grafik, kontrol ve deney gruplarına ait preparatların rastgele seçilen mikroskop alanlarından ele alınan 300 hücre içindeki apoptotik hücrelerin yüzde değerini ifade eder. TN: tunikamisin. APK: Apoptoz Pozitif Kontrol, *S. pombe* 972h, 5 mM, 4 saat arsenik.

4.1.2. ER Stresinin Otofaji Oluşumundaki Rolü

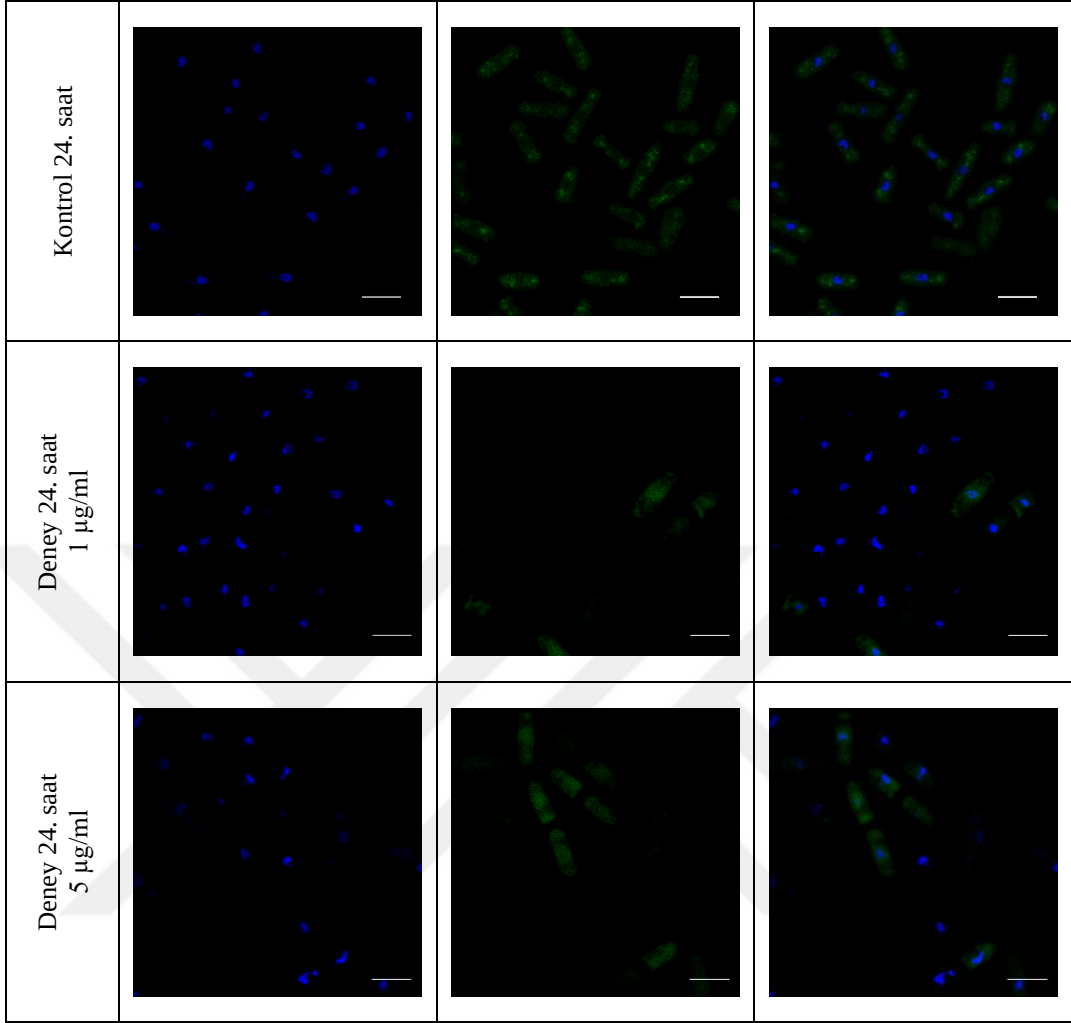
Tunikamisinin (1 ve 5 µg/mL) tetiklediği ER stresine bağlı olarak apoptozun artmaması, hücre canlılığı üzerinde etki eden, bir diğer mekanizma olarak, otofajinin araştırılmasını gündeme getirdi. Bunun için, otofagozomların yapısına katıldığı bilinen Atg8 proteinden yararlanıldı. Bu amaçla Hızlan Hıncal AĞUŞ (Yeni Yüzyıl Üniversitesi) tarafından sağlanan ve genomunda GFP-bağlı *atg8* içeren *S. pombe* ırkı (FY29340) kullanıldı (Matsuhara ve Yamamoto, 2016). Atg8 anlatım yaptığında GFP ile birlikte sentezleneceği için konfokal mikroskobunda yeşil renkli gözlemlendi. Rastgele seçilen alanlara ait konfokal mikrografları Şekil 4.4'te verildi. Deney grubuna ait hücrelerde, kontrol grubundakilere kıyasla, otofagozomların fazla olduğu görüldü. Bu durum, tunikamisinin tetiklediği ER stresine bağlı hücre canlılığının otofaji ile düzenlenebileceğini düşündürdü.



Şekil 4.4: 1 µg/ml ve 5 µg/ml tunikamisin uygulanmış GFP-bağlı atg8 içeren *S. pombe* (FY29340) ırkında otofagozom oluşumlarının morfolojik incelenmesi. Sitosole dağılmış parlak yeşil renkli noktalar fagozomları işaret eder. Leica TCS SP8 konfokal mikroskopyu, 68x büyütme oranı, bar 5 µm'dir.



Şekil 4.4 (devamı): 1 µg/ml ve 5 µg/ml tunikamisin uygulanmış GFP-bağlı atg8 içeren *S. pombe* (FY29340) ırkında otofagozom oluşumlarının morfolojik incelenmesi. Sitosole dağılmış parlak yeşil renkli noktalar fagozomları işaret eder. Leica TCS SP8 konfokal mikroskopi, 68x büyütme oranı, bar 5 µm'dir.

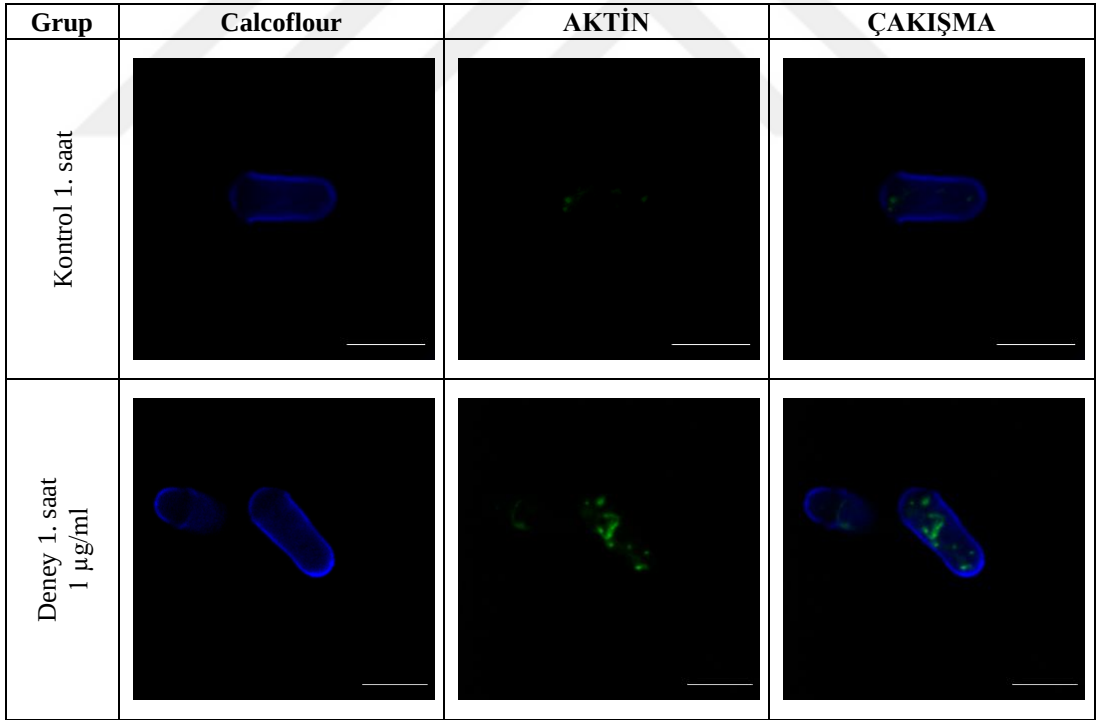


Şekil 4.4 (devamı): 1 µg/ml ve 5 µg/ml tunikamisin uygulanmış GFP-bağlı atg8 içeren *S. pombe* (FY29340) ırkında otofagozom oluşumlarının morfolojik incelenmesi. Sitosole dağılmış parlak yeşil renkli noktalar fagozomları işaret eder. Leica TCS SP8 konfokal mikroskopi, 68x büyütme oranı, bar 5 µm'dir.

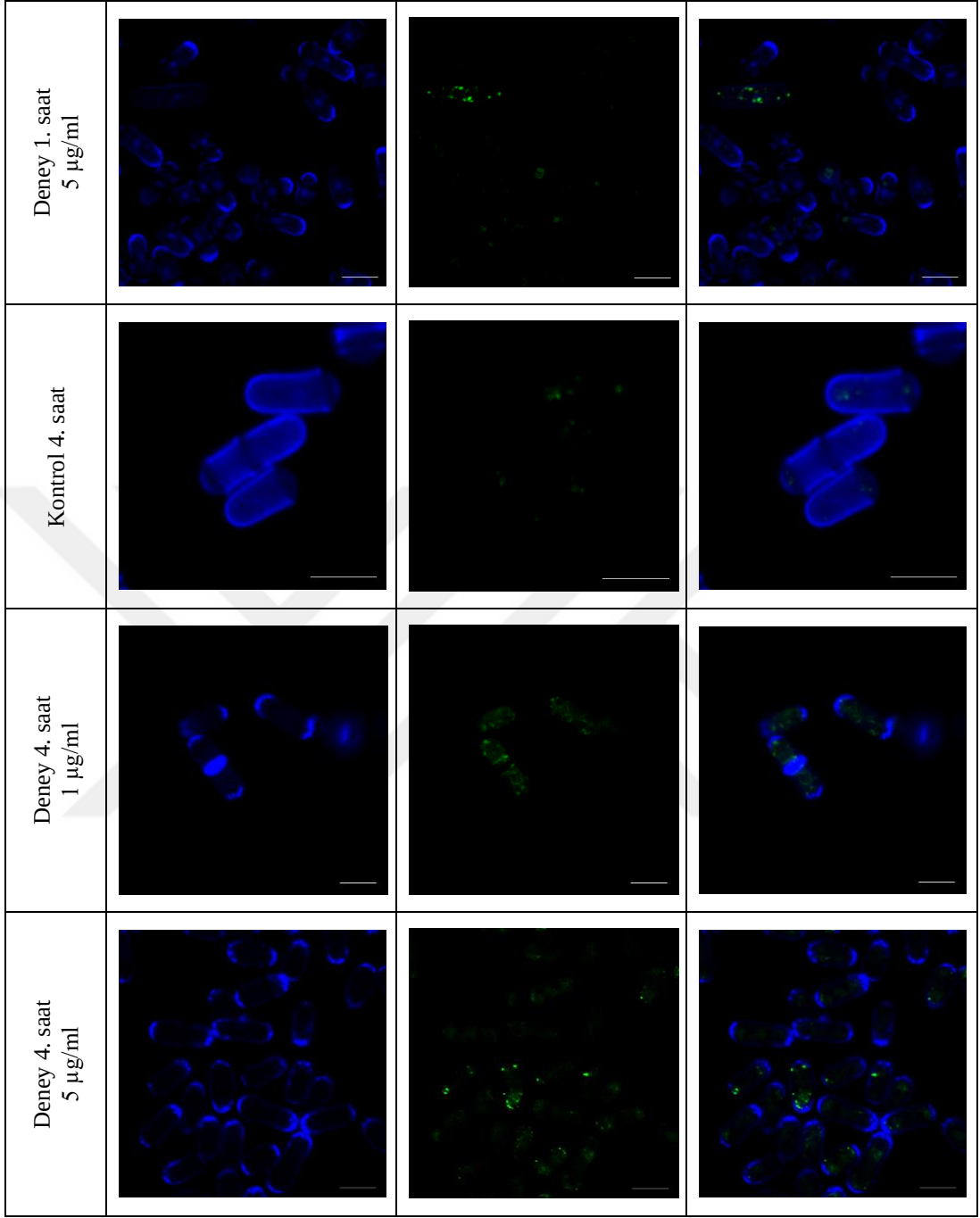
4.1.3. ER Stresinin Hücre İskeletinin Organizasyonundaki Rolü

