

**ZAYIF ASİT STRESİNİN *CYC1* VE *GPD1* GENLERİNİN  
TRANSKRİPSİYONUNA VE HÜCRE DÖNGÜSÜNE  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Gözde ARSLAN**



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

**ZAYIF ASİT STRESİNİN *CYCI* VE *GPD1* GENLERİNİN  
TRANSKRİPSİYONUNA VE HÜCRE DÖNGÜSÜNE ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**Gözde ARSLAN  
0000-0001-7225-0138**

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

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

**BURSA-2020  
Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ ONAYI

Gözde Arslan tarafından hazırlanan "Zayıf Asit Stresinin *CYCI* ve *GPD1* Genlerinin Transkripsiyonuna ve Hücre Döngüsüne Etkilerinin İncelenmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/~~oy çokluğu~~ ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

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

İmza  
Sezai TÜRKEK

**Üye:** Dr. Öğr. Üyesi Burcu ERBAYKENT TEPEDELEN  
0000-0002-9565-6349  
B.U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza  
Burcu ERBAYKENT TEPEDELEN

**Üye:** Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER  
0000-0002-0290-1166  
Bursa Teknik Üniversitesi,  
Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi,  
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

İmza  
Gökçe TANER

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN  
Enstitü Müdürü

25/09/2020

### Bilimsel Etik Bildirim Sayfası

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

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

**beyan ederim.**

23/09/2020

Gözde ARSLAN

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ZAYIF ASİT STRESİNİN *CYCI* VE *GPD1* GENLERİNİN TRANSKRİPSİYONUNA VE HÜCRE DÖNGÜSÜNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

**Gözde ARSLAN**

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

**Danışman:** Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Mikroorganizmalar üreme ortamına metabolik aktiviteleri sonucu oluşan çeşitli organik asitleri salgılamaktadır. Mikroorganizma türüne göre değişebilen bu organik asitler laktik asit, sitrik asit, asetik asit ve suksinik asit olabilir. Bu çalışmada laktik asit, sitrik asit ve asetik asitin *S. cerevisiae*'da sitokrom 1 geni ve *GPD1* geni transkripsiyonuna ve ayrıca hücre bölünmesine etkileri incelendi. Sitokrom C1 (*CYCI*) geni, Sitokrom C izoform-1 olarak da bilinen peptidi kodlamaktadır. Sitokrom C1 elektron taşıma zincirinde yer almakla birlikte apoptozu başlatıcı faktör olarak da işlev görür. *GPD1* geni tarafından kodlanan NAD-bağımlı gliserol 3-fosfat dehidrogenaz enzimi de hem gliserol biyosentezi hem de hücrede redoks dengesi, (NAD/NADH) için gereklidir. Araştırmalarımızdan elde edilen sonuçlar sitrik asitin *CYCI* transkripsiyonunu baskıladığını fakat *GPD1* transkripsiyonunu ise 3-4 kat aktive ettiğini göstermektedir. Laktik asitin ise *CYCI* geni transkripsiyonuna önemli bir etkisinin olmadığı fakat *GPD1* transkripsiyonunu 3 kat aktive ettiği gösterilmiştir. Apoptozu aktive eden asetik asitin ise hem *CYCI* ve hem de *GPD1* transkripsiyonunda önemli ölçüde baskılamaya neden olduğu bulunmuştur. Sitrik asit stresine yanıt olarak *GPD1* transkripsiyonundaki aktivasyonun tamamen protein kinaz Hog1p`ye bağlı olduğu bulundu. Ancak stresle aktive edilen transkripsiyon faktörleri olan Msn2p, War1p ve Haa1pnin *GPD1* transkripsiyonunun aktivasyonu için gerekli olmadığı görüldü. Bu sonuçlara ek olarak, sitrik asit stresinin *S. cerevisiae*'da hücre bölünmesinde anomaliye neden olduğu da bulundu. Elde edilen sonuçlar zayıf asit stresinin *GPD1* ve *CYCI* geni transkripsiyonlarına etki ettiğini ve hücre bölünmesinde anomaliye neden olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *CYCI*, Hücre Döngüsü, Transkripsiyon, Zayıf asit, Sitrik asit

**2020, XII+ 55 sayfa**

## ABSTRACT

M.Sc. Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF WEAK ACID STRESS ON THE CELL CYCLE AND  
TRANSCRIPTION OF *CYC1* AND *GPD1* GENES

**Gözde ARSLAN**

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

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

Microorganisms secrete various organic acids, such as citric acid, lactic acid, acetic acid, and succinic acid, to their growth medium as a result of their metabolic activities. The type of these acids can vary depending on the microorganism's species. In this research, the effects of citric acid, lactic acid, and acetic acid on the transcription of *GPD1* and *CYC1* gene was investigated in *S. cerevisiae*. Besides, the effects of these organic acids on the cell division were also analyzed. Cytochrome C-1 (*CYC1*) gene encodes cytochrome C-isoform 1 peptide, which involves in the electron transfer chain in mitochondria and activation of apoptosis. *GPD1* gene encodes NAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase enzyme required for the redox balance (NAD/NADH ratio) and also catalyzes an essential step in glycerol biosynthesis in yeast. The results of this study indicated that citric acid represses the transcription of the *CYC1* gene, but it activates the transcription of the *GPD1* gene up to 3 to 4-fold. Acetic acid that activates apoptosis represses the transcription of *CYC1* and *GPD1* genes at significant levels. Moreover, our results indicated that citric acid-dependent activation of *GPD1* transcription completely depends on the protein kinase Hog1p. Unlike Hog1p, it seems that the stress-activated transcription factors Msn2p, War1p, and Haa1p are not required for the activation of *GPD1* gene transcription. Also, it appears that citric acid stress also results in abnormal cell division in *S. cerevisiae*. Altogether, the results of this research indicated that weak acid stress affects the transcription of *GPD1* and the *CYC1* gene and cause abnormal cell division in *S. cerevisiae*.

**Keywords:** *CYC1*, Cell cycle, Citric acid, Transcription, Weak acid

**2020, XII + 55 pages**

## TEŞEKKÜR

Lisans dönemimde laboratuvarında çalışma fırsatı verip beni laboratuvarına staja kabul eden ve bu çalışma sonrasında yönümü akademiye çevirmemi sağlayan ayrıca yüksek lisans eğitimim boyunca ders sürecimde ve tez çalışmamda hem akademik olarak danışmanlık yaparak bu alanda kendimi geliştirmemi sağlayan, ayrıca bilgisine hayranlık duyduğum, gerek bilimsel, gerek idari, gerek insanlık konusunda kendime idol olarak gördüğüm sayın danışmanım **Prof. Dr. Sezai Türkel**'e ve laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan değerli yüksek lisans arkadaşlarım **Günay İbrahimova** ve **Thomas S. Peters**'e teşekkürler ederim.

Bu tez araştırmasında kullandığımız *GPD1-LacZ* ve *CYCI-LacZ* gen füzyonu vektörlerini sağlayan değerli bilim insanları **Prof.Dr. Stefan Hohmann**'a (**University of Gothenburg-İsveç**) ve **Prof.Dr. Philip J Farabaugh**'a (**University of Maryland**) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez çalışmalarımda önemli bir yeri olan *S. cerevisiae* suşlarının mikroskop görüntülerinin alınmasında teknik yardımları için **Prof.Dr. Sevcan Çelenk** ve onun yüksek lisans öğrencilerine teşekkürler ederim.

Yüksek lisans eğitimimiz süresinde beraber yürüdüğüm, arkadaşta ziyade benim için aile gibi olan **Engin Hacıoğlu**'na, **Yusuf Yay**'a, **Gökçen Güvenç**'e, **Ayşenur Baş**'a, **Ebru Yalçın**'a ve tüm yüksek lisans dönem arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak da yüksek lisans öğrenimim süresince daima, maddi, manevi yanımda olan canım aileme, öğrenimimi sürdürmemi benden çok isteyen daima destekleyen; annem **Vahide Arslan**'a, her başarımda benden daha çok mutlu olan babam **Zeki Arslan**'a, dünyanın en iyi ablası olarak sürekli beni dinleyen **Özge Karagöz**'e ve bu süreç için beni en çok cesaretlendiren canım abim **Barış Karagöz**'e sevgimi sunar ve sonsuz teşekkür ederim.