S. cerevisiae'de açlık sırasında endoplazmik retikulum (ER) ve peroksizomlar gibi organel yükünün, otofagosom öncüllerine alınması aktin mikrofilament-bağımlı olduğu bilinmektedir (Hamasaki ve diğ., 2005; Nakatowa, 2020). Bu nedenle, bu çalışmada da ER stresi altındaki *S. pombe* hücrelerinde aktin filamentlerinin organizasyonundaki değişim incelendi. Bu amaçla, Bölüm 3.7.2'de anlatıldığı gibi hücreler floresan boyalar ile boyandıktan sonra konfokal mikroskobunda görüntülendi. Hücre duvarı "Calcofluor" ile mavi, aktin filamentleri "Alexa Flour 488-Phalloidin" ile yeşil renge boyandı. Rastgele seçilen alanlara ait konfokal mikrografları Şekil 4.5'te verildi. Sonuçlara göre, deney grubunda kontrole kıyasla hem hücre

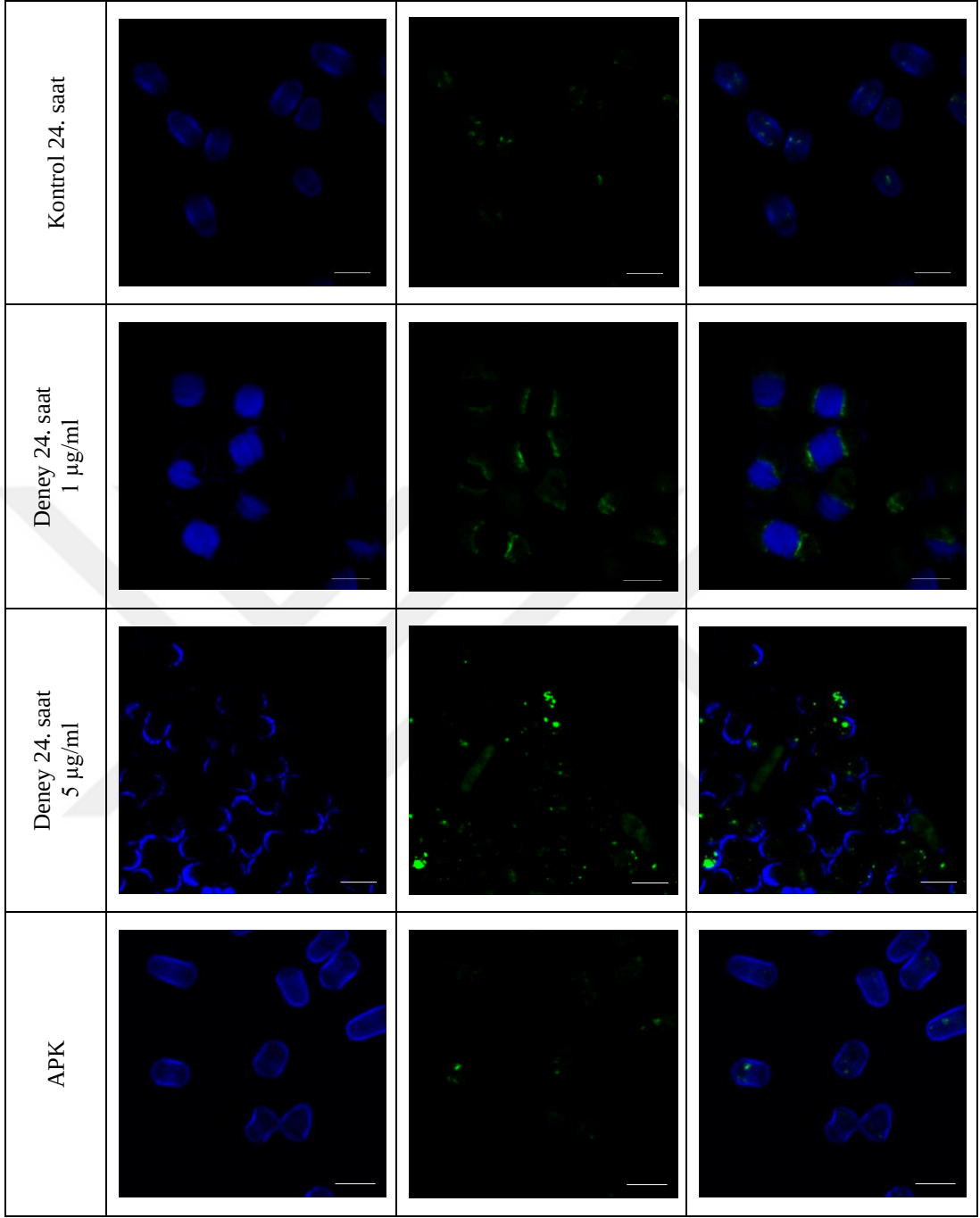
duvarının kalınlığının hem de aktin kümelenmelerinin arttığı gözlemlendi. Buna göre, 1, 4 ve 24 saatlik kontrol gruplarında aktin iskeleti ve hücre çeperi organizasyonunda bir farklılık gözlenmemekle birlikte, 24 saatlik hücrelerin orta kısımlarındaki hücre duvarının kalınlaştığı tespit edildi. Deney gruplarından 1 $\mu\text{g/mL}$ tunikamisin 1 ve 4 saatlik uygulandığı hücrelerde hücre duvarının uçlarda kalınlaştığı ve tüm hücre içine dağılan artan aktin kümelerinin varlığı tespit edildi. 1 $\mu\text{g/mL}$ tunikamisin 24 saatlik uygulamasında ise hücre duvarının orta bölmede iyice kalınlaştığı ve bu yapının sitosolik sınırında aktin kümelerinin filament şeklinde yerleştiği gözlemlendi. Diğer deney grubunun (5 $\mu\text{g/mL}$ tunikamisin) 1, 4 ve 24 saatlik uygulamalarında giderek artan aktin kümeleri ile hücre uçlarında kalınlaşan hücre çeper yapıları dikkati çekti (Şekil 4.5). Apoptoz indükleyicisi olarak kullanılan Pozitif Kontrol (5 mM arsenik, 4 saat) grubunda ne aktin iskeleti ne de hücre duvarı organizasyonu bakımından kontrol grubunda izlenen profilden farklı bir durum gözlenmedi.



Şekil 4.5: 1 $\mu\text{g/mL}$ ve 5 $\mu\text{g/mL}$ tunikamisin uygulanmış *S. pombe* yabani ırkında hücre çeperi ve aktin iskeletinin konfokal mikroskop altında morfolojik incelenmesi. Leica TCS SP8 konfokal mikroskopu, 68x büyütme oranı, bar 5 μm 'dir. APK: Apoptoz Pozitif Kontrol, *S. pombe* 972h; 5 mM, 4 saat arsenik ile inkübe edildi.



Şekil 4.5 (devamı): 1 $\mu\text{g/mL}$ ve 5 $\mu\text{g/mL}$ tunikamisin uygulanmış *S. pombe* yabani ırkında hücre çeperi ve aktin iskeletinin konfokal mikroskop altında morfolojik incelenmesi. Leica TCS SP8 konfokal mikroskopu, 68x büyütme oranı, bar 5 μm 'dir. APK: Apoptoz Pozitif Kontrol, *S. pombe* 972h⁺, 5 mM, 4 saat arsenik ile inkübe edildi.



Şekil 4.5 (devamı): 1 μg/mL ve 5 μg/mL tunikamisin uygulanmış *S. pombe* yabani ırkında hücre çeperi ve aktin iskeletinin konfokal mikroskop altında morfolojik incelenmesi. Leica TCS SP8 konfokal mikroskobu, 68x büyütme oranı, bar 5 μm'dir. APK: Apoptoz Pozitif Kontrol, *S. pombe* 972h⁺, 5 mM, 4 saat arsenik ile inkübe edildi.

4.2. *S. pombe* MUTANTLARINDA ER STRESİNİN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ER stresine maruz kalan hücrelerde dengeye ulaşmak için öncelikle, protein katlanma seviyesi ile yüzey alanının ve lümen hacminin artırılması ve yanlış katlanan proteinlerin yıkılmasını sağlayan Katlanmamış Protein Yolağı (“unfolded protein response”, UPR)’nın devreye girdiği bilinmektedir. Sorunun devam etmesi durumunda, hücre canlılığının otofaji veya apoptoz süreçleri arasındaki düzenleme ile sağlandığı bilinmektedir (Kimming ve diğ., 2012; Marino ve diğ., 2014). Bu bağlamda, *S. pombe*’de UPR, otofaji ve apoptoz süreçlerine ek olarak, özellikle ER’nin işlevi dikkate alındığında, kalmodulin bağımlı sinyalizasyon ile hücre iskeleti süreçleri, ER stresi altında moleküler düzeyde araştırıldı. Bunun için, UPR (*ire1* ve *gpt1*), otofaji (*atg8*, *atg15* ve *trs85*), apoptoz (*aif1*), sinyal iletimi (*prz1*) ve hücre iskeleti (*myo51* ve *myo52*) süreçlerine dahil olan genleri delesyonlu *S. pombe* mutantlarında (Hapolid *S. pombe* kitaplığı, Bioneer, Version 5.0), tunikamisin (1µg/mL; 1, 4 ve 24 saat) hücre canlılığı ve hücre içi oksidasyon düzeyine etkisi araştırıldı.

4.2.1. *S. pombe* Mutantlarında Genotip Kontrolü

Çalışmada kullanılan *S. pombe* mutant ırklarının yabani ırk ile birlikte genotipik özelliklerinin fenotipik kontrolleri seçici besi ortamları (MMA, MMA+LU, MMA+AU, MMA+AL) kullanılarak belirlendi (Tablo 4.1). Buna göre yabani ırkın her ortamda ürediği, mutant ırkların ise sadece metabolitler eklenmiş minimal besi ortamında (MML+AUL) ve zengin besi ortamında (YEA) ürediği gözlemlendi.

Tablo 4.1: *S. pombe* mutant ırklarının genotipik özelliklerinin fenotipik kontrolü. YEA: Katı zengin besi ortamı; MMA: Katı minimal besi ortamı; A: Adenin; U: Urasil; L: Lösin; +: Üreme var; -: Üreme yok.

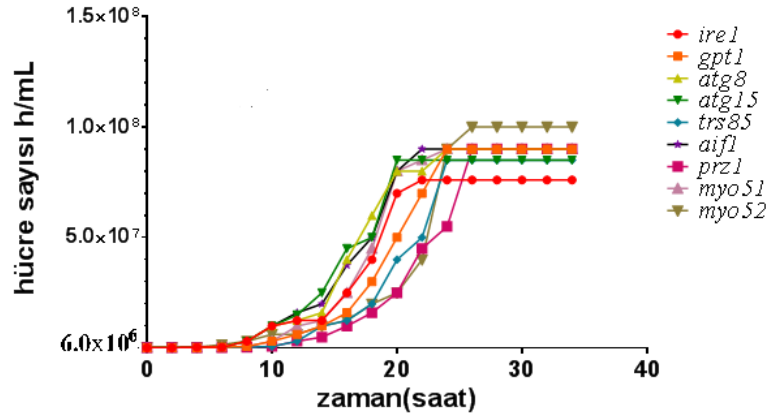
		MMA	MMA+LU	MMA+AU	MMA+AL	MMA+UAL	YEA
Yabani	972h ⁻	+	+	+	+	+	+
Parental	ED666	-	-	-	-	+	+
UPR	<i>ire1Δ</i>	-	-	-	-	+	+
	<i>gpt1Δ</i>	-	-	-	-	+	+
Otofaji	<i>atg8Δ</i>	-	-	-	-	+	+
	<i>atg15Δ</i>	-	-	-	-	+	+
	<i>trs85Δ</i>	-	-	-	-	+	+

Tablo 4.1 (devamı): *S. pombe* mutant ırklarının genotipik özelliklerinin fenotipik kontrolü. YEA: Katı zengin besi ortamı; MMA: Katı minimal besi ortamı; A: Adenin; U: Urasil; L: Lösin; +: Üreme var; -: Üreme yok.