Gözde ARSLAN  
23 / 09 / 2020

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	2
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nın Genetik Yapısı ve Hücresel Özellikleri .....	2
2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'da Hücre Döngüsünün Kontrol Mekanizmaları .....	7
2.3. <i>GPD1</i> ve <i>CYC1</i> Genlerinin Promotor Yapıları ve Kontrol Mekanizmaları.....	10
2.4. Zayıf Asit Stresi ve Metabolik Önemi.....	15
2.5. Asit Stresine Hücresel Yanıtın Moleküler Mekanizması .....	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM .....	26
3.1. Araştırmada Kullanılan Maya Suşları ve Üreme Koşulları.....	26
3.2. <i>GPD1-LacZ</i> ve <i>CYC1-LacZ</i> Vektörlerinin Yapısı. ....	27
3.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Suşlarına Transformasyon .....	28
3.4. <i>S. cerevisiae</i> Transformantlarına Asit Stresi Uygulaması .....	30
3.5. Gen Füzyonlarından Promotor Aktivitesi Tayini .....	30
3.6. Sitrik Asidin Hücre Morfolojine Etkilerinin İncelenmesi .....	31
4- BULGULAR .....	33
4.1. Zayıf Asitlerin <i>CYC1</i> ve <i>GPD1</i> Transkripsiyonuna Etkileri .....	33
4.2. Sitrik Asitin Derişime Bağlı <i>CYC1</i> ve <i>GPD1</i> Transkripsiyonuna Etkileri.....	35
4.3. Asit Stresi Transkripsiyon Faktörlerinin <i>CYC1</i> ve <i>GPD1</i> Transkripsiyonuna Etkileri. ....	36
4.4. Genel Stres Faktörü Msn2p'nin <i>CYC1</i> ve <i>GPD1</i> Transkripsiyonuna Etkileri.....	38
4.5. Hog1p'nin <i>CYC1</i> ve <i>GPD1</i> Transkripsiyonuna Etkileri. ....	39
4.6. Asit Stresinin Hücre Döngüsü ve Morforlojisine Etkileri .....	40
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	43
KAYNAKLAR.....	46
EKLER .....	50
EK.....	50
EK 1. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması.....	51
EK 2. $\beta$ - Galaktozidaz Aktivitesi Hesaplanması .....	54
ÖZGEÇMİŞ.....	55



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µm:	Mikrometre
g	Gravity (santrifuj birimi)
α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta, delesyon
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
Σ	Sigma

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
ATP	Adenosintri fosfat
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DR	Glukoz baskısı altında olmayan, (Derepressed)
dsDNA	Double Strand DNA
HOG	High Osmolarity Glycerol response
LacZ	Beta-Galactozidaz geni
M	Molar
MAT	Mating type, <i>S. cerevisiae</i> 'da eşleşme tipi
mg	Miligram
mm	Milimetre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
OD	Optical Density
ONPG	Orto Nitro Phenyl Galactoside
ORF	Open Reading Frame (Açık okuma Penceresi)
PEG	Polyetilen glikol
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PKA	Protein Kinaz A
Pol	Polimeraz
R	Glukoz baskılaması (Repressed)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC- Ura	Urasil içermeyen sentetik tam üreme ortamı
SGD	Saccharomyces Genome Database
SDS	Sodyum dodesil sülfat
yAP	Yeast Aktivatör Protein
YE <sub>p</sub>	Yeast Epizomal plazmit
YPK	Yeast Protein Kinase

YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast extract Pepton Dextrose
URA	Uracil
yAP	Yeast Aktivatör Protein
YEp	Yeast Epizomal plazmit
YPK	Yeast Protein Kinase
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast extract Pepton Dextrose

## ŞEKİLLERİN DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. <i>S.cerevisiae</i> mayasının taksonomik olarak sınıflandırılması.....	3
Şekil 2.2. <i>S.cerevisiae</i> genlerinin sınıflandırılması yolaklar .....	3
Şekil 2.3. <i>S.cerevisiae</i> genom sekanslanmasında yer alan araştırma grupları.....	4
Şekil 2.4. Maya genleri kodon sayıları ile ilgili istatistiksel veri .....	5
Şekil 2.5. <i>S.cerevisiae</i> hücre döngüsü mekanizması .....	8
Şekil 2.6. <i>S.cerevisiae</i> 'da hücre döngüsü aşamalarının morfolojik farklılıklar...	10
Şekil 2.7. <i>CYC1</i> geninin 7.kromozom üzerinde ki konumu .....	11
Şekil 2.8. <i>CYC1</i> proteini hücreiçi dağılımı .....	12
Şekil 2.9. <i>GPD1</i> geninin 4.kromozom üzerinde ki konumu .....	13
Şekil 2.10. <i>GPD1</i> proteini hücreiçi dağılımı .....	14
Şekil 2.11. Maya HOG yolağındaki bileşenler ve bilgi akışı .....	20
Şekil 2.12. <i>S.cerevisiae</i> 'da asetik asit stres yanıt mekanizması .....	22
Şekil 2.13. <i>CYC1</i> promotor bölgesinin biyoinformatik analizi .....	24
Şekil 2.14. <i>GPD1</i> promotor bölgesinin biyoinformatik analizi .....	25
Şekil 4.1. Normal üreme ortamında yaban tip maya hücrelerinin görüntüsü.....	41
Şekil 4.2. Yaban tip maya hücrelerine sitrik asit stresinin etkisi görüntüsü .....	41
Şekil 4.3. Hog1 mutant maya suşu hücreleri görüntüsü .....	42
Şekil 4.4. Sitrik asit stresinin hücre bölünmesi üzerindeki etkilerinin .....	42

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 2.1. İnsan hastalık genlerine benzerlik gösteren kapsamlı maya genleri kataloğundan alınmış örnekler .....	6
Çizelge 2.2. Son 20 yılda Nobel Tıp veya Fizyoloji, Nobel Kimya Ödülleri .....	7
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşları ve özellikleri .....	27
Çizelge 4.1. Farklı zayıf asitlerin repres şartlarda transkripsiyona .....	34
Çizelge 4.2. Sitrik asidin derepres şartlarda transkripsiyona etkileri .....	35
Çizelge 4.3. Farklı sitrik asit derişimlerinin transkripsiyona etkileri .....	36
Çizelge 4.4. <i>War1p</i> ve <i>Haa1p</i> 'nin <i>CYCI</i> transkripsiyona etkileri .....	37
Çizelge 4.5. <i>War1p</i> ve <i>Haa1p</i> 'nin <i>GPDI</i> transkripsiyona etkileri .....	37
Çizelge 4.6. <i>Msn2p</i> 'nin <i>CYCI</i> ve <i>GPDI</i> 'de transkripsiyona etkileri .....	38
Çizelge 4.7. <i>Hog1p</i> 'nin <i>CYCI</i> ve <i>GPDI</i> 'de transkripsiyona etkileri .....	40

## 1. GİRİŞ

Zayıf organik asitler metabolizma sırasında organizmalar tarafından sentez edilir. Laktik asit, sitrik asit ve asetik asit en çok bilinen organik asitlerdir. Bu asitler aynı zamanda ticari olarak da gıda ve sağlık sektöründe kullanılmaktadır. Sitrik asit glikolitik yolak sonunda üretilen, mitokondride ATP üretiminde gerekli olan önemli bir organik asittir. Sitrik asit E330 gıda katkı maddesi kodu ile gıda sektöründe de yaygın olarak kullanılır. *CYCI* geni tarafından kodlanan sitakrom C1 mitokondride elektron taşıma zinciri için gerekli olan sitokromu kodlar, Cyc 1 proteini ise mitokondride periplazmik alanda bulunur. Cyc1p'nin diğer işlevi de apoptozu başlatmaktır. Hücresel stres şartlarında mitokondriyel hasarlara yanıt olarak serbest kalan Cyc1p prokaspazların aktivasyonuna neden olarak ökaryotik hücrelerde apoptozu başlatan moleküldür. *GPD1* geni de NAD-bağımlı gliserol 3-fosfat dehidrojenaz enzimini kodlamaktadır ve hücrede NAD/NADH redoks dengesinin sağlanmasında çok önemli metabolitik görevi vardır. Aynı zamanda hücrenin ozmotik strese karşı korunmasını sağlayan gliserol biyosentezi için de anahtar enzim konumundadır. *S. cerevisiae* üstün genetik özellikleri ve geliştirilmiş moleküler teknikleri, hızlı üremesi, transformasyonunun da kolaylıkla yapılabilmesi gibi deneysel avantajları dolayısıyla genetik araştırmalarda model organizma olarak kullanılır. *S. cerevisiae*'da apoptozu başlattığı daha önce rapor edilmiştir. Sitrik asit, laktik asit ve asetik asit gibi zayıf organik asitlerin subletal seviyede, stres uyarıcı düzeyde bulunmasının *CYCI* ve *GPD1* genleri transkripsiyonuna ve hücre döngüsü aşamalarına etkileri ayrıntılı olarak incelenmemiştir. Bu tez araştırmasın sitrik asit, laktik asit ve asetik asitin *CYCI* ve *GPD1* genleri transkripsiyonuna etkileri *S. cerevisiae* modelinde moleküler teknikler ile incelendi. Ayrıca bu asitlerin hücre döngüsüne etkileri de mikroskobik olarak incelenerek organik asit stresi uygulandığında hücre bölünmesi aşamalarının da etkilenip etkilenmediği araştırıldı. Elde edilen sonuçlar özellikle sitrik asit stresinin *S. cerevisiae*'da hücre döngüsüne önemli etkileri olduğunu göstermektedir.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. *Saccharomyces cerevisiae*'nin Genetik Yapısı ve Hücresel Özellikleri

Mantarlar alemi üyesi olan *Saccharomyces cerevisia* tek hücreli ökaryotik bir mikroorganizmadır (Şekil 2.1). Genetik özellikleri dikkate alındığında bitkiler sınıfından daha çok hayvanlar alemi sınıfına yakın olarak görülür. 24 Nisan 1996 yılında. *S. cerevisiae*'nin genomu tamamen yayımlanmıştır ve böylece genomu sekanslanan ilk ökaryot olmuştur (Goffeau ve ark. 1996).

*S. cerevisiae*, biyokimya, moleküler biyoloji, hücre biyolojisi ve sistem biyolojisi araştırmalarında, üretilme ve manipüle edilebilme kolaylığı, GRAS organizma olması ve diğer moleküler tekniklerin kolay uygulanması dolayısıyla uzun süredir model organizma olarak kullanılmaktadır. *S. cerevisiae*'nin genom sekanslaması 600'den fazla bilim insanı ile Avrupa, Kuzey Amerika ve Japonya'da 100 laboratuvarında yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bilgilerle oluşturulan veri bankası *Saccharomyces Genome Data Base* (SGD) ortaya çıkmıştır ve bu veri bankasına maya genlerinin çeşitli özellikleri detaylı bir şekilde kaydedilmiştir (Cherry ve ark. 2012).

Genom dizisinin tamamen bilinmesi ve hızlı bir şekilde gelişmekte olan moleküler biyoloji alanında ki yöntemler ile beraber uluslararası alanda araştırma ortakları ve maya delesyon projesi gibi önemli projelerin önünü aydınlatarak *S. cerevisiae* alanında çok fazla gelişme olmuştur (Winzeler ve ark. 1999).

**Şekil 2.1.** *S. cerevisiae* mayasının taksonomik olarak sınıflandırması (Goffeau ve ark. 1996).

*S. cerevisiae* 16 kromozoma sahiptir ve kromozom büyüklükleri 200 ile 2.200 kb arasında değişir. *S. cerevisia* genom büyüklüğü 13,392 kb'dir (Madigan ve Mertingo 2010). *S. cerevisiae*, çoğu fonksiyonel olarak karakterize edilmiş 16 kromozom üzerinde yaklaşık 5,780 protein kodlayan gen bulundurma özelliğine sahiptir (Crauwelsve ark. 2014).



**Şekil 2.2.** *S. cerevisiae* genlerinin sınıflandırılması (Mewes ve ark. 1997).

*S.cerevisiae* genomunun sekanslanmasında farklı ülkelerdeki araştırma laboratuvarları arasında iş birliği (konsorsyum) meydana getirilmiştir. Bu konsorsyumda yer alan her araştırma laboratuvarında farklı bir maya kromozomunu sekanslamıştır. Maya genomunun %55.9'unun Avrupa ülkelerindeki laboratuvarlar tarafından sekanslanmıştır. Maya genom sekanslama konsorsyumu ve sorumlu oldukları kromozomlar Şekil 2.3'de verilmektedir.

**Şekil 2.3.** *S cerevisiae* genomunun sekanslanmasında yer alan araştırma grupları ve sekansladıkları kromozomların dağılımları

Maya genlerinin kodon sayısı ortalama 500 olarak kabul edilir. Şekil 2.4 kodon sayılarına göre *S. cerevisiae*'da genlerin dağılım yüzdesi verilmektedir. *S cerevisiae*'da ki açık okuma çerçevelerinin (ORF) çoğunluğunun boyutları 100 ila 4000 kodon arasında değişmektedir. ORF'lerin %1'inden azının 100 kodonun altında olduğu tahmin edilmektedir (Galisson ve Dujon, 1996).



**Şekil 2.4.** Maya genlerinin kodon sayıları ile ilgili istatistiksel bilgi dağılım şekili (Galisson ve Dujon, 1996).

İnsan genleri ile karşılaştırıldığında, maya genlerinin %30'undan fazlasının insan genleri ile homolog olduğu tahmin edilmektedir. Bu homolog genler arasında en ilgi çekici benzerlik, insan hastalık genlerine önemli ölçüde benzerlik gösteren maya genleridir. Bu yönde yapılan çalışmalar sonucunda karşılaştırmalı olarak sonuçlar yayınlanmıştır ve düzenli olarak bu bilgiler güncellenmektedir (Basset ve ark. 1996). Çizelge 2.1'de insan hastalık genleri ve onların mayada homolog olan genleri ile ilgili örnekler verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Foury ve arkadaşlarının 1997’de derledikleri insan hastalık genlerine benzerlik gösteren kapsamlı maya genleri kataloğundan alınmış bazı örnekler (Foury ve ark. 1997).

Hastalık	Maya geni	Etkisi
Okülo-Serebro-Renal Lowe (OCRL) Sendromu ya da Lowe Sendromu (LS)	SJH1	İnositol polifosfat 5 fosfatazla ilişkili protein; katarakt / glokom
Werner sendromu (WS)	SGS1	DNA helisaz Q ile ilişkili protein; erken yaşlanma ve kansere güçlü yatkınlık
Migren (CACNL1-A4)	CCH1	Kalsiyum kanalı; ailesel hemiplejik migren ve epizodik ataksi
Multiple endokrin neoplazi (MEN)	<i>PHO85</i>	Sitoplazmik kinaz alanına sahip transmembran reseptörleri ile ilgili
Bloom sendromu (BLM)	SGS1	RecQ DNA helikazla ilişkili protein; büyüme kusuru; her türlü kansere yatkınlık

Mayalar ve özellikle *S. cerevisiae* temel moleküler biyoloji, moleküler genetik, biyokimya, yaşlanma, hücre döngüsü gibi biyolojik olayların prensiplerini moleküler düzeyde araştırmak için kullanılan en iyi ökaryotik model organizmadır. Otofaji, hücre döngüsünün kontrolü (cell cycle), telomerlerin ve telomeraz enziminin yapısı ve işleyişi, transkripsiyonun ve translasyonun kontrol mekanizmaları gibi yüzlerce farklı biyolojik olayın genetik prensipleri *S. cerevisiae*’da açıklanabilmiştir. Buna bağlı olarak da temel araştırmalar için *S. cerevisiae*’da yapılan birçok çalışma temel bilimler alanında çığır açmış ve bu çalışmaların bir çoğu Nobel tıp ve fizyoloji veya Nobel kimya ödülü ile ödüllendirilmiştir. Son 20 yılda (1999-2019 aralığında) Nobel Tıp veya Fizyoloji, Nobel Kimya Ödülü alan bazı ünlü maya genetikçileri ve yaptıkları çalışmalar Çizelge 2.2’de verilmiştir.

**Çizelge 2.2.** Son 20 yılda (1999-2019 Aralığında) Nobel Tıp veya Fizyoloji, Nobel Kimya Ödülü alan bazı ünlü maya genetikçileri ve yaptıkları çalışmalar.

2016	<i>Yoshinori Ohsumi:</i>	<i>Nobel Tıp ve Fizyoloji ödülü</i>	<i>Otofajinin moleküler mekanizmasının açıklanması.</i>
2013	<i>James Rothman, Randy Schekman ve Thomas Südhof</i>	<i>Nobel Tıp ve Fizyoloji ödülü.</i>	<i>Hücre içi protein taşınımı ve protein dağılımının moleküler mekanizması, Sec mutantları ile yaptıkları çalışmalar.</i>
2009	<i>Elizabeth Blackburn, Carol Greider ve <u>Jack Szostak</u></i>	<i>Nobel Tıp ve Fizyoloji ödülü.</i>	<i>Telomer yapısı ve telomeraz replikasyonunun moleküler mekanizmasının aydınlatılması. Bu gruptan maya genetiği çalışan araştırmacı Jack Szostak'dır telomeraz yapısı ve replikasyon mekanizması ile ilgili çalışmalar yapmıştır</i>
2006	<i>Roger Kornberg</i>	<i>Nobel Kimya Ödülü.</i>	<i>Ökaryotik RNA polimerazın yapısı, ökaryotlarda transkripsiyonun moleküler mekanizmasının açıklanması ve çalışma mekanizmasının aydınlatılması üzerine moleküler çalışmaları dolayısıyla</i>
2004	<i>Aaron Ciechanover, Avram Hershko ve Irwin Rose</i>	<i>Nobel Kimya Ödülü.</i>	<i>ubiquitin-proteozom bağlı protein degradasyonunun keşfi ve moleküler mekanizması konusundaki çalışmaları dolayısıyla</i>
2001	<i>Leland Hartwel, Paul Nurse, Tim Hunt..</i>	<i>Nobel Tıp ve Fizyoloji ödülü.</i>	<i>Hücre döngüsünün kontrol mekanizmaları, cyclin, cycline bağlı protein kinazlar ile ilgili çalışmaları. Hartwel S. cerevisiae'da, Nurse ise S. pombe de eş zamanlı yaptığı çalışmalar dolayısıyla</i>
1999	<i>Günther Blobel.</i>	<i>Nobel Tıp ve Fizyoloji ödülü.</i>	<i>Proteinlerde sinyal peptidin yapısının keşfi ve proteinlerin mitokondriye taşınması ile ilgili S. cerevisiae'da yaptığı çalışmalar sonucu</i>