Apotoz	<i>aif1Δ</i>	-	-	-	-	+	+
Sinyal	<i>prz1Δ</i>	-	-	-	-	+	+
Aktin	<i>myo51Δ</i>	-	-	-	-	+	+
hücre iskeleti	<i>myo52Δ</i>	-	-	-	-	+	+

4.2.2. *S. pombe* Mutantlarında Üremenin İzlenmesi

S. pombe mutant ırklarında tunikamisin uygulaması için YES besi ortamındaki üremeleri izlenerek uygun saat belirlendi. Bunun için hücre üremesi 34 saat boyunca 2'şer saat aralıklarda 600 nm dalga boyundaki optik yoğunluğun (OD) ölçülmesiyle izlendi. İki kez tekrarlanan denemelerden elde edilen verilerin ortalaması alınarak standart grafik çıkarıldı (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: *S. pombe* mutant ırklarına ait zamana bağlı hücre sayısı grafiği.

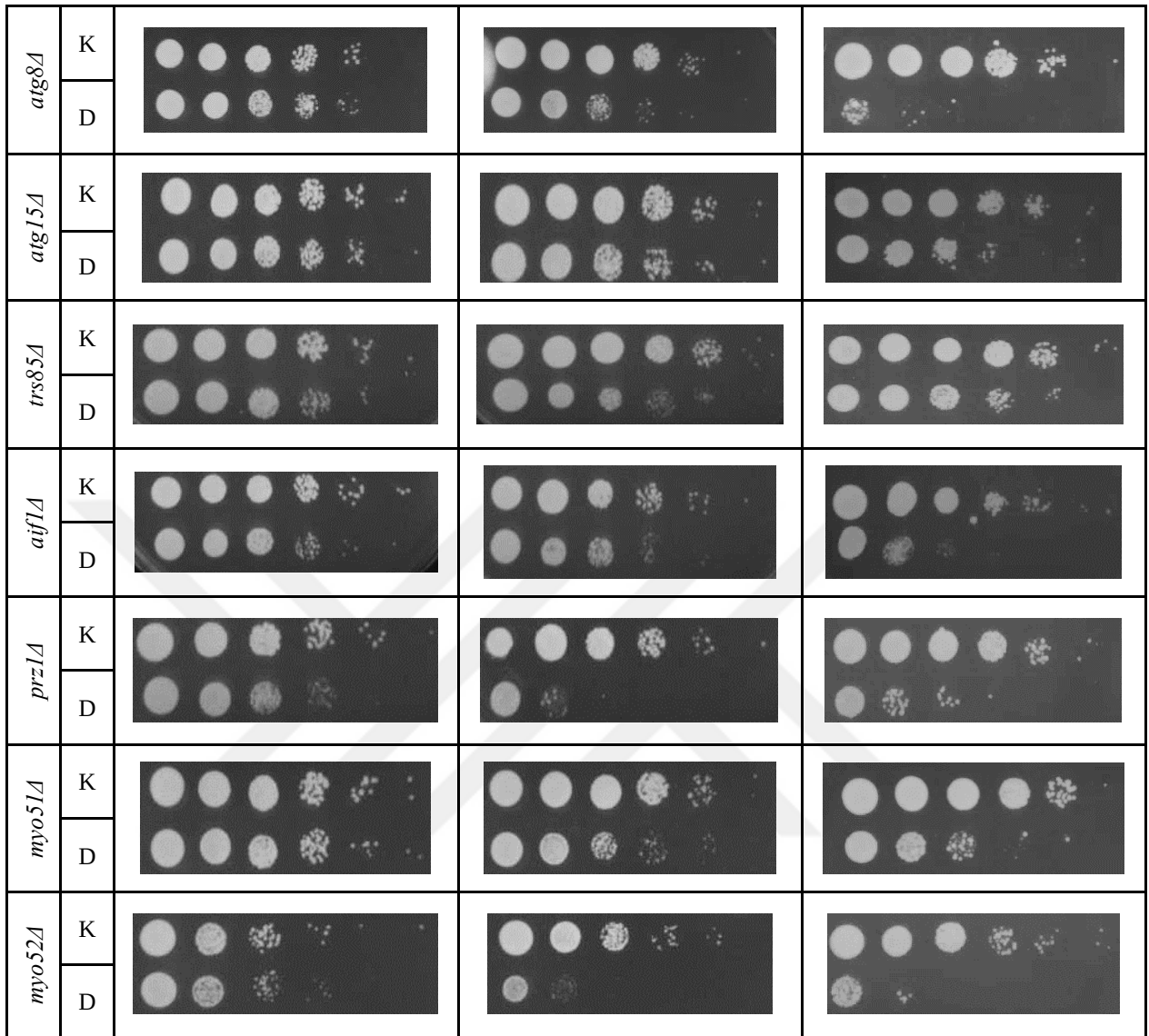
Şekil 4.6'daki grafiğe göre *ire1Δ*, *atg8Δ* ve *atg15Δ* ırklarında jenerasyon sayısı 3,5 ve diğer ırklarda ise 4,2 olarak, jenerasyon süresi ise *trs85Δ* ırkında 3,5 saat, diğer ırklarda ise 4 saat olarak hesaplandı. Buna göre logaritmik evrenin ortasına yaklaşık 16-17 saatte ulaşan hücre kültüründen yaklaşık 10^7 hücre/mL alınarak tunikamisin uygulandı.

4.2.3 *S. pombe* Mutantlarında ER Stresinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Rolü

Bölüm 3.5.1’de anlatıldığı gibi hazırlanan *S. pombe* mutantlarının ve bu mutantların parental (ED666) ırkı ile GFP-bağlı *atg8* içeren FY29340 ırkının hücre kültürlerinden alınan örnekler 10 kat sulandırıldıktan sonra seri spot ekimi sonuçları Şekil 4.7’de verildi. Öncelikle, parental ırkın tunikamisin (1 $\mu\text{g/mL}$) antibiyotiğine karşı duyarlılığının yabani ırkın aynı dozda uygulanan tunikamisin duyarlılığına benzer bir profil sergilediği tespit edildi (Şekil 4.1). *S. pombe* mutantlarında 1 saatlik tunikamisin uygulaması *ire1Δ* ve *prz1Δ* hariç diğer tüm mutantlarda hücre canlılığını etkilemedi. UPR yolağına dahil olan *ire1* ve *gpt1* genleri delesyonlu *ire1Δ* ve *gpt1Δ* mutantlarının tunikamisinin uygulama süresine bağlı olmaksızın duyarlı ve orta düzey duyarlı, sırasıyla, olduğu görüldü. Otofaji yolağına ait mutantlardan *atg15Δ* ve nispeten daha az olmakla birlikte *trs85Δ* dirençlilik gösterirken, *atg8Δ* duyarlı bulundu. Apoptoz sürecindeki mutantlardan *aif1Δ*’in ve sinyalizasyon sürecine dahil olan *prz1Δ*’in doz bağımlı olarak duyarlılık tespit edildi. Son olarak, hücre iskeleti dinamiğine katılan *myo51Δ*, tunikamisinin uygulama süresine bağlı olmaksızın orta düzey duyarlılık sergilerken, *myo52Δ*’nin oldukça duyarlı olduğu gözlemlendi.

		1 saat						4 saat						24 saat					
		10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
ED666	K																		
	D																		
<i>ire1Δ</i>	K																		
	D																		
<i>gpt1Δ</i>	K																		
	D																		

Şekil 4.7: *S. pombe* mutant ırklarına ait tunikamisinin (1 $\mu\text{g/mL}$) farklı saatlerdeki (1,4 ve 24. saat) canlılık üzerine etkisini gösteren spotlar. 10 kat sulandırım yapıldı. K: Kontrol grubu; D: Deney grubudur.

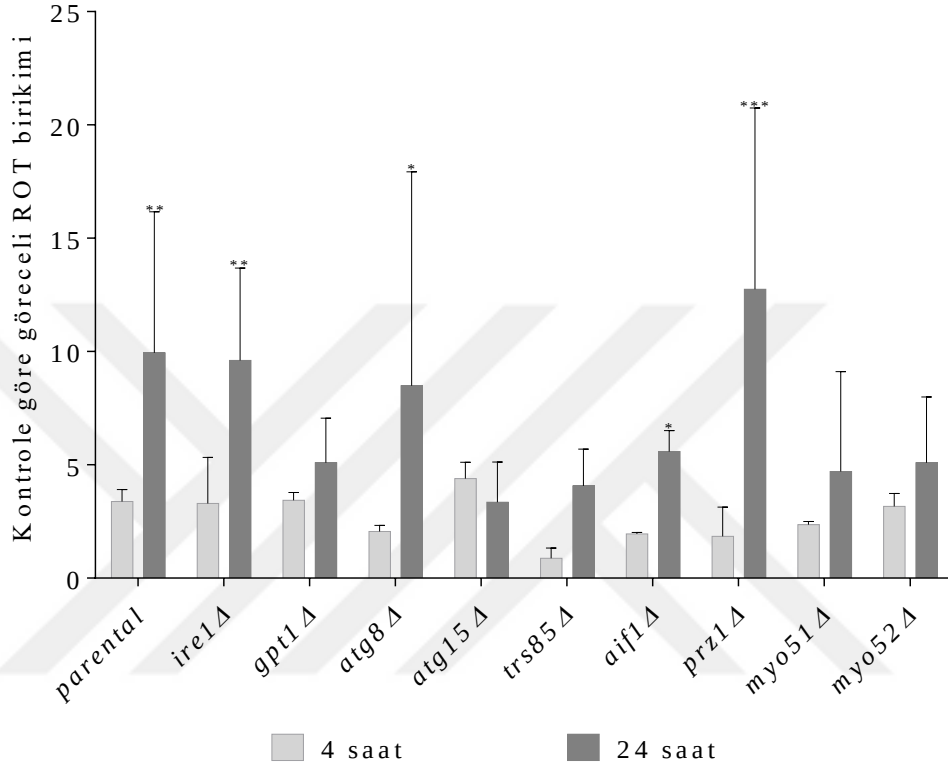


Şekil 4.7 (devamı): *S. pombe* mutant ırklarına ait tunikamisin (1 µg/mL) farklı saatlerdeki (1,4 ve 24. saat) canlılık üzerine etkisini gösteren spotlar. 10 kat sulandırım yapıldı. K: Kontrol grubu; D: Deney grubudur.

4.2.4. *S. pombe* Mutantlarında ER Stresinin Hücreiçi Oksidasyon Düzeyindeki Rolü

Hücreiçi oksidasyon düzeyi Bölüm 3.6'da anlatıldığı gibi deney ve kontrol grubu hücre kültüründen 4 ve 24 saatlik tunikamisin (1 µg/mL) uygulamasının ardından alınan örneklerin spektrofotometre cihazında serbest radikallerin etkisiyle oluşan diklorofluoresinin (DCF) yaydığı flüoresan değeri ölçüldü. Kontrol grubuna ait ROT değeri %100 kabul edilip deney grubuna ait ROT değeri, kontrole kıyasla %'de alınarak hesaplama yapıldı. Sonuçlar Şekil 4.8'de gösterildi. Buna göre *S. pombe* parental ve mutant ırklarda 4 saatlik 1 µg/mL tunikamisin

uygulamasının istatistiki olarak anlamlı bir artışa yol açmadığı ancak, 24 saatlik uygulamada parental ve *ire1Δ*, *atg8Δ*, *aif1Δ*, *prz1Δ* ırklarında ölçülen ROT değerinin kontrole göre istatistiki olarak anlamlı olduğu hesaplandı.