## 2.2. *Saccharomyces cerevisiae*'da Hücre Döngüsünün Kontrol Mekanizmaları

Mayalar ve özellikle *S. cerevisiae* temel moleküler biyoloji, moleküler genetik, biyokimya, yaşlanma, hücre döngüsü gibi biyolojik olayların prensiplerini moleküler düzeyde araştırmak için kullanılan en iyi ökaryotik model organizmadır. Hücre içerisinde gerçekleşen birçok biyolojik olayın açıklanması *S. cerevisiae*'da yapılan araştırmalar ile sağlanmıştır. Bu çalışmanın amaçlarından birisi olan hücre döngüsü kontrol mekanizmalarını araştırırken de *S. cerevisiae* kullanılmıştır. *S. cerevisiae*'da hücre döngüsü aşamaları morfolojik olarak ayırt edilebilir. Morfolojik olarak ayırt edilebilir olması hücre döngüsü kontrol mekanizmalarının çalışılmasında *S. cerevisiae*'yı bir model organizma olarak seçmemizi sağlamıştır.

Genetik materyalin kopyalanarak mitoz bölünme ile yeni oluşan kardeş hücrelere aktarıldığı, düzenli, kontrollü moleküler ve hücresel olay dizisine hücre döngüsü denir. Morfolojik ve biyokimyasal olarak iki ayrı aşamadan meydana gelen hücre döngüsünde bölünmenin meydana geldiği M fazı ve DNA'nın kopyalandığı S fazı biyokimyasal olay olarak düşünülmektedir. Morfolojik aşama olarak ise yeni oluşan kardeş hücrelerin ayrılma noktası olarak düşünülmektedir. G1 fazını S fazı, S fazını G2, G2 fazını da mitoz bölünme aşaması takip etmektedir. G1 fazında hücre yeterli büyüklüğe ulaştığında hücre S fazına geçmekte ve burada DNA replikasyonu meydana gelmektedir. S fazının sonunda nükleus hareketi meydana gelmekte ve hücre devamında G2 fazına geçiş yapmaktadır. İğ oluşumları G2 fazının sonlarında meydana gelmektedir. G2 fazından sonra hücre mitoz fazına geçmektedir. Mitoz fazında kromozom ayrılması ve nükleus bölünmesi gerçekleşmektedir ve sitokinaz aşaması ile yeni oluşan kardeş hücreler septin proteinleri sayesinde ana hücreden ayrılmaktadırlar (şekil 2.5) (Gutierrez ve ark. 2010).

**Şekil 2.5.** *S. cerevisiae* hücre döngüsü mekanizması.

Hücre döngüsü meydana gelirken, yeni oluşacak hücrenin gerekli yeterliliğe ulaşmış şekilde gelişip tek başına düzgün bir şekilde büyüüp daha sonra bölünebilmesi ve devamında tekrar başka kardeş hücrelere bölünebilmesi için denetlemeler yapılması gerekmektedir. Bu kontrollerin arasında DNA replikasyonunun düzgün şekilde olabilmesi için gerekli deoksiribonüklotidlerin bulunması, genetik materyalin yeni oluşacak hücreye tam olarak kopyalanması, mitotik iğ ipliklerinin oluşması, kardeş hücreler arasında eşit dağılım olması ve ayrıca hücre döngüsünü tamamlayan hücrenin tekrardan hücre döngüsüne girip girmeyeceğine dair sinyal alması bulunabilir. Hücre döngüsünde ilerleme ve düzenleme aşamaları siklinler vasıtası ile belirlenmektedir. Siklinler/siklin bağımlı kinazlar'ın (CDK) efektör bölgelerine CDK inhibitörleri olarak isimlendirilen (CDKI) siklin/CDK komplekslerin meydana gelmesi ile hücre döngüsünü düzenleyen ve İlerleten faktörler bulunmaktadır. CDKI'lar CDK'lar ve siklinler ile kompleks oluşturan proteinlerdir. CDKI'ların asıl rolü siklin-CDK kompleks oluşumunun etkisini inhibe etmek ve hücre döngüsü ilerlemesinin negatif şekilde düzenlemektir. *S. cerevisiae*'da da, insan ile birçok işlevin homolog olduğu gibi CDK şeklinde görev gören CDC proteinleri bulunmaktadır (Barral ve ark. 1999).

Tomurcuklanmamış hücreler G1, Tomurcukları eşit olan hücreler M, yeni tomurcuk oluşumu aşaması S ve tomurcuk olan yavru hücre ana hücrenin yaklaşık 2/3 büyüklüğünde olan hücreler ise G2 aşaması olarak kabul edilmektedir.

**Şekil 2.6.** *S. cerevisiae*'da hücre döngüsü aşamalarının morfolojik farklılıkları.

### **2.3. *GPD1* ve *CYC1* Genlerinin Promotor Yapıları ve Kontrol Mekanizmaları**

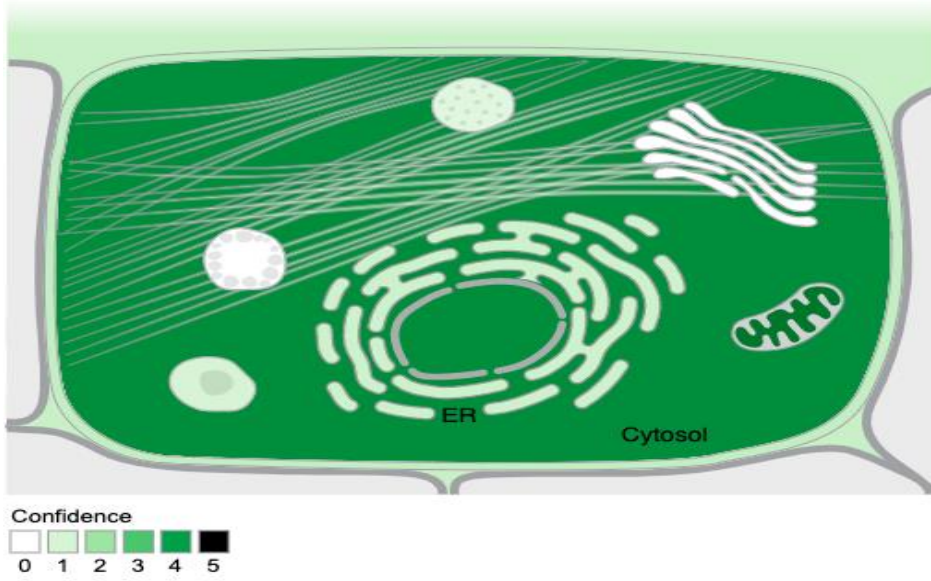
*CYC1* geni, cytochrome c, isoform 1; veya iso-1 cytochrome c olarak adlandırılmaktadır. *CYC1* geni sitokrom c, isoform 1 proteinini kodlamaktadır, sistematik adı YJR0458W'dir, *S. cerevisiae*'daki gen kodu ise (SGD ID) S000003809'dur (Anonim 2020a). *S. cerevisiae*'da bulunan *CYC1* geni *S. cerevisiae* kromozomlarının içerisinde 7. kromozomda yer almaktadır. 7. kromozom *S. cerevisiae*'da J kromozomu olarak adlandırılır. *CYC1* geni koordinat olarak 526335'den 526664'e kadar 330 bç uzunluğunda bulunmaktadır ve *CYC1* geni intron içermemektedir (Anonim 2020a).

**Şekil 2.7.** CYC1 geninin 7. kromozom üzerindeki konumu (Anonim 2020a)

*S. cerevisiae*'da bulunan Cyc1 proteini ile insanda da bulunan sitokrom c proteini hem yapısal ve hem de işlevsel olarak büyük benzerlik göstermektedir. *CYC1* geninin kodladığı proteini 109 aminoasit uzunluğunda küçük bir proteindir ve Cyc1p şeklinde gösterilmektedir. Molekül ağırlığı 12.19 kDa'dır (Anonim 2020a).

*S. cerevisiae*'da Cyc1 proteininin bir maya hücresi içinde 7330 adet bulunduğu rapor edilmiştir. Cyc1p'nin iki önemli özelliği bulunmaktadır. Bunlardan birisi biyolojik işlev olarak elektron taşıma zincirinde kompleks 3 ve kompleks 4 arasında elektron transferi yapmasıdır. Bu işlevinden dolayı mitokondri membranına bağlı kalmayıp krista içinde membranlar arası boşlukta hareketli olarak bulunmaktadır. *CYC1* geninden kodlanan cyc1 proteini mitokondride membranlar arası kristalarda bulunan solubl bir proteindir. Mitokondriyal solunum zincirinin gerçekleşmesinin gerekli bir komponentidir ve diğer özelliği ise hasarlara yanıt olarak apoptozu başlatabilmesidir (Ghaemmaghami ve ark. 2003).