Şekil 4.8: Tunikamisin (1μg/mL, 4 ve 24 saat) uygulanan *S. pombe* mutant ırklarında kontrole göre ROT birikimi. ROT: Reaktif Oksijen Türleri. P<0.05 (*); P<0.01 (**); P<0,001(***)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ökaryotik organizmalarda ER, salgı ve membran proteinlerinin sentezlendiği ve çeşitli modifikasyonları (glikozillenme, disülfid bağları) takiben doğru biçimde katlanıp aktif formlarını aldığı, lipid sentezinin büyük oranda yapıldığı ve hücre içi kalsiyum dengesinin sağlandığı bir organeldir (Zimmermann ve diğ., 2011; Jan ve diğ., 2014; Schwarz ve Blower, 2016).

Hücre içi ve dışı çeşitli stres faktörlerine karşı duyarlı olan ER, fonksiyonunu yerine getiremediği şartlarda, lümeninde katlanmamış veya yanlış katlanmış protein birikimi meydana gelir. Bu durum ER stresi olarak adlandırılır. ER stresine karşı hücre öncelikle katlanmamış/yanlış katlanmış protein yanıtı (UPR) yolağını oluşturur. UPR, protein katlama kapasitesini artırmak ve homeostazı yeniden sağlamak için translasyonel inhibisyon, seçili mRNA yıkımı, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin yıkımı, şaperon ve katlama enzimlerinin miktarının artırılması gibi önlemleri içerir (Harding ve diğ., 1999; Travers ve diğ., 2000; Hollien ve Weissman, 2006; Walter ve Ron, 2011). Bu açıdan bakıldığında, UPR'nin hücrenin adaptasyonunu sağlayan koruyucu bir süreç olduğu anlaşılmaktadır. Bununla birlikte, şiddetli ve uzun süreli ER stresine bağlı UPR'nin, koruyucu olmaktan ziyade, ya apoptozu indükleyerek sitotoksik hale geldiği ya da otofajiyi tetikleyerek hücre adaptasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir (Lin ve diğ., 2007; Han ve diğ., 2009; Tabas ve Ron, 2011; Woehlbier ve Hetz, 2011).

Öte yandan, ER stresine bağlı gelişen apoptoz, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar, ateroskleroz ve böbrek hastalığı dahil olmak üzere birçok yaygın hastalıkta önemli bir patojenik faktörken (Tabas ve Ron, 2011), ER stresine bağlı gelişen otofaji, kanser hücrelerinin gelişimine ortam hazırlayan bir etmen olabilmektedir (Yadav ve diğ., 2014). UPR'nin hücre kaderini belirlemedeki merkezi rolü nedeniyle, UPR'yi terapötik faydada kullanmayı hedefleyen birçok çalışma literatürde yer almıştır (Fribley ve diğ., 2011; Papandreou ve diğ., 2011; Volkmann ve diğ., 2011; Cross ve diğ., 2012; Mimura ve diğ., 2012). Ancak, söz konusu bu hücrel süreçlerin moleküler mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Hangi uyarının hangi yolağın hangi molekül(ler) ile tetiklendiği ve akabindeki sinyalizasyonun nasıl geliştiği net değildir. Evrimsel boyutta oldukça korunmuş olan bu süreçlerin, ökaryotik model organizma olan tek hücreli maya grubu türlerinde yapılan çalışmalarda, ER stresinin apoptoz ve otofaji

dahil olmak üzere programlanmış hücre ölümünü (PCD, “programmed cell death”) tetiklediği bilinmektedir (Yorimitsu ve diğ., 2006; Guerin ve diğ., 2009; Austriaco, 2012; Kim ve diğ., 2012).

Bu çalışmada, ER’de N-glikosilasyon inhibisyonuna yol açarak ER stresini tetikleyen tunikamisin (1 ve 5 µg/mL; 1, 4 ve 24 saat) *S. pombe* yabancı ırkındaki sitotoksik etkisinin doz ve uygulama süresine bağlı artması (Şekil 4.1), daha önce çalışma grubumuzda Özarabacı (2019) tarafından gerçekleştirilen, yüksek lisans tez çalışması ile paralellik göstermektedir. Söz konusu çalışmada, 1 µg/mL tunikamisine 1 saat maruz kalan *S. pombe* yabancı ırkındaki hücre içi oksidasyon düzeyinin 6 kat; 4 ve 24 saat maruz kalanlarda ise yaklaşık 3.000 kat artırdığı rapor edildi (Özarabacı, 2019).

Literatüre göre, hücre canlılığının, artan stres ve yaşa bağlı olarak, apoptozu ve otofajiyi düzenleyen moleküler mekanizmaların dengeli bir şekilde işletilmesiyle belirlendiği anlaşılmaktadır. Bu nedenle, sunulan bu tez çalışmasında, çeşitli doz ve sürelerde tunikamisine tetiklenen ER stresinin, apoptoz ve otofaji süreçlerini başlatma kapasiteleri ve bu süreçlerdeki anahtar genlerin rolleri araştırıldı.

Maya hücrelerinde apoptoz, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması, fosfatidilserin atılımı, reaktif oksijen türlerinin (ROT) birikimi, mitokondriden sitokrom c salımı ve kaspaz aktivasyonu gibi karakteristik belirteçlerle izlenir (Kerr, 2002; Severin ve diğ., 2008). Bu çalışmada, artan tunikamisin konsantrasyonu ve süresine paralel *S. pombe* yabancı ırkında gözlenen artan sitotoksik etkiye apoptozun katkısı olup olmadığı, DNA fragmentasyonu esasına dayanan TUNEL testi uygulanarak sorgulandı. TUNEL testinin başarısı, apoptoz pozitif kontrolü olarak kullanılan arsenik (5 µg/mL, 4 saat, Ağuş ve diğ., 2019) uygulanmış *S. pombe* yabancı ırkında floresan mikroskopta yeşil parlayan nükleuslarla doğrulandı ve yaklaşık %30 apoptoz oranı hesaplandı (Şekil 4.3). Ancak, 1 ve 5 µg/mL tunikamisin uygulanan örneklerdeki apoptoz oranlarının kontrol grubunda gözlenen apoptoz oranlarından fazla olmadığı belirlenerek (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3), tunikamisin indüklediği ER stresine bağlı gelişen sitotoksitenin apoptoz mekanizması ile gelişmediği sonucuna varıldı. ER stresine bağlı hücre ölümüne (ER-SAD, “ER stress associated cell death”) inositol açlık, lipid toksisitesi ve N-glikosilasyon inhibisyonunun neden olduğu bildirilmesine rağmen (Austriaco, 2012), tersini iddia eden çalışmalarda, tunikamisin sadece düşük osmolit maya-pepton-dekstrozu (YPD, “yeast-peptone-dextrose”) besi ortamında yetiştirilen hücrelerde ölümüne neden olduğu ancak,

sentetik ortamda üretilen hücrelerde ölümünün olmadığı ve ölen hücrelerde de DNA'nın parçalanması ve fosfatidilserin açığa çıkması gibi apoptoz belirteçlerinin bulunmadığı rapor edilmiştir (Dudgeon ve diğ., 2008). Bir diğer çalışmada ise tunikamisin mayaya hücrelerinin vakuolar membranlarını geçerek hücre ölümüne neden olduğu ve bu hücre ölümünün vakuolü asitleştiren V-ATPaz içerdiğindendir ve bu durum kalmodulin tarafından bloke edilebilir şeklindedir (Kim ve diğ., 2012).

Bu çalışmada, tunikamisin indüklediği ER stresine karşı artan sitotoksitede apoptozun etkili olmadığını gözlenmesi üzerine, aynı koşullarda otofajinin nasıl bir etkisinin olduğu araştırıldı. ER stresi ve otofaji arasındaki doğrudan bağlantı disülfid bağ oluşumunu inhibe eden dithiothreitol veya N-glikosilasyonu inhibe eden tunikamisin gibi farklı ER stresi ajanlarıyla muamele edilen *S. cerevisiae*'de ilk olarak gösterilmiştir (Yorimitsu ve diğ., 2006). Aslında, ER stresi sırasında birikmiş proteinlerin otofagosomlar ile ortamdan uzaklaştırılması nedeniyle, otofajinin sitoprotektif olarak iş gördüğü ileri sürülmektedir (Bernales ve diğ., 2006). Otofaji, işlevsizleşen protein ya da mitokondri ve ER gibi organelleri vakuole veya lizozomlara ileterek çift katlı membranla sarılı karakteristik otofagosom yapısını oluşturur (Falcone ve Mazzoni, 2016); bu yapıya katılan Atg8 proteini GFP proteini ile işaretlendiği zaman GFP'nin yaydığı yeşil floresan ile mikroskop altında morfolojik olarak izlenebilmektedir. Bu çalışmada, *S. pombe* atg8-GFP ırkı (FY29340, Mukaiyama ve diğ., 2010) kullanılarak, otofagozom oluşumları, konfokal mikroskopta yeşil floresan yayan noktalar olarak izlendi. Bu amaçla, ER stresini tetikleyen tunikamisin doz ve süresine bağlı artan otofagozom oluşumlarının gözlenmesi (Şekil 4.4), *S. cerevisiae*'de, ER stresine karşı yanıtta ATG genlerinin ekspresyonunun artması ile ATG'ye bağlı otofajinin aktivasyonunu tetiklediği rapor edilen çalışmaları da desteklemektedir (Bernales ve diğ., 2006; Yorimitsu ve diğ., 2006).

Hücre duvarının yeniden düzenlenmesini etkileyen stres koşulların algılanması, mayaların hayatta kalması için önemlidir (Heinisch, 2005; Latgé 2007). *S. pombe*'de beş tane transmembran reseptör (Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 ve Mtl1) hücre yüzey stresini algılar ve Rho1 üzerinden hücre duvarı veya plazma mebranını ile mitogen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolağını uyarır (Egel, 2004; Cruz ve diğ., 2013; Kock ve diğ., 2015). *S. pombe*'de, büyüyen hücre uçlarına yeni hücre duvarı eklenir ve yeniden şekillendirilir ve turgor basıncı uzama için bir kuvvet sağlar. Hücre duvarı sentazları ve yeni membran, hücre uçlarından çıkan

aktin yama ve kabloları tarafından yönlendirilen membran trafiği ile hücre ucuna hedeflendirildiği bilinmektedir (Egel, 2004; Chang, ve Huang, 2014).

Öte yandan, *S. cerevisiae*'de açlık sırasında ER ve peroksizomlar gibi organel yükünün, otofagosom öncüllerine alınmasının aktin mikrofilament-bağımlı olduğu rapor edilmiştir (Hamasaki ve diğ., 2005; Nakatowa, 2020). Bu nedenle, bu çalışmada da ER stresi altındaki *S. pombe* hücrelerinde aktin filamentlerinin organizasyonundaki değişimi, kontrol grubuna kıyasla incelenmek amacıyla, hücre duvarı "Calcofluor" ile mavi, aktin filamentleri "Alexa Flour 488-Phalloidin" ile yeşil floresan ışımlar veren boyalarla boyanarak konfokal mikroskopta izlendi. *S. pombe*'de kontrol grubunda, 1 ve 4 saatlik tunikamisin uygulamasında, aktin iskeleti ve hücre çeperi organizasyonunda bir farklılık gözlenmemekle birlikte, 24 saatlik hücrelerin orta kısımlarındaki hücre duvarının kalınlaşması hücrelerin mitotik evrede olduklarına işaret etmektedir. Çünkü hücre çeperi mitotik evrede orta bölmede toplanırken, interfaz evresinde uçlarda biriktirilmektedir (Egel, 2004). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, F-aktin organizasyonunun, sadece endositoz bölgelerinde Arp2/3-aktin oluşumundan kaynaklı aktin yamalarının füzyon bölgesinde birikimini ortaya çıkarmıştır (Petersen ve diğ., 1998; Kurahashi ve diğ., 2002; Kovar ve diğ., 2011). Bu çalışmada, artan tunikamisin doz ve süresine bağlı olarak giderek artan aktin kümelerinin ve hücre uçlarında kalınlaşan hücre çeper yapılarının gözlenmesi (Şekil 4.5), hücre çeperi bileşenlerinin hedefe taşınmasında olduğu kadar fagozom oluşumu ile de ilişkili olabileceğini akla getirdi. Çünkü, *S. pombe* atg8-GFP ırkının tunikamisinin farklı doz ve uygulama sürelerine bağlı oluşan fagozom miktarı ve dağılımı da (Şekil 4.4) bu sonuçlarla uyumludur.

Ayrıca, apoptoz indükleyicisi olarak kullanılan 5 mM arseniğin 4 saatlik uygulaması ile oluşturulan deney grubunda (apoptoz pozitif kontrol) gerek aktin iskeleti gerekse hücre duvarı organizasyonunun kontrol grubunda izlenen profilden farklı bir durum sergilememesi, hücre çeper ve aktin oluşumlarında gözlenen farklılıkların ER stresi kaynaklı olduğu sonucuna varılmıştır. Otofagosom oluşumu ve aktin organizasyonu bulguları birlikte değerlendirildiğinde, *S. pombe* hücrelerinde, tunikamisinin tetiklediği ER stresine bağlı hücre canlılığının düzenlenmesinde, otofajinin etkin olabileceğini düşündürdü.

Tez çalışmasının birinci kısmında, *S. pombe* yabani ırkında yapılan morfolojik ve fizyolojik deneylerin sonucunda, tunikamisin antibiyotiğinin tetiklediği ER stresine bağlı gelişen hücre canlılığının/ölümünün düzenlenmesinde apoptozdan ziyade otofaji sürecinin etkili olduğu

tespit edildi. İkinci kısmında ise, ER'nin işlevi dikkate alınarak, UPR (*ire1* ve *gpt1*), otofaji (*atg8*, *atg15* ve *trs85*), apoptoz (*aif1*), sinyal iletimi (*prz1*) ve hücre iskeleti (*myo51* ve *myo52*) süreçlerine dahil olan genlerin bu mekanizmalarda oynadıkları rolleri belirlemek amacıyla, ilgili genleri delesyonlu *S. pombe* mutantlarında (Haploid *S. pombe* kitaplığı, Bioneer, Version 5.0), tunikamisin (1 µg/mL; 1, 4 ve 24 saat) hücre canlılığı ve hücre içi oksidasyon düzeyine etkisi araştırıldı.

Tunikamisinin hücre canlılığına etkisi çalışmalarında, öncelikle, parental ırkın tunikamisin (1 µg/mL) antibiyotiğine karşı duyarlılığının yabani ırkın aynı dozda uygulanan tunikamisin duyarlılığına benzer bir profil (Şekil 4.1) sergilemesi, aynı koşullarda mutantların vereceği yanıtın normalizasyonunda kullanıldı.

ER'de katlanmamış protein sensörü olan ve endoribonükleaz aktivitesi bulunan Ire1 proteininin ER stresine yanıt olarak RNA ve protein seviyesinde arttığı (Kimmig ve diğ., 2012); buna bağlı olarak hücre sağkalımı için önemli olan, Bip1 proteininin poli-A kuyruğunun RIDD tarafından tanınıp kesilerek kararlı hale getirildiği rapor edilmiştir (Frost ve diğ., 2012). Bu çalışmada, *S. pombe ire1Δ* mutantının tunikamisinin uygulama süresine bağlı olmaksızın duyarlı olması (Şekil 4.7), Frost ve diğ. (2012)'nin belirttiği, *S. pombe*'de Bip1 mutantının daha düşük canlılık gösterdiği sonuçları ile paralellik göstermektedir. Diğer tarafta, bu mutantta tunikamisinin 4 saatlik uygulamasında ROT artışında istatistiki olarak anlamlılık bulunmazken, 24 saatlik uygulamasında ROT artışının anlamlı olduğu hesaplandı (Şekil 4.8).

S. pombe gpt1 geninin kodladığı UDP-glukoz-glikoprotein glukoziltransferaz (Gpt1) proteini, ER ile ilişkili yanlış katlanmış proteinlerin katabolik sürecinde, N-glikan işlenmesinde ve protein glikozilasyonunda görev aldığı ve stres koşullarında RNA seviyesinde artış olduğu rapor edilmiştir (Fernandez ve diğ., 1996; Fernandez ve diğ., 1998). Gpt1'in ER stresinin hafifletilmesinde görevli Ire1'e benzer işlev göstermesi (Frost ve diğ., 2012), bu çalışmada, *S. pombe gpt1Δ* mutantının ER stresi altında *S. pombe ire1Δ* mutantının verdiği yanıtı benzer, ancak daha hafif bir düzeyde canlılık sergilemesi (Şekil 4.7), sürecin kararlılığı açısından çok önemlidir.

Otofajinin klasik morfolojisi olarak otofagozomların oluşumunda kritik öneme sahip olan (Kirisako ve diğ., 1999) ve aynı zamanda, seçici otofaji reseptörleri için de bir toplanma platformu görevi üstlenen (Shintani ve diğ., 2002) Atg8'i şifreleyen genin delesyonlu olduğu

S. pombe atg8Δ mutantının ER stresine oldukça duyarlı olduğu bulunması (Şekil 4.7), literatürde rapor edilen *atg8* geni kusurlu hem *Pichia pastoris*'te hem de *S. pombe*'de anormal vakuol morfolojisi (Mukaiyama ve diğ., 2004; Tamura ve diğ., 2010; Mikawa ve diğ., 2010) ile uyumludur. Bu durum, Atg8'in ER stresinde artan yanlış katlanan proteinlerin sindirildiği otofagosom oluşumunda hatta vakuol oluşumunda hayati öneme sahip olduğunu bir kez daha göstermiştir. Buna karşın, otofaji oluşumuna katılan diğer Atg proteinlerinden Atg15 (Otofaji ilişkili lisofosfolipaz) ve Trs85 (TRAPP kompleksi alt birimi) proteinlerini kodlayan genleri delesyonlu olan *S. pombe atg15Δ* ve *S. pombe trs85Δ* mutantlarının aynı koşullarda dirençlilik sergilemesi, Atg15 ve Trs85 proteinlerinin hücre ölüm yolağı ile ilişkilerine işaret eder. Ancak, daha detaylı ilişkiyi ortaya koymak için, bu mutantlarda, aynı koşullar oluşturularak, en azından otofaji ve apoptoz süreçleri araştırılmalıdır. Bu çalışmalar program dahilinde sürdürülmektedir.

Mitokondri iç membranına bağlı oksidoredüktaz ve apoptoz indükleyici faktör olarak tanımlanan Aif1'i kodlayan *aif1* geninin oksidatif stres altında, RNA seviyesinin arttığı (PomBase, 2020) ve Aif1'in kaspaz-bağımsız hücre ölümü yolağında rol oynadığı (Cande ve diğ., 2002) bilinmektedir. Öte yandan, kalsinörine yanıt veren transkripsiyon faktörü, Prz1'in kalsiyum iyonu ve glukoz kıtlığında oluşturulan hücresel yanıtta RNA seviyeleri arttığı bildirilmiştir (PomBase, 2020). Bu çalışmada, *S. pombe aif1Δ* ve *S. pombe prz1Δ* mutantlarının tunikamisinine uygulama süresine bağlı olarak, parental ırkın verdiği ER stres yanıtındaki gibi duyarlılık göstermesi (Şekil 4.7) ve ayrıca, anlamlı bir ROT artışı belirlenmesi, ER stresine karşı gelişen hücresel yanıtların bu genler üzerinden olabilmeye ilişkisini zayıflatmaktadır. Ancak, *S. pombe prz1Δ* mutantının, *S. pombe ire1Δ* mutantınıninkine benzer, ER stresinin 1 saatlik uygulamasına bile duyarlı olması, Prz1 transkripsiyon faktörünün bu süreçlerdeki rollerinin araştırılması gerektiğini düşündürmektedir.

Hücre iskeleti dinamiğinde rol oynayan Tip V miyozin motor proteinleri Myo51 ve Myo52, kargoları aktin filamentlerinin ucuna doğru taşır ve mitotik hücrelerde, Myo52'nin asıl işi yaparken, Myo51'in bu kablolar ve sitokinetik halkaya dekoratif katkı yaptığı bilinmektedir (Lo Presti ve Martin, 2011; Lo Presti ve diğ., 2012; Wang ve diğ., 2014). Bu çalışmada, *S. pombe myo51Δ* mutantının tunikamisinine uygulama süresine bağlı olmaksızın orta düzey duyarlılık sergilerken, *S. pombe myo52Δ*'nin oldukça duyarlı olması, üstelik bu stres koşulunda ROT seviyesinde her iki mutantta artmaması, bu genlerin, özellikle myo52'nin ER stresine karşı geliştirilen yanıtta önemli olduğunu düşündürür.

Bu tez kapsamında elde edilen tüm deneysel veriler bir arada değerlendirildiğinde, ilk kısımda ER stresi ile otofaji ve hücre iskeleti arasında morfolojik ve fizyolojik olarak kurulan ilişki, mutantlarla yapılan çalışma bulguları ile desteklenmiştir. Burada, doz bağımlı olmaksızın *ire1Δ*, *gpt1Δ*, *atg8Δ*, *myo51Δ* ve *myo52Δ* mutantlarının duyarlı, *atg15Δ* ve *trs85Δ* mutantlarının ise dirençli olmasına karşın, *aif1Δ* ve *prz1Δ* mutantlarının, parental ırktaki gibi doz bağımlı olarak duyarlı olması, ER stresine bağlı gelişen ve hücre canlılığının düzenlenme sürecinde, apoptozdan ziyade otofajinin etkin olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte, bu mutantlarda, tunikamisin tetiklediği ER stresinde gözlenen duyarlılık/dirençlilik ve artan ROT seviyelerinin, apoptoz ve otofaji süreçleri ile doğrudan ilişkisinin ortaya konması için apoptoz ve hücre duvarı ile aktin iskeleti deneylerinin yapılması gereklidir ve plan dahilindedir.

KAYNAKLAR

- Adachi, Y., Yamamoto, K., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., Mori, K., 2008, ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell Structure and Function*, 33(1), 75-89.
- Agus, H.H., Sarp, C., & Cemiloglu, M., 2018, Oxidative stress and mitochondrial impairment mediated apoptotic cell death induced by terpinolene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Toxicology research*, 7(5), 848–858.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2013, *Essential Cell Biology*. 4th ed., New York. ISBN: (Hardcover) 978-0815344544.
- Anderson, D.J., & Hetzer, M.W., 2008, Reshaping of the endoplasmic reticulum limits the rate for nuclear envelope formation. *Journal of Cell Biology*, 182(5), 911–924.
- Anwar, K., Klemm, R.W., Condon, A., Severin, K.N., Zhang, M., Ghirlando, R., Hu, J., Rapoport, T.A., ve Prinz, W.A., 2012, The dynaminlike GTPase Sey1p mediates homotypic ER fusion in *S. cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, 197, 209–217.
- Appenzeller-Herzog, C., Hauri, H.P., 2006, The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *The Journal of Cell Science*, 119, 2173-83.
- Araki, K., Nagata, K., 2011, Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(11), a007526.
- Austriaco, N., 2012, Endoplasmic reticulum involvement in yeast cell death. *Frontiers in Oncology*, 2, 87.
- Barlowe, C. K., & Miller, E. A., 2013, Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics*, 193(2), 383–410.
- Baumann, O, Walz, B., 2001, Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *International Review of Cytology*, 205(), 149-214.
- Baxter, B.K., James, P., Evans, T., Craig, E.A., 1996, SSI1 encodes a novel Hsp70 of the *Saccharomyces cerevisiae* endoplasmic reticulum. *Molecular and Cellular Biology*, 16, 6444–6456.
- Bernales, S., McDonald, K.L., Walter, P., 2006, Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biology*, 4, E423.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., Lipp, P., 1998, Calcium – a life and death signal. *Nature*, 395, 645–648.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., Ron, D., 2000, Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded- protein response. *Nature Cell Biology*, 2, 326–332.