*CYC1* geninden kodlanan Cyc1 proteinin hücrede bulunma yoğunlukları Şekil 2.8'de gösterilmiştir. Cyc1 proteini hücre içerisinde en yoğun olarak mitokondride bulunmaktadır (5), çekirdek ve sitozol alanlarında da bulunur fakat mitokondrideki bulunma yoğunluğundan daha az yoğun şekilde bulunmaktadır (4). Düşük yoğunlukta olarak ise hücre zarı, peroksizom, endoplazmik retikulum ve lizozomda da bulunmaktadır (1).



**Şekil 2.8.** CYC1 proteini olan *cyc1*'in hücre içerisinde dağılımı (Subcellular localization database).

*CYC1* geni promotor yapısı daha önce yapılmış olan çalışmalar sayesinde aydınlatılmıştır. *CYC1* geni transkripsiyonunun glukoz baskılanmasına bağlı, oksijen (aerobik şartlar) varlığına bağlı ve heme kompleksine (demir iyonlarına) bağlı bir şekilde düzenlendiği daha önce yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Glukoz baskılaması ile kontrol edilen *CYC1* geni, %2 glukoz içeren ortamda bazal seviyede transkribe edilirken; düşük glukoz veya gliserol laktat ortamında bulunursa genin transkripsiyonu aktive edilir (Ghaemmaghani ve ark. 2003). *CYC1* geni promotor bölgesinde bulunmakta olan transkripsiyonel kontrol sekanslarını belirlemek amacıyla delesyon analizleri sonucu; iki farklı kontrol bölgesi belirlenmiştir. Bunlar UAS1 (Upstream Activation Sequence-1) ve UAS2 şeklinde adlandırılmıştır (Guarente ve ark. 1984). UAS2 transkripsiyonu başladığı nükleotide göre adlandırıldığında -200 ve -230 bç arasındaki sekans olup bu UAS2 bölgesine transkripsiyon fakörleri olan Hap2p/Hap3p kompleksinin bağlandığı tespit edilmiştir (Forsburg ve Guarente, 1988).

Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase (*GPD1*) geninin sistematik adı YDL022W'dir, *S. cerevisiae* genom database numarası, S000002180'dir. *GPD1* geni aynı zamanda *DAR1*, *HOR1*, *OSG1*, *OSR5* geni şeklinde de adlandırılabilir. 4.kromozomda bulunan *GPD1* geni



koordinatları 411825-413000 arasındadır ve uzunluğu 1176bp'dır (Anonim 2020a). *GPD1* geni işlev olarak, hiperosmotik stres koşulları sırasında gliserol üretimini ve birikmesini katalizlemektir. Gliserol kaybını, su kaybını ve hücrelerin turgorunu önleyen bir osmoregülatör olarak görev yapmaktadır (Albertyn ve ark. 1994).

*GPD1* geni tarafından kodlanan NAD-bağımlı gliserol 3-fosfat dehidrogenaz enzimi de hem gliserol biyosentezi için hem de hücrede redoks dengesi (NAD/NADH) için gerekmektedir. NAD-bağımlı gliserol-3-fosfat dehidrogenaz enzimi ozmotik stres altında büyüme için gerekli olan gliserol sentezinin temel enzimidir. Bu enzimin ekspresyonu yüksek ozmolarite ortamında gliserol yanıt yolu ile düzenlenmektedir. Ayrıca bu enzim DNA replikasyonu stresine cevap olarak artar; protein kinazlar Ypk1p ve Ypk2p tarafından fosforilasyon yoluyla inaktive edilir, fosforilasyon katalitik aktiviteyi artırır; peroksizomal geçişini kolaylaştırmak için Pnc1p ile bir heterodimer oluşturur (Anonim 2020).

**Şekil 2.9.** *GPD1* geninin 4.kromozom üzerinde ki konumu (Anonim 2020a).

*Saccharomyces cerevisiae*, ozmotik strese, yani büyüme ortamının ozmolaritesindeki bir artış durumuna, artan gliserol üretimi ve hücre içi gliserol birikimi yoluyla cevap vermektedir. (Anonim 2020a). Moleküler fonksiyon olarak oksidoredüktaz işlevi görmektedirler. Oksidoredüktazlar: İki substrat arasındaki redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Biyolojik işlem olarak stres ortamına karşı tepki verirler. Gliserol sentezinde ve yüksek ozmolarite stresine cevap olarak hücre içi gliserol birikiminde anahtar rol oynayan NAD'ye

bağlı gliserol-3-fosfat dehidrojenaz; sitoplazmaya ve peroksizomlara lokalizedir (Anonim 2020).

Şekil 2.10 *GPD 1* geninden kodlanan proteininlerin hücrede bulunma yoğunluklarının gösterimidir. *GPD1* proteini hücre içerisinde en yoğun olarak sitozolde bulunmaktadır (4), çekirdek ve mitokondri alanlarında da bulunur fakat sitozolde ki bulunma yoğunluğundan daha az yoğun şekilde bulunmaktadır (2). Düşük yoğunlukta olarak ise hücre zarı, peroksizom, endoplazmik retikulum ve lizozomda da bulunmaktadır (1).

**Şekil 2.10.** *GPD1* proteini hücre içi dağılımı (Subcellular localization database).

Sitoplazmik gliserol-3-fosfat dehidrojenazlar (*GPD*'ler), dihidroksiaseton fosfatın (DHAP) NADH'ye bağlı olarak gliserol-3-fosfata indirgenmesini katalize etmektedirler. Bu reaksiyon, ökaryotlar boyunca korunan gliserol üretimine yol açan bir biyosentetik yolağın ilk adımıdır (Lee ve ark. 2012). Tomurcuklanma mayasında, bu yol bir dizi bağlamda hücre büyümesi için önemlidir. Büyüme sırasında *GPD* aktivitesi, glikolizden üretilen NADH'yi yeniden oksitleyerek hücrel redoks dengesini korumada ve sentetik ortamda anaerobik büyüme için gereklidirler. Yüksek ozmolarite koşulları altında, bu yol tarafından üretilen gliserol hücre içinde birikmektedir ve önemli bir ozmoprotektif rol oynamaktadır (Ansell ve ark. 1997).

İki GPD'nin farklı fonksiyonları kısmen diferansiyel protein bölümlendirmesine göre isimlendirilmiştir. *GPD1* hem sitosol hem de mitokondriye lokalize olurken *GPD2* hem sitozolde hem de peroksizomlarda bulunmaktadır (Jung ve ark. 2010). Ayrıca, *GPD1* ve *GPD2* transkripsiyonel seviyede farklı şekilde düzenlenmektedirler. Örneğin *GPD1*, hiperosmotik strese yanıt olarak transkripsiyonel olarak yukarı regüle edilmektedir ve genellikle Hog1 mitojenle aktiveleştirilen protein kinaz (MAPK) yolunun anahtar transkripsiyonel hedefi olarak kabul edilmektedir (Ansell ve ark. 1997).

#### **2.4. Zayıf Asit Stresi ve Metabolik Önemi**

Zayıf organik asitler, yiyecek ve içecek ayrıca kimya sanayisinde, endüstrisinde koruyucu olarak kullanılan doğal olarak oluşan bileşiklerdir. Mikrobik büyümeyi engelleyerek gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatmaktadırlar. Bu zayıf asitlerin antifungal özelliklerini açıklayan çok sayıda teori vardır, ancak tam mekanizması hala bilinmemektedir (Lambert ve Stratford, 1999, Mollapour ve ark. 2006, Papadimitriou ve ark. 2007, Ullah ve ark. 2012).

Yanlış ve aşırı kullanımlara bağlı olarak, maya suşları bu koruyuculara karşı dirençli hale gelebilmektedir. Bu nedenle zayıf asitlerin daha etkin kullanımının sağlanması için maya hücrelerini inhibe edici mekanizmalarının temelini anlamak gerekmektedir (Konuk ve Ergudan, 2018).

Gıda endüstrisinde kullanılan zayıf asitler mikrobiyal üremeyi kontrol etmek amacıyla veya çeşitli gıdalara renk, koku, tat kazandırmak amacıyla kullanılmaktadırlar. Zayıf organik asitler olan asetik asit, sitrik asit, süksinik asit, laktik asit ve salisilik asit gibi asitler mikroorganizmaların üreme ortamlarında doğal olarak bulunabileceği gibi bazen de üreme ortamlarına veya mikrobiyal ürünlere gıda katkı maddeleri olarak ilave edilmektedirler. Düşük pH'da, asetik asit (pKa 4.75) RCOOH grubu ayrılmamış halde bulunmakta ve bu durumda önemli derecede mikroorganizmaların üremesini inhibe etmektedir (Piper ve ark. 2001).