- Bian, X., Klemm, R.W., Liu, T.Y., Zhang, M., Sun, S., Sui, X., ... Hu, J., 2011, Structures of the atlastin GTPase provide insight into homotypic fusion of endoplasmic reticulum membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(10), 3976–3981.
- Blobel, G., 1980, Intracellular protein topogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(3), 1496–1500.
- Bommiasamy, H., Back, S.H., Fagone, P., Lee, K., Meshinchi, S., Vink, E., Sriburi, R., Frank, M., Jackowski, S., Kaufman, R.J., Brewer, J.W., 2009, ATF6alpha induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Science*, 122(Pt 10), 1626–36.
- Bonilla, M., Cunningham, K.W., 2003, Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca^{2+} signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 14(10), 4296–305.
- Bonilla, M., Nastase, K.K., Cunningham, K.W., 2002, Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *The EMBO Journal*, 21(10), 2343–53.
- Bonilla, M., Cunningham, K.W., 2002, Calcium release and influx in yeast: TRPC and VGCC rule another kingdom. *Science Signaling*, 127, pe17.
- Boyd, R.F., 1984, *General Microbiology*. Phd. Witz, Virginia.
- Braakman, I., & Hebert, D.N., 2013, Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(5), a013201.
- Bratschi, M.W., Burrowes, D.P., Kulaga, A., Cheung, J.F., Alvarez, A.L., Kearley, J., and Zarembek, V., 2009, Glycerol-3-phosphateacyltransferases gat1p and gat2p are microsomal phosphoproteins with differential contributions to polarized cell growth. *Eukaryot. Cell*, 8, 1184–1196.
- Bukau, B., Horwich, A.L., 1998, The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines. *Cell*, 92, 351–366.
- Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Büttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G., Madeo, F., 2010, Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death and Differentiation*, 17(5), 763–73.
- Chang, F., & Huang, K.C., 2014, How and why cells grow as rods. *BMC Biology*, 12, 54.
- Chen, X., VanValkenburgh, C., Liang, H., Fang, H., Green, N., 2001, Signal peptidase and oligosaccharyltransferase interact in a sequential and dependent manner within the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 276(4), 2411–6.
- Chen, Y., 2005, Identification of mitogen-activated protein kinase signaling pathways that confer resistance to endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cancer Research*, 3, 669–677.

- Chirico, W.J., Waters, M.G., Blobel, G., 1988, 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature*, 332(6167), 805-10.
- Clapham, D.E., 2007, Calcium signaling. *Cell*, 131(6), 1047–1058.
- Cooper, G.M., Hausman, R.E., 2006, *The Cell: A Molecular Approach*, 6th ed., Sinauer Associates, Washington, SBN: (Hardcover) 978-0763739058.
- Cooper, G.M., 2000, *The Endoplasmic Reticulum*. *The Cell: A Molecular Approach*. In: Cooper, G.M. (ed), Chapter 9, Sinauer Associates, Washington.
- Cox, J.S., Walter, P., 1996, A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*, 87(3), 391-404.
- Cox, J.S., Chapman, R.E., Walter, P., 1997, The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Molecular and Cellular Biology*, 8, 1805–1814
- Cox, J.S., Shamu, C.E. Walter, P., 1993, Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic-reticulum resident proteins requires a transmembrane protein-kinase. *Cell*, 73, 1197–1206.
- Credle, J.J.; Finer-Moore, J.S.; Papa, F.R.; Stroud, R.M.; Walter, P., 2005, On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 18773–18784.
- Cross, B.C., Bond, P.J., Sadowski, P.G., Jha, B.K., Zak, J., Goodman, J.M., Silverman, R.H., Neubert, T.A., Baxendale, I.R., Ron, D. et al., 2012, The molecular basis for selective inhibition of unconventional mRNA splicing by an IRE1-binding small molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, E869–E878.
- Cruz, S., Muñoz, S., Manjón, E., García, P., & Sanchez, Y., 2013, The fission yeast cell wall stress sensor-like proteins Mtl2 and Wsc1 act by turning on the GTPase Rho1p but act independently of the cell wall integrity pathway. *MicrobiologyOpen*, 2(5), 778–794.
- Cui, J., Kaandorp, J.A., 2006, Mathematical modeling of calcium homeostasis in yeast cells. *Cell Calcium*, 39, 337–348.
- Cunha, D.A., Hekerman, P., Ladrière, L., Bazarra-Castro, A., Ortis, F., Wakeham, M.C., Moore, F., Rasschaert, J., Cardozo, A.K., Bellomo, E., Overbergh, L., Mathieu, C., Lupi, R., Hai, T., Herchuelz, A., Marchetti, P., Rutter, G.A., Eizirik, D.L., Cnop, M., 2008, Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. *The Journal of Cell Science*, 121(Pt 14), 2308-18.
- De Craene, J. O., Coleman, J., Estrada de Martin, P., Pypaert, M., Anderson, S., Yates, J. R., 3rd, ... Novick, P., 2006, Rtn1p is involved in structuring the cortical endoplasmic reticulum. *Molecular and Cellular Biology*, 17(7), 3009–3020.

- Diakogiannaki, E., Welters, H.J., Morgan, N.G., 2008, Differential regulation of the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic beta-cells exposed to long-chain saturated and monounsaturated fatty acids. *Journal of Endocrinology*, 197(3), 553-63.
- Doma, M.K., Parker, R., 2006, Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature*, 440(7083), 561-4.
- dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A. and Nosworthy, N.J., 2003, Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiological Reviews*, 83, 433-473.
- Doyle A., Martín-García R., Coulton A.T., Bagley S., and Mulvihill D.P., 2009, Fission yeast Myo51 is a meiotic spindle pole body component with discrete roles during cell fusion and spore formation. *The Journal of Cell Science*, 122:4330–4340 10.1242/jcs.055202.
- Dudgeon, D.D., Zhang, N., Ositelu, O.O., Kim, H., Cunningham, K.W., 2008, Nonapoptotic death of *Saccharomyces cerevisiae* cells that is stimulated by Hsp90 and inhibited by calcineurin and Cmk2 in response to endoplasmic reticulum stresses. *Eukaryot Cell*, 7(12), 2037-51.
- Durr, G., Strayle, J., Plemper, R., Elbs, S., Klee, S.K., Catty, P., Wolf, D.H., and Rudolph, H.K., 1998, The medial Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca^{2+} and Mn^{2+} required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum associated protein degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 9, 1149–1162.
- Egel, R., 1989, *Mating-type genes, meiosis, and sporulation*, Molecular biology of the fission yeast, In: Nasim A., Young P., Johnson B.F. (ed), Academic, San Diego.
- Evans, E. A., Gilmore, R., & Blobel, G., 1986, Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(3), 581–585.
- Fagone, P., & Jackowski, S., 2009, Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *Journal of Lipid Research*, S311–S316.
- Falcone, C., & Mazzoni, C., 2016, External and internal triggers of cell death in yeast. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(11-12), 2237–2250.
- Fanchiotti, S., Fernández, F., D'Alessio, C., & Parodi, A.J., 1998, The UDP-Glc:Glycoprotein glucosyltransferase is essential for *Schizosaccharomyces pombe* viability under conditions of extreme endoplasmic reticulum stress. *Journal of Cell Biology*, 143(3), 625–635.
- Farquhar, R., Honey, N., Murant, S.J., Bossier, P., Schultz, L., et al., 1991, Protein disulfide isomerase is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 108, 81–89.
- Fernandez, F., Jannatipour, M., Hellman, U., Rokeach, L.A., & Parodi, A.J., 1996, A new stress protein: synthesis of *Schizosaccharomyces pombe* UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase mRNA is induced by stress conditions but the enzyme is not essential for cell viability. *The EMBO Journal*, 15(4), 705–713.

- Fordyce, P.M., Pincus, D., Kimmig, P., Nelson, C.S., El-Samad, H., Walter, P., DeRisi, J.L., 2012, Basic leucine zipper transcription factor Hac1 binds DNA in two distinct modes as revealed by microfluidic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, E3084–E3093.
- Forsburg, S.L., 2005, The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research. *Journal of the American Society for Gravitational and Space Biology*, 18(2), 3–10.
- Fraering, P., Imhof, I., Meyer, U., Strub, J.M., van Dorsselaer, A., et al., 2001, The GPI transamidase complex of *Saccharomyces cerevisiae* contains Gaa1p, Gpi8p, and Gpi16p. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 3295–3306.
- Fribley, A.M., Cruz, P.G., Miller, J.R., Callaghan, M.U., Cai, P., Narula, N., Neubig, R.R., Showalter, H.D., Larsen, S.D., Kirchhoff, P.D., et al., 2011, Complementary cell-based high-throughput screens identify novel modulators of the unfolded protein response. *Journal of Biomolecular Screening*, 16, 825–835.
- Friedman, J.R., and Voeltz, G.K., 2011, The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network. *Trends Cell Biology*, 21, 709–717.
- Frost, A., Elgort, M.G., Brandman, O., Ives, C., Collins, S.R., Miller-Vedam, L., Weibezahn, J., Hein, M.Y., Poser, I., Mann, M., Hyman, A.A., & Weissman, J.S., 2012, Functional repurposing revealed by comparing *S. pombe* and *S. cerevisiae* genetic interactions. *Cell*, 149(6), 1339–1352.
- Fröhlich, K.U., Madeo, F., 2000, Apoptosis in yeast--a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. *FEBS Letters*, 473(1), 6-9.
- Fujii, Y., Shimizu, T., Toda, T., Yanagida, M., Hakoshima, T., 2000, Structural basis for the diversity of DNA recognition by bZIP transcription factors. *Nature Structural and Molecular Biology*, 7, 889–893.
- Gardner, B.M., Pincus, D., Gotthardt, K., Gallagher, C.M., & Walter, P., 2013, Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3), a013169.
- Gardner, B.M., Walter, P., 2011, Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science*, 333, 1891–1894.
- Gauss, R., Kanehara, K., Carvalho, P., Ng, D.T., Aebi, M., 2011, A complex of Pdi1p and the mannosidase Htm1p initiates clearance of unfolded glycoproteins from the endoplasmic reticulum. *Molecular Cell*, 42, 782–793.
- Gentzsch, M., Tanner, W., 1996, The PMT gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *The EMBO Journal*, 15, 5752–5759.
- Giannattasio, S., Atlante, A., Antonacci, L., Guaragnella, N., Lattanzio, P., Passarella, S., Marra, E., 2008, Cytochrome c is released from coupled mitochondria of yeast en route

to acetic acid-induced programmed cell death and can work as an electron donor and a ROS scavenger. *FEBS Letters*, 582(10), 1519-25.

- Giannattasio, S., Guaragnella, N., Zdravlečić, M., Marra, E., 2013, Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. *Frontiers in Microbiology*, 4, 33.
- Glick, B.S., & Nakano, A., 2009, Membrane traffic within the Golgi apparatus. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25, 113–132.
- Goffin, L., Vodala, S., Fraser, C., Ryan, J., Timms, M., Meusburger, S., Catimel, B., Nice, E.C., Silver, P.A., Xiao, C.-Y., et al., 2006, The Unfolded Protein Response transducer Ire1p contains a nuclear localization sequence recognized by multiple β importins. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 5309–5323.
- Gross, E., Sevier, C.S., Heldman, N., Vitu, E., Bentzur, M., et al., 2006, Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 299–304.
- Guérin, R., Beauregard, P.B., Leroux, A., Rokeach, L.A., 2009, Calnexin regulates apoptosis induced by inositol starvation in fission yeast. *PLoS One*, 4(7), e6244.
- Guydos, N.R., Kimmig, P., Walter, P., Green, R., 2017, Regulated Ire1-dependent mRNA decay requires no-go mRNA degradation to maintain endoplasmic reticulum homeostasis in *S. pombe*. *eLife*, 6.
- Hagan, I.M., Bagley, S., 2016, Fixed cell imaging of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(7).
- Hamasaki, M., Noda, T., Baba M., Ohsumi, Y., 2005, Starvation triggers the delivery of the endoplasmic reticulum to the vacuole via autophagy in yeast. *Traffic*, 6, 56–65.
- Hanada, T., Noda, N.N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., Ohsumi, Y., 2007, The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *Journal of Biological and Chemical Sciences*, 282:37298–37302.
- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., Ron, D., 2000, Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular Cell*, 6(5), 1099-108.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D., 1999, Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397(6716), 271-4.
- Hartl, F.U., 1996, Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381, 571–579.
- Hauptmann, P., Riel, C., Kunz-Schughart, L.A., Fröhlich, K.U., Madeo, F., Lehle, L., 2006, Defects in N-glycosylation induce apoptosis in yeast. *Molecular Microbiology*, 59(3), 765-78.

- Hauptmann, P., and Lehle, L., 2008, Kex1 protease is involved in yeast cell death induced by defective N-glycosylation, acetic acid, and chronological aging. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 19151–19163.
- Hayles, J., Nurse, P., 2018, Introduction to Fission Yeast as a Model System. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(5).
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K., 1999, Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Molecular Biology of the Cell*, 10(11), 3787-99.
- Heinisch, J.J., 2005, Baker's yeast as a tool for the development of antifungal kinase inhibitors—targeting protein kinase C and the cell integrity pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1754(1–2): 171-182.
- Hendershot, L.M., 2004, The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mount Sinai Journal of Medicine*, 71(5), 289-97.
- Henry, S.A., Kohlwein, S.D., Carman, G.M., 2012, Metabolism and regulation of glycerolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190, 317–349.
- Hernández-Elvira, M., Torres-Quiroz, F., Escamilla-Ayala, A., Domínguez-Martin, E., Escalante, R., Kawasaki, L., Coria, R., 2018, The Unfolded Protein Response Pathway in the Yeast *Kluyveromyces lactis*. A Comparative View among Yeast Species. *Cells*, 7(8), 106.
- Hiraoka, Y., Toda, T., Yanagida, M., 1984, The NDA3 gene of fission yeast encodes β -tubulin: A cold-sensitive *nda3* mutation reversibly blocks spindle formation and chromosome movement in mitosis. *Cell*, 39: 349–358.
- Hitoshi, N., 2020, Autophagic degradation of the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, B 96.
- Hoffman, C.S., Wood, V., & Fantes, P.A., 2015, An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System. *Genetics*, 201(2), 403–423.
- Hollien, J., Weissman, J.S., 2006, Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science*, 313(5783), 104-7.
- Hu, J., Prinz, W.A., Rapoport, T.A., 2011, Weaving the web of ER tubules. *Cell*, 147, 1226–1231.
- Hu, J., Shibata, Y., Zhu, P. P., Voss, C., Rismanchi, N., Prinz, W.A., Rapoport, T.A., Blackstone, C., 2009, A class of dynamin-like GTPases involved in the generation of the tubular ER network. *Cell*, 138, 549–561.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., et al., 2000, A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 408:488–492.

- Iqbal, J., Dai, K., Seimon, T., Jungreis, R., Oyadomari, M., Kuriakose, G., Ron, D., Tabas, I., Hussain, M.M., 2008, IRE1 β inhibits chylomicron production by selectively degrading MTP mRNA. *Cell Metabolism*, 7, 445–455.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U., Pestova, T.V., 2010, The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(2), 113-27.
- Jaffe, L.F., 1983, Sources of calcium in egg activation: a review and hypothesis. *Developmental Biology*, 99(2), 265-76.
- Jan, C.H., Williams, C.C., & Weissman, J.S., 2014, Principles of ER cotranslational translocation revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science*, 346(6210), 1257521.
- Jin, M., Klionsky, D.J., 2014, Regulation of autophagy: modulation of the size and number of autophagosomes. *FEBS Letters*, 588(15), 2457-63.
- Johansen, T., Lamark, T., 2019, Selective autophagy: ATG8 family proteins, LIR motifs and cargo receptors. *Journal Molecular Biology*, 80-103.
- Kaksonen, M., Sun, Y., Drubin, D.G., 2003, A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell*, 115:475–487.
- Kamasaki, T., Arai, R., Osumi, M. and Mabuchi, I., 2005, Directionality of F-actin cables changes during the fission yeast cell cycle. *Nature Cell Biology*, 7, 916-917.
- Kaufman, R.J., 1999, Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes and Development*, 13(10), 1211-33.
- Kelleher, D.J., Gilmore, R., 2006, An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology*, 16(4), 47R-62R.
- Kerr, J.F., 2002, History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, 181–182, 471–474.
- Kharroubi, I., Ladrière, L., Cardozo, A.K., Dogusan, Z., Cnop, M., Eizirik, D.L., 2004, Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology*, 145(11), 5087-96.
- Kim, H., Kim, A., Cunningham, K.W., 2012, Vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) promotes vacuolar membrane permeabilization and nonapoptotic death in stressed yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19029-39.
- Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Ito, T., Hirata, A., Suzuki, T., Oikawa, D., Takeuchi, M., Kohno, K., 2007, Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins. *Journal of Cell Biology*, 179, 75–86.

- Kimata, Y., Kimata, Y.I., Shimizu, Y., Abe, H., Farcasanu, I.C., Takeuchi, M., Rose, M.D., Kohno, K., 2003, Genetic evidence for a role of BiP/Kar2 that regulates Ire1 in response to accumulation of unfolded proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 14, 2559–2569.
- Kimmig, P., Diaz, M., Zheng, J., Williams, C.C., Lang, A., Aragón, T., Li, H., Walter, P., 2012, The unfolded protein response in fission yeast modulates stability of select mRNAs to maintain protein homeostasis. *Elife.*, 1, e00048.
- Kimura, T., Hosoda, Y., Sato, Y., Kitamura, Y., Ikeda, T. et al., 2005, Interactions among yeast protein-disulfide isomerase proteins and endoplasmic reticulum chaperone proteins influence their activities. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 31438–31441.
- Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., Ohsumi, Y., 1999, Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *Journal of Cell Biology*, 147:435–446.
- Kock, C., Dufrêne, Y.F., & Heinisch, J.J., 2015, Up against the wall: is yeast cell wall integrity ensured by mechanosensing in plasma membrane microdomains? *Applied and Environmental Microbiology*, 81(3), 806–811.
- Korennykh, A.V., Egea, P.F., Korostelev, A.A., Finer-Moore, J., Zhang, C., Shokat, K.M., Stroud, R.M., Walter, P., 2009, The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. *Nature*, 457(7230), 687–93.
- Kovar, D.R., Sirotkin, V., and Lord, M., 2011, Three's company: the fission yeast actin cytoskeleton. *Trends Cell Biology*, 21:177–187.
- Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M.J., and Sambrook, J., 1988, The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*, 332, 462–464.
- Kurahashi, H., Imai Y., and Yamamoto, M., 2002, Tropomyosin is required for the cell fusion process during conjugation in fission yeast. *Genes Cells*, 7:375–384.
- Laboissiere, M.C., Sturley, S.L., Raines, R.T., 1995, The essential function of protein-disulfide isomerase is to unscramble non-native disulfide bonds. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 28006–28009.
- Latgé, J.P., 2007, The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*, 66:279–290.
- Leupold, U., 1950, Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *Comptes rendus des travaux du laboratoire Carlsberg*, 24, 381.
- Lin, J.H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H.R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K.M., Lavail, M.M., Walter, P., 2007, IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science*, 318(5852), 944–9.

- Lindner, P., 1893, *Schizosaccharomyces pombe* n.sp., ein neuer Gährungserreger. *Wochenschrift für Brauerei* 10, 1298–1300.
- Lo Presti, L., and Martin, S.G., 2011, Shaping fission yeast cells by rerouting actin-based transport on microtubules. *Current Biology*, 21:2064–2069.
- Lo Presti, L., Chang, F., Martin, S.G., 2012, Myosin Vs organize actin cables in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 23:4579–4591.
- Ludovico, P., Sousa, M.J., Silva, M.T., Leão, C., Côrte-Real, M., 2001, *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology*, 147(Pt 9), 2409-15.
- Lyman, S.K., Schekman, R., 1996, Polypeptide translocation machinery of the yeast endoplasmic reticulum. *Experientia*, 52, 1042–1049.
- Madeo, F., Fröhlich, E., Fröhlich, K.U., 1997, A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 139(3), 729-34.
- Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S.J., Wolf, D.H., Fröhlich, K.U., 1999, Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *Journal of Cell Biology*, 145(4), 757-67.
- Marks, J., Hyams, J.S., 1985, Localisation of F-actin through the cell-division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Biology*, 39, 27-32.
- Martin, S., 2009, Microtubule-dependent cell morphogenesis in the fission yeast, *Cell Biology*, 19(9):447-54.
- Matsuhara, H., Yamamoto, A., 2016, Autophagy is required for efficient meiosis progression and proper meiotic chromosome segregation in fission yeast. *Genes to Cells*, 21(1), 65-87.
- Mertins, P., Gallwitz, D., 1987, A single intronless action gene in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: nucleotide sequence and transcripts formed in homologous and heterologous yeast. *Nucleic Acids Research*, 15, 7369-7379.
- Meyer, D.I., Krause, E., Dobberstein, B., 1982, Secretory protein translocation across membranes-the role of the docking protein. *Nature*, 297(5868), 647-50.
- Mikawa, T., Kanoh, J., Ishikawa, F., 2010, Fission yeast Vps1 and Atg8 contribute to oxidative stress resistance. *Genes Cells*, 15:229–242.
- Miller, M., 2009, The importance of being flexible: The case of basic region leucine zipper transcriptional regulators. *Current Protein and Peptide Science*, 10, 244–269.
- Mimura, N., Fulciniti, M., Gorgun, G., Tai, Y.T., Cirstea, D., Santo, L., Hu, Y., Fabre, C., Minami, J., Ohguchi, H., et al., 2012, Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1 α is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood*, 119, 5772–5781.

- Mitchison, J.M., 1990, The fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *BioEssays*, 12(4), 189-91.
- Moat, A.G., Foster, J.V., 1988, *Scope of microbial physiology*, 2nd edition, John Wiley and Sons New York.
- Mochida, K., Oikawa, Y., Kimura, Y., Kirisako, H., Hirano, H., Ohsumi, Y., Nakatogawa, H., 2015, Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus. *Nature*, 522(7556), 359–362.
- Mori, K., 2009, Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals. *Journal of Biological Chemistry*, 146(6), 743-50.
- Mori, K., Kawahara, T., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., 1996, Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: Transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes to Cells*, 1, 803–817.
- Mori, K., Ma, W., Gething, M.J., Sambrook, J., 1993, A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell*, 74, 743–756.
- Motegi, F., Arai, R., Mabuchi, I., 2001, Identification of two type V myosins in fission yeast, one of which functions in polarized cell growth and moves rapidly in the cell. *Molecular Biology of the Cell*, 12:1367–1380.
- Mukaiyama, H., Baba, M., Osumi, M., Aoyagi, S., Kato, N., Ohsumi, Y., Sakai, Y., 2004, Modification of a ubiquitin-like protein Paz2 conducted micropexophagy through formation of a novel membrane structure. *Molecular and Cellular Biology*, 15:58–70.
- Mukaiyama, H., Nakase, M., Nakamura, T., Kakinuma, Y., Takegawa, K., 2010, Autophagy in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Letters*, 584(7):1327-34.
- Nakatogawa, H., 2020, Autophagic degradation of the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 96(1), 1–9.
- Nandakumar, J., Cech, T.R., 2013, Finding the end: Recruitment of telomerase to telomeres. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14, 69–82.
- Nikawa, J., Yamashita, S., 1992, IRE1 encodes a putative protein kinase containing a membrane-spanning domain and is required for inositol phototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 6, 1441–1446.
- Nilsson, I., von Heijne, G., 1993, Determination of the distance between oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 5798–5801.
- Nishikawa, S.I., Fewell, S.W., Kato, Y., Brodsky, J.L., Endo, T., 2001, Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. *Journal of Cell Biology*, 153, 1061–1070.