Sitrik asit (E330); limon, portakal ve tüm ekşi meyvelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Sitrik asit, zayıf bir organik asittir, doğal bir koruyucudur ve asitli veya ekşi

yiyeceklerde ve alkolsüz içeceklerde aroma olarak kullanılmaktadır. Bu kullanımlarının yanı sıra sitrik asit döngüsü, tüm canlı organizmalar tarafından kullanılan önemli bir biyokimyasal yoldur (Boğa ve ark. 2013).

E330, gıda, tekstil, ilaç, kozmetik ve deterjan endüstrilerinde çok çeşitli uygulamalara sahip çok yönlü bir kimyasaldır. Sitrik asit, organik bir asit düzenleyici olup ürünlerin pH kontrolü için kullanılır ve bu yüzden yiyecek, içecek endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sitrik asit genellikle yiyecek ve içeceklerin üretiminde tad geliştirmek amacıyla aroma olarak kullanılmaktadır. Ayrıca yiyecek ve içeceklerdeki mikrobiyal üremeyi önlemek içinde kullanılır (Lawrence ve ark. 2004).

Asetik asit, *S. cerevisiae*'de glikoz ile bastırılmış maya hücreleri tarafından metabolize edilemeyen normal bir fermantasyon ürünüdür. Ayrılmamış formda asetik asit serbestçe membran geçirebilir ve hücreye basit difüzyonla girebilmektedir. Daha yüksek hücre dışı pH'da asetik asit, nispeten membran zayıflığı olan bir form olan asetat anyonuna ayrılmaktadır. Asetik asidin, mitokondriye bağımlı bir apoptotik yol ile, sitokrom C salınımı sağlayarak maya hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Ludovico ve ark. 2002, Pereira ve ark. 2007, Almeida ve ark. 2009). Asetik asit ayrıca, *S. cerevisiae*'de kronolojik yaşlanma sırasında hücre-dışı olarak hücre ölümü aracısı olarak tanımlanmıştır (Burtner ve ark. 2009).

Ayrıca, *S. cerevisiae*'da, belirli koşullar altında, asetik asidin, hücre canlılığını bozduğu ve dolayısıyla yüksek ve düşük entalpi olmak üzere iki tür hücre ölümü ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Pinto ve ark. 1989). Laktik asit, çok çeşitli endüstriyel uygulamalara sahip bir organik asittir. Gıdalarda genellikle bir asitleştirici madde, lezzetlendirici madde, pH tamponlama maddesi veya koruyucu madde olarak kullanılmaktadır. Gıda, ilaç ve kozmetik ürünlerindeki uygulamasının yanı sıra, laktik asit; polimerlerinin üretimin aşamalarında da kullanılmaktadır. Bu polimerler, petrol türevi plastiğe benzer özelliklere sahiptirler ama biyolojik olarak parçalanabilirler ve çevre dostu olma avantajı sağlamaktadırlar (Valli ve ark. 2006).

## 2.5. Asit Stresine Hücresel Yanıtın Moleküler Mekanizması

Zayıf organik asitler yaygın bir şekilde gıda ve kimya sanayinde kullanılmaktadırlar. Gıda endüstrisinde zayıf asitlerin kullanılmasının nedeni mikrobiyal üremeyi kontrol etmek ve/veya çeşitli gıdalara renk, koku, tat kazandırmaktır. Zayıf organik asitler, mikroorganizmaların üreme ortamlarında doğal olarak bulunabilmektedirler ya da üreme ortamlarına veya mikrobiyal ürünlere gıda katkı maddeleri olarak ilave edilebilmektedirler. Bu zayıf organik asitler; asetik asit, sitrik asit, süksinik asit, sorbik asit ve benzoik asit olabilir. Düşük pH'de, asetik asit (pKa 4.75), sorbik asit (pKa 4.76) ve benzoik asitin (pKa 4.19) RCOOH grubu ayrılmamış halde bulunmaktadır ve böylece mikroorganizmaların üremesini önemli derecede inhibe edebilmektedirler (Piper ve ark. 2001).

Endüstriyel fermantasyonda, mayalar, düşük su aktivitesi ve sitotoksik bileşiklerin varlığı gibi uygulananlar farklı stres koşullarına tabi tutulmaktadır. Maya hücreleri, olumsuz koşullara karşı stres tepkisini tetiklerleyerek ortama karşı tepki oluştururlar. Maya hücrelerinin oluşturduğu bu stres tepkileri yeni ortama uyum sağlamalarını sağlamaktadır. Fakat şiddetli olarak meydana gelen hücre içinde ortaya çıkan stres tepkileri, hücrenin hayatta kalmasını garanti altına almak için yetersiz olabilmektedir ve bundan dolayı hücre ölümü meydana gelebilmektedir. Mayaların kolay incelenebilir biyolojik durumları, manipüle kolaylığı ve genetik izlenebilirliğe elverişliliği, ökaryotik hücresel süreçlerin mekanizmalarını ve bunların düzenleme mekanizmalarını deşifre etmede güçlü bir araç haline getirmiştir (Sousa ve ark. 2011).

*S. cerevisiae* mayasının bulunduğu ortama uyum sağlamak amacıyla kullandığı mekanizmalarla ilgili detaylar yıllar boyunca yeni bilgiler ortaya çıkmıştır. Maya hücreleri, farklı durumlara karşı çapraz koruma kazanmaktadırlar; bir stresin büyük dozuna direnç gösterirse, normal olarak ölümcül diğer stres dozlarına karşı dirençli hale gelmektedirler (Mitchel ve Morrison, 1982, Blomberg ve ark. 1988, Wieser ve ark. 1991, O'Brien ve ark. 1993).

Maya hücreleri düşük pH ve organik asit varlığı gibi çeşitli ekstrem koşullara uyum sağlayabilmektedirler ve bu koşullar varlığında üremeye devam etmektedirler. Bu şartlar koşulunda üreme evresinde sıklıkla mayada bozulmalar meydana gelebilmektedir. Mayada hücre içi asit stresi meydana gelir, zayıf organik asitlerin *S. cerevisiae* tarafından degrades edilememesinden dolayı asit artışı gözlemlenebilmektedir (Piper ve ark. 2001).

Çeşitli organik asitler koruyucu olarak kullanılmaktadır ve üreme ortamları hijyenik bir koşulda olmasına rağmen maya ve küf bozulmaları yiyecek ve içecek endüstrisinde hala büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Maya hücreleri organik asit varlığı ve düşük pH gibi ekstrem koşullara uyum gösterirler ve bu koşullarda üremeye devam edebilmektedirler. Fakat bu ekstrem koşullar genellikle mayada bozulmaya neden olmaktadır. Zayıf organik asitler *S. cerevisiae* tarafından degrades edilmeyip hücrede asit stresini oluştururlar (Piper ve ark. 2001).

Fizyolojilerini bozmayacak şekilde *S. cerevisiae* hücrelerine belirli miktarda stres yaratacak maddelere maruz bırakıldığında, *S. cerevisiae* hücreleri bu stres koşullarına karşı tolerans geliştirir ve bu tolerans geliştirmesi sayesinde sadece bu stres yaratacak ajanın yüksek doz uygulamasına değil, diğer ajanlara karşıda stres toleransı geliştirmiş hale gelmektedirler. *S. cerevisiae* hücrelerinde meydana gelen bu duruma çapraz koruma (cross-protection) denir. Stres koşullarında uyarılmış olan genlerin promotor bölgelerinde STRE (Stress Response Element) dizisi bulunmaktadır. Örneğin sıcaklık şok proteini aktifleşmesi sadece termal stres ortamında meydana gelmez aynı zamanda besin açlığı stres koşulu içeren ortamda da ya da diğer stres ortamlarında da uyarılmaktadır (Estruch, 2000).

Hücrenin zayıf organik asitlere maruz kalması sonucunda maya hücrelerinin membran permeabilitesi azalmakta ve anyon ekstrüzyonu (çıkışı) gerçekleşmektedir. Hücrenin zayıf organik asitleri katabolize etme yeteneği artmakta ve genlerin ekspresyonu değişmektedir. Benzer olarak hücre membranının H<sup>+</sup> permeabilitesinde değişme meydana geldiğinde, hücreden aktif proton çıkışı olmaktadır (Holyoak ve ark. 1996). *S. cerevisiae* üreme ortamlarına zayıf organik asitler eklendikten hemen sonra hücreler, hücre döngüsünden çıkıp uzun bir süre latent faza geçmektedirler. Hücreler tekrar üremeye birkaç saat sonra devam etmektedirler (Piper ve ark. 1997, Holyoak ve ark. 1999).

Tomurcuklanan maya *Saccharomyces cerevisiae*, zayıf organik asit stresini tolere etme potansiyeline sahiptir. Bu özellik laktik asit gibi kimyasallar için biyo üretim sistemlerinin artırılması için önem kazanmaktadır. Örneğin, maya hücreleri, asetik asidin difüzyonel girişini kolaylaştıran, daha az lipofilik bir organik asit ile, plazma membran kanalı Fps1'in etkisizleştirilmesiyle dirençlerini arttırmaktadır. Diğer yandan, zayıf organik asitlerin ayrışması ile üretilen protonlar, plazma zarı proton taşıyıcı Pma1 tarafından hücreden aktif olarak pompalanmaktadır. Adaptasyon süresince, transkripsiyon aktivatörleri War1 ve Haa1 transkripsiyon aracılı adaptasyon yanıtlarını uyarmada önemlidir. Haa1, laktik asit stresine adaptasyon yanıtını aktive etmek için de önemlidir. Laktik asit stresine adaptasyon yanıtlarından birinin, Haa1'in nükleer lokalizasyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir. Bu nükleer lokalizasyonun Haa1 fosforilasyon derecesi ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Laktik asit direncinin artırılmasına yönelik çalışmalar, *S. cerevisiae* tarafından etkin laktik asit üretimi açısından da tartışılmaktadır (Sugiyama ve ark. 2005).

Protein kinaz C (PKC) yolu, *S. cerevisiae*'da hücre şeklinin ve hücre bütünlüğünün korunmasında rol oynar hücre bütünlüğünü sağlamada görev alan protein kinaz C yolağının asit stresi ile aktive olduğu ve bu aktivasyonun hücre membranında yer alan Mid2p sensörüne bağlı olduğu daha önceki araştırmalarda gösterilmiştir. PKC yolu, hücre dışı ortamın asitleştirilmesi sırasında aktive edilmekte ve bu aktivasyon esas olarak Mid2p hücre duvarı sensörüne bağlı olduğu gösterilmiştir. *S. cerevisiae*'da hücre duvarı sensörü Mid2p ve Rgd1p (HOG yolu)'yi kapsayan iki ayrı yolak birlikte hücre bütünlüğünü sağlayarak asit toleransını artırır. (Claret ve ark. 2005).

Hog1p aktivasyonu, sitrik asit stresine optimum adaptasyon için hayati öneme sahiptir. Maya hücreleri, MAPK yollarını aktive ederek hiperosmotik, ısı ve radyasyon stresi gibi çevresel strese cevap vermektedirler. HOG yolu, *S. cerevisiae*'nin yüksek ozmolarite ortamlarında hayatta kalması için önemli bir biyolojik yoldur ve son çalışmalar, HOG yolunun ayrıca oksidatif stres ve ısı stresi dahil olmak üzere diğer stres faktörleri tarafından indüklendiğini göstermiştir. Sitrik asit tarafından indüklenen gen ekspresyonundaki değişikliklerin incelenmesi sonucunda *GPD1*'in (kodlayıcı gliserol-3-fosfat dehidrojenaz) ve *GPP2*'nin transkripsiyonunun aktive edildiği (up-regulation) ortaya çıkmıştır. HOG yolu *GPD1* ifadesini

düzenlemektedir ve bu yolun sitrik asit stresine direnç arabuluculuğunda rol oynadığını açıkça gösterilmiştir (Lawrence ve ark. 2004).

**Şekil 2.11.** Maya HOG yolağındaki bileşenler ve bilgi akışı.

Hiperozmotik stres, sinyal iletim yolunun bileşenleri ve ozmotik stresin *GPD1* geni ve diğer genlere iletilmesi yolunda ilk aşama olarak hücre zarındaki *Slp1p* ve *Sho1p* reseptörleri ile algılanarak sitoplazmadaki *MAPKKK*'lara aktarılmaktadır. Sonuçta *Hog1p* fosforlanarak nükleusa geçer ve ilgili transkripsiyon faktörlerine etki ederek, ozmotik strese yanıt olarak bazı genlerin transkripsiyonlarının aktive edilmesini sağlar. Ökaryotik organizmalarda ise *MAPK*, *MAPKK* ve *MAPKKK* ailelerinin birçok üyesi bulunur ve bu proteinler farklı sinyal iletim yollarında yer alırlar (Mager ve Siderus, 2002).

Ozmotik stresin gen işleyişine direkt etkisi ile ilgili çalışmalarda daha çok gliserol metabolizması ile ilgili enzimleri kodlayan genlerin işleyişleri analiz edilmiştir. Bu genlerden transkripsiyonu en iyi analiz edilen gen ise *GPD1* genidir. Hiperozmotik stres şartları altında



gliserol biyosentezinin *GPD1* geni tarafından üretilen sitoplazmik NADP bağımlı Gliserol-3-fosfat dehidrojenaz enzimi ile yapıldığı ve bu genin transkripsiyonunun çok fazla miktarda aktive edildiği gösterilmiştir (Albertyn ve ark. 1994). Ayrıca yapılan diğer çalışmalar ile *GPD1* geninin glukoz baskılaması ile de kontrol edildiği gösterilmiştir. Glukoz baskılaması ve hiperozmotik stres *GPD1* geninin transkripsiyonunu birbirinden bağımsız olarak düzenler (Albertyn ve ark. 1994). HOG MAPK yolağındaki genlerin delesyonu sonucunda sitrik asit duyarlılığının arttığı gösterilmiştir (Lawrence ve ark. 2004). Hücrelerin sitrik asite maruz kalması sonucunda Hog1p fosforlanarak aktif hale gelmektedir. HOG yolağının aktivasyonu yüksek ozmolarite ortamında üremeye izin veren gliserol konsantrasyonunun hücre içerisinde artmasına neden olmaktadır. *GPD1* geninden kodlanan NAD-bağımlı gliserol 3-fosfat dehidrojenaz enzimi gliserol biyosentezi için önemli bir enzim olduğu gösterilmiştir. Sitrik asite maruz kalma *GPD1* geninin ekspresyonunu arttırmaktadır. Sitrik asit ozmotik stres mekanizmasından farklı olarak HOG yolağını aktif hale getirir. HOG sinyal yolunun aktivasyonunun önemli sonuçlarından biri sitrik asit stresi boyunca hücre içi gliserol üretimidir (Lawrence ve ark. 2004).

Zayıf organik asitlerin üreme ortamında bulunması metabolik yanıtı oluşturmaktadır. Bu metabolik yanıt asit stresi olarak tanımlanmıştır. Bu metabolik yanıtta Msn2p, Haa1p, Warp1, Hot1p gibi bazı transkripsiyon faktörleri görev alır. *S. cerevisiae* zayıf asit stresine adaptasyon için Haa1p ile düzenlenen genleri içermektedir. Haa1p (Transkripsiyon faktörü) gıda koruyucu olarak kullanılan çeşitli zayıf asitlere karşı maya hücrelerinin adaptasyonu için gereklidir. Kısa zincir uzunluğundaki asetik asit ve propiyonik asite karşı en fazla korumayı Haa1p sağlamaktadır. Zayıf asit stresinde *Haa1* hedef geninin transkripsiyonu aktive olmaktadır. Haa1p, hücre duvarı glikoproteinlerini kodlayan *YGP1* genlerini ve plazma membran multidrug transporterları olan TPO2 ve TPO3'ü de düzenlemektedirler (Şekil 2.12.) (Fernandes ve ark. 2005).

**Şekil 2.12.** *S. cerevisiae* 'da asetik asit stres yanıt mekanizmasını göstermektedir (Giannattasio ve ark. 2013).

Programlanmış hücre ölüm mekanizmasını asetik asit indüklemektedir. Zayıf asitler, lipofilik kısımlarına ve ayrıca konsantrasyonlarına bağlı bir şekilde mikrobiyal hücre büyümesine, hücre ölümü geç kalmışlığına veya sitostaza neden olmaktadır (Stratford ve Anslow, 1998, Piper ve ark. 2001).

Sitrik asit etkileri için birçok araştırma yapılmıştır. Yapılan araştırma sonucunda mitojen-aktive protein kinaz (MAPK) yüksek ozmolarite gliserol (HOG) yolağının zayıf asite stres yanıtı için görev aldığı ve sitrik asit stresi için sorumlu genlerin aktive olmasını sağladığı gösterilmiştir. Normal ortamda ve sitrik asit içeren ortamda araştırmalar yapılmıştır ve bunun sonucunda sitrik asit içeren ortamda üremekte olan hücreler, diğer normal ortamda üremekte olan hücelere göre fazla gliserol biriktirdiği elde edilmiştir (Nielsen ve Arneborg, 2007).

STRE (Stress Response Element) isimli promotör elementi *S. cerevisiae* 'da strese cevap vermekle görevli birçok geni kontrol etmektedir. *S. cerevisiae* 'nın maruz kaldığı çeşitli streslere karşı (asit stresi, ısı stresi, pH stresi gibi) Msn2p ve Msn4p olarak isimlendirilen transkripsiyon faktörleri nükleusta birikmektedir (Nobel ve ark. 2001). Msn2p ve Msn4p,

STRE'ye bağlı promotörlerin strese bağlı aktivasyonu için önemli faktörlerdir ve spesifik olarak STRE içeren oligonükleotitlere bağlanmaktadır (Pastor ve ark. 1996).

STRE bağlanma faktörünün, iki çinko-parmak transkripsiyon faktöründen birinin, Msn2p ve diğerinin Msn4p olduğu kanıtlanmıştır. Bu faktörlerin silinmesi, çeşitli stresli koşullara duyarlı hücreleri ortaya çıkarmaktadır. Msn2p ve Msn4p'nin birçok farklı strese cevap olarak çok sayıda genin indüklenmesini yönettiği gösterilmiştir (Pastor ve ark. 1996, Schmitt ve McEntee, 1996). Bu nedenle, bu faktörler “genel stres” transkripsiyon faktörleri olarak bilinir ve çevresel hakarete karşı savunan bir dizi genin uyarılması için hücrel strese yanıt olarak genel olarak aktive edildiği öne sürülmüştür (Schuller ve ark. 1998).

*MSN2* ve *MSN4* genleri, homologdur ve işlevsel olarak çinko parmak yapısındalardır. Meydana gelen asit stresine karşı yanıt mekanizmasında birçok genin ekspresyon seviyesi düzenlenmektedir. Genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesi Msn2p ve Msn4p tarafından meydana gelmektedir. Hem *MSN2* hem de *MSN4* genlerinin bozulması, karbon kaynaklı açlık, ısı şoku, ciddi ozmotik stresler veya oksidatif stresler dahil olmak üzere farklı streslere karşı daha yüksek hassasiyet ile sonuçlanır (Pastor ve ark. 1996).

*CYC1* ve *GPD1* genlerinin promotor sekansları ve diğer moleküler özellikleri ile ilgili yayınlanmış bilgiler SGD web sayfasında verilmektedir (Anonim 2020a). Promotor bölgelerine bağlandığı deneysel olarak gösterilen transkripsiyon faktörleri de veri tabanı olarak YEASTRACT`da erişime açıktır. *CYC1* ve *GPD1* genlerinin promotor bölgelerine bağlandığı bilinen transkripsiyon faktörleri ve bağlandığı sekanslar YEASTRACT veri tabanından derlenerek Şekil 2.13 ve Şekil 2.14`de verilmiştir.

**Şekil 2.13.** *CYCI* promotor bölgesinin biyoinformatik analizi. YEASTRACT kaynakların deneysel olarak bağlandığı tespit edilen transkripsiyon faktörlerinin *CYCI* promotorunda bağlanma bölgeleri. Promotor sekansı çift zincirli olarak gösterilmiştir. Başlama kodonu 1. ATG'nin konumuna göre 1Kb'lik genom bölgesi promotora olaral alınmıştır (Anonim 2020a ve Anonim 2020b).

**Şekil 2.14.** *GPD1* promotor bölgesinin biyoinformatik analizi. YEASTRACT kaynakların deneysel olarak bağlandığı tespit edilen transkripsiyon faktörlerinin *GPD1* promotorunda bağlanma bölgeler. Promotor sekansı çift zincirli olarak gösterilmiştir. Başlama kodonu 1. ATG'nin konumuna göre 1 Kb'lik genom bölgesi promotor olarak alınmıştır (Anonim 2020a ve Anonim 2020b).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Araştırmada Kullanılan Maya Suşları ve Üreme Koşulları

Bu tez araştırmasında kullanılan *S. cerevisiae*'nın genomu bilinen yaban tip ve mutant suşları ve özellikleri çizelge 3.1'de verildi. Bu *S. cerevisiae* suşları Frankfurt Üniversitesi tarafından kontrol edilen EUROSCARF maya koleksiyonundan satın alındı. Bu *S. cerevisiae* suşlarının tüm genomları sekanslanmış olup Çizelge 1'de verilen delesyonlardan başka mutasyon içermedikleri bilinmektedir. Araştırmamızda kullanılan maya suşları yaban tip suş olarak kabul edilen BY4741 (Y00000) (laboratuvar kodu olarak YST124) suşuna izogenik suşlardır. Mutant suşlar yaban tip suş ile izogenik olup stres yanıt yollarında işlevi olan genleri delesyonla silinmiş suşlardır. Mutant suşlar olarak Haa1, War1, Msn2 ve Hog1 genlerini içermeyen suşları kullanılmıştır.

Delesyonlu suşların ilgili gende delesyon içerdikleri satın alınan *S. cerevisiae* suşları G418 (Geneticin) içeren petrilere üretilerek doğrulandı ve bu delesyonlu suşların G418 antibiyotikine direçli oldukları doğrulandı. Delesyonlu suşlar daha önce üretici kurum tarafından açıklanmış şekilde elde edilmiştir (Brachman ve ark. 1998).

EUROSCARF'dan sağlanan *S. cerevisiae* örnekleri, ayrı ayrı YPD (Yeast Extract, Peptone, Dextrose) petrilere çizgi ekimi yapılarak yeniden üretilmek ve canlılıklarını doğrulamak için 30°C'de, 48 saat inkübatörde üremeye bırakıldı. Üretilen maya suşlarından steril şartlarda kürdan ile bir miktar örnek alınarak uzun süreli saklamak için 1 ml %20'lik gliserol içeren mikrofuj tüplerinde süspanse edildikten sonra -80 °C'de depo edildi. YPD ortamında üretilen maya suşları deneyler sırasında sıvı kültür başlatmak için +4 °C'de buzdolabında muhafaza edildi. *S. cerevisiae* suşlarının üretilmesinde kullanılan besiyeri içerikleri ve bu besiyerlerinin hazırlanması (Rose ve ark. 1990) tarafından açıklanmış şekilde yapıldı (Rose, 1990). Araştırma kullanılan besiyeri içerikleri ve diğer çözeltilerin hazırlanması Ek 1'de verildi.

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

<b><i>ST Lab Kodu</i></b>	<b>Genotipi ve ilgili mutasyonlar</b>	<b>EUROSCARF kodu</b>
YST124	MATa, his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0.	Y00000 (BY4741)
YST240	MATa, his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0, YLR113w::kanMX4 (hog1 mutanı)	Y 02724
YST299	MATa, his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0, YMR037c::kanMX4 (msn2 mutanı)	Y07117
YST320	MATa, his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0, YML076c::kanMX4 (war1 mutanı)	Y06734
YST321	MATa, his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0, YPR008w::kanMX4 (haa1 mutanı)	Y07137

### **3.2. *GPD1-LacZ* ve *CYC1-LacZ* Vektörlerinin Yapısı.**

Bu tez araştırmasında kullanılacak olan *CYC1* ve *GPD1* genleri daha önceki çalışmalarda hazırlanmış olup *Cyc1-lacZ* ve *GPD1-lacZ* rapörtör gen füzyonları olarak laboratuvarımızda mevcuttur.

Daha önce yapılan çalışmalar doğrultusunda *CYC1-lacZ* gen füzyonunu içeren plazminin genetik yapısı ve seçilebilir markör genleri ile ilgili bilgiler yayımlanmıştır (Guarente ve ark. 1982). Bu teze ait deneysel araştırmalarda kullanılmış olan *CYC1-lacZ* gen füzyon plazminin genetik yapısının daha detaylı incelendiği ve isimlendirdiği kaynağa göre orijinal adı pLG  $\Delta$ 312`dir (Guarente ve ark. 1983). *CYC1-lacZ* gen füzyon yapısına sahip plazmit P.J. Farabaugh (University of Maryland, Baltimore County, Maryland, ABD) aracılığı ile temin edilmiştir, laboratuvarımızın plazmit stoklarında bu şekilde mevcuttur. *CYC1-lacZ* gen füzyon vektörü 2 $\mu$ M-URA3 şeklinde bulunan, maya plazmitleri şeklinde olup hücrelerde çok kopyalı şekilde olarak bulunur. Bu şekilde olan ekspresyon vektöründe *CYC1* geninin promotor bölgesinin ilk ATG kodonundan (1.) başlayarak -312 bç uzunluğunda bulunan promotor bölgesi kısmı *lacZ* genine eklenmiş halde bulunmaktadır. Bu çalışmada da kullanılan ekspresyon vektörü aynı zamanda daha önceki yapılan araştırmalarda *CYC1* geni

promotor yapısında bölgelerin belirlenmesi içinde kullanılmıştır ve böylece *CYC1* transkripsiyonunu kontrol için gerekliliği bulunan tüm düzenleyici elementleri içerdiği bölge olarak rapor edilmiştir. (Guarente ve ark. 1984).

Araştırmamızda kullanılan *GPD1-lacZ* rapörtör gen füzyonu da *GPD1* geninin kontrol elementlerini içerdiği bilinen 516 bç'lik promotor bölgesi bulunmaktadır. Bu promotor bölgesi translasyon başlama bölgesine