- Niwa, O., Matsumoto, T., Chikashige, Y., Yanagida, M., 1989, Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* minichromosome deletion derivatives and a functional allocation of their centromere. *The EMBO Journal*, 8: 3045–3052.
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P., Ron, D., 2001, Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α . *Journal of Cell Biology*, 153(5), 1011–22.
- Nuoffer, C., Horvath, A., Riezman, H., 1993, Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 10558–10563.
- Oikawa, D., Kimata, Y., Kohno, K., 2007, Self-association and BiP dissociation are not sufficient for activation of the ER stress sensor Ire1. *The Journal of Cell Science*, 120, 1681–1688.
- Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, A., Kohno, K., 2000, Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279, 445–450.
- Orlean, P., 1990, Dolichol phosphate mannose synthase is required in vivo for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, O mannosylation, and N glycosylation of protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 10, 5796–5805.
- Orlean, P., Menon, A., 2007, Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycopospholipids. *Journal of Lipid Research*, 48, 993–1011.
- Orso, G., Pendin, D., Liu, S., Tassetto, J., Moss, T.J., Faust, J. E., Micaroni, M., Egorova, A., Martinuzzi, A., McNew, J.A., Daga, A., 2009, Homotypic fusion of ER membranes requires the dynamin-like GTPase atlastin. *Nature*, 460, 978–983.
- Özarabacı, İ., 2019, *Schizosaccharomyces pombe*'de endoplazmik retikulum stresi ile apoptoz arasındaki ilişki, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi.
- Palade, G., 1975, Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, 189, 347–358.
- Papandreou, I., Denko, N.C., Olson, M., Van Melckebeke, H., Lust, S., Tam, A., Solow-Cordero, D.E., Bouley, D.M., Offner, F., Niwa, M., et al., 2011, Identification of an Ire1 α endonuclease specific inhibitor with cytotoxic activity against human multiple myeloma. *Blood*, 117, 1311–1314.
- Pelham, R.J.Jr., Chang, F., 2001, Role of actin polymerization and actin cables in actin-patch movement in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature Cell Biology*, 3, 235–244.
- Pereira, C., Silva, R.D., Saraiva, L., Johansson, B., Sousa, M.J., Côrte-Real, M., 2008, Mitochondria-dependent apoptosis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783(7), 1286–302.

- Petersen, J., Russell, P., 2016, Growth and the environment of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(5).
- Petersen, J., Nielsen, O., Egel, R., Hagan, I.M., 1998, F-actin distribution and function during sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of Cell Science*, 111:867–876.
- Petrova, B., Dehler, S., Kruitwagen, T., Heriche, J.K., Miura, K., Haering, C.H., 2013, Quantitative analysis of chromosome condensation in fission yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 33, 984–998.
- Pidoux, A.L., Armstrong, J., 1993, The BiP protein and the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe*: Fate of the nuclear envelope during cell division. *The Journal of Cell Science*, 105, 1115–1120.
- Piel, M., Tran, P.T., 2009, Cell shape and cell division in fission yeast, *Current Biology*, 19(17):R823-7.
- Pineau, L., Colas, J., Dupont, S., Beney, L., Fleurat-Lessard, P., Berjeaud, J.-M., Bergès, T., Ferreira, T., 2009, Lipid-induced ER stress: Synergistic effects of sterols and saturated fatty acids. *Traffic*, 10, 673–690.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L., Mullins, R.D., 2000, Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 29, 545-576.
- Rapoport, T.A., 2007, Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*, 450(7170), 663–669.
- Robinow, C.F., 1977, The number of chromosomes in *Schizosaccharomyces pombe*: Light microscopy of stained preparations. *Genetics*, 87, 491–497.
- Scheuner, D., Song, B., McEwen, E., Liu, C., Laybutt, R., Gillespie, P., Saunders, T., Bonner-Weir, S., Kaufman, R.J., 2001, Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Molecular Cell*, 7(6), 1165-76.
- Schwarz, F., Aeby, M., 2011, Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology*, 21(5), 576-82.
- Schwarz, D.S., Blower, M.D., 2016, The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(1), 79–94.
- Seiser, R.M., Nicchitta, C.V., 2000, The fate of membrane-bound ribosomes following the termination of protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(43), 33820-7.
- Severin, F.F., Meer, M.V., Smirnova, E.A., Knorre, D.A., Skulachev, V.P., 2008, Natural causes of programmed death of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783, 1350–1353.

- Sevier, C.S., Qu, H., Heldman, N., Gross, E., Fass, D., et al., 2007, Modulation of cellular disulfide-bond formation and the ER redox environment by feedback regulation of Ero1. *Cell*, 129, 333–344.
- Shamu, C.E., Walter, P., 1996, Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *The EMBO Journal*, 15, 3028–3039.
- Shibata, Y., Voeltz, G.K., Rapoport, T.A., 2006, Rough sheets and smooth tubules. *Cell*, 126(3), 435–439.
- Shibata, Y., Shemesh, T., Prinz, W.A., Palazzo, A.F., Kozlov, M.M., Rapoport, T.A., 2010, Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER. *Cell*, 143(5), 774–788.
- Shibata, Y., Voss, C., Rist, J.M., Hu, J., Rapoport, T.A., Prinz, W.A., Voeltz, G.K., 2008, The reticulon and DP1/Yop1p proteins form immobile oligomers in the tubular endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 283(27), 18892–18904.
- Shintani, T., Huang, W.P., Stromhaug, P.E., Klionsky, D.J., 2002, Mechanism of cargo selection in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Developmental Cell*, 3:825–837.
- Shoemaker, C.J., Green, R., 2012, Translation drives mRNA quality control. *Nature Structural and Molecular Biology*, 19(6), 594–601.
- Sidrauski C, Cox JS, Walter P., 1996, tRNA ligase is required for regulated mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, 87(3), 405–13.
- Sidrauski, C., Walter, P., 1997, The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, 90, 1031–1039.
- Smith, M.H., Ploegh, H.L., Weissman, J.S., 2011, Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science*, 334(6059), 1086–90.
- Sorin, A., Rosas, G., Rao, R., 1997, PMR1, a Ca^{2+} -ATPase in yeast Golgi, has properties distinct from sarco/endoplasmic reticulum and plasma membrane calcium pumps. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 9895–9901.
- Staehelin, L.A., 1997, The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *The Plant Journal*, 11(6), 1151–65.
- Steel, G.J., Brownsword, J., Stirling, C.J., 2002, Tail-anchored protein insertion into yeast ER requires a novel posttranslational mechanism which is independent of the SEC machinery. *Biochemistry*, 41, 11914–11920.
- Strahl-Bolsinger, S., Gentzsch, M., Tanner, W., 1999, Protein O-mannosylation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1426, 297–307.
- Strayle, J., Pozzan, T., Rudolph, H.K., 1999, Steady-state free Ca^{2+} in the yeast endoplasmic reticulum reaches only 10 microM and is mainly controlled by the secretory pathway pump pmr1. *The EMBO Journal*, 18, 4733–4743.

- Suzuki, K., 2013, Selective autophagy in budding yeast. *Cell Death and Differentiation*, 20(1), 43-8.
- Tabas, I., Ron, D., 2011, Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature Cell Biology*, 13(3), 184-90.
- Takaine, M., Mabuchi, I., 2007, Properties of actin from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* and interaction with fission yeast profilin. *Journal of Biological Chemistry*, 27;282(30):21683-94.
- Takatsuki, A., Arima, K., Tamura, G., 1971, Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin. *The Journal of Antibiotics*, (4), 215-23.
- Tamura, N., Oku, M., Sakai, Y., 2010, Atg8 regulates vacuolar membrane dynamics in a lipidation-independent manner in *Pichia pastoris*. *The Journal of Cell Science*, 123:4107–4116. doi: 10.1242/jcs.070045.
- Terasaki, M., Shemesh, T., Kasthuri, N., Klemm, R.W., Schalek, R., Hayworth, K.J., ... Kozlov, M.M., 2013, Stacked endoplasmic reticulum sheets are connected by helicoidal membrane motifs. *Cell*, 154(2), 285–296.
- Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., Walter, P., 2000, Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*, 101(3), 249-58.
- Tsuboi, T., Kuroha, K., Kudo, K., Makino, S., Inoue, E., Kashima, I., Inada, T., 2012, Dom34:hbs1 plays a general role in quality-control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA. *Molecular Cell*, 46(4), 518-29.
- Tu, B.P., Weissman, J.S., 2002, The FAD- and O₂-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Molecular Cell*, 10, 983–994.
- Udenfriend, S., Kodukula, K., 1995, How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 563–591.
- Van Anken, E., Pincus, D., Coyle, S., Aragón, T., Osman, C., Lari, F., Gómez Puerta, S., Korennykh, A.V., Walter, P., 2014, Specificity in endoplasmic reticulum-stress signaling in yeast entails a step-wise engagement of HAC1 mRNA to clusters of the stress sensor Ire1. *eLife*, 3, e05031.
- Vashist, S., Frank, C.G., Jakob, C.A., Ng, D.T., 2002, Two distinctly localized p-type ATPases collaborate to maintain organelle homeostasis required for glycoprotein processing and quality control. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 3955–3966.
- Voeltz, G.K., Prinz, W.A., Shibata, Y., Rist, J.M., Rapoport, T.A., 2006, A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell*, 124(3), 573-86.
- Voeltz, G.K., Rolls, M.M., Rapoport, T.A., 2002, Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Reports*, 3(10), 944–950.

- Vogel, J.P., Misra, L.M., Rose, M.D., 1990, Loss of BiP/GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast. *Journal of Cell Biology*, 110, 1885–1895.
- Volkman, K., Lucas, J.L., Vuga, D., Wang, X., Brumm, D., Stiles, C., Kriebel, D., Der-Sarkissian, A., Krishnan, K., Schweitzer, C., et al., 2011, Potent and selective inhibitors of the inositol-requiring enzyme 1 endoribonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 12743–12755.
- Walter, P., Blobel, G., 1981, Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *Journal of Cell Biology*, 91(2 Pt 1), 551–556.
- Walter, P., and Ron, D., 2011, The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334, 1081–1086.
- Wang, N., Lo Presti, L., Zhu, Y.H., Kang, M., Wu, Z., Martin, S.G., Wu, J.Q., 2014, The novel proteins Rng8 and Rng9 regulate the myosin-V Myo51 during fission yeast cytokinesis. *Journal of Cell Biology*, 205:357–375.
- Wang, X.Z., Kuroda, M., Sok, J., Batchvarova, N., Kimmel, R., Chung, P., Zinszner, H., Ron, D., 1998, Identification of novel stress-induced genes downstream of chop. *The EMBO Journal*, 17(13), 3619–30.
- Watson, P., Stephens, D.J., 2005, ER-to-Golgi transport: form and formation of vesicular and tubular carriers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1744, 304–315.
- West, M., Zurek, N., Hoenger, A., Voeltz, G.K., 2011, A 3D analysis of yeast ER structure reveals how ER domains are organized by membrane curvature. *Journal of Cell Biology*, 193(2), 333–346.
- Westrate, L.M., Lee, J.E., Prinz, W.A., Voeltz, G.K., 2015, Form follows function: the importance of endoplasmic reticulum shape. *Annual Review of Biochemistry*, 84, 791–811.
- Willer, T., Valero, M.C., Tanner, W., Cruces, J., Strahl, S., 2003, O-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease. *Current Opinion in Structural Biology*, 13, 621–630.
- Wixon, J., 2002, Featured Organism: *Schizosaccharomyces pombe*, the fission yeast. *Comparative and Functional Genomics*, 3, 194–204.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., et al., 2002, The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 415, 871–880.
- Wu, D., Yotnda, P., 2011, Production and Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cancers. *The Journal of Visualized Experiments*, (57):3357.

- Wu, H., Ng, B.S., Thibault, G., 2014, Endoplasmic reticulum stress response in yeast and humans. *Bioscience Reports*, 34(4), e00118.
- Yadav, R.K., Chae, S.W., Kim, H.R., Chae, H.J., 2014, Endoplasmic reticulum stress and cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, 19(2), 75–88.
- Yamashita, A., Sakuno, T., Watanabe, Y., Yamamoto, M., 2016, Schizosaccharomyces pombe meiosis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(9).
- Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., Klionsky, D.J., 2006, Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 30299–30304.
- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K., 1998, Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, 273(50), 33741-9.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K., 2001, XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 107(7), 881-91.
- Zientara-Rytter, K., Subramani, S., 2019, Mechanistic insights into the role of Atg11 in selective autophagy. *Journal of Molecular Biology*, 432(1).
- Zimmermann, R., Eyrisch, S., Ahmad, M., Helms, V., 2011, Protein translocation across the ER membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808, 912–924.
- Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, J.L., Ron, D., 1998, CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes and Development*, 12(7), 982-95.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Nezahat Gökçe Özşamur
Doğum Yeri	Mersin
Doğum Tarihi	23.06.1993
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	0 554 743 93 74
E-Posta Adresi	ng.ozsamur@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	07.06.2016

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı	Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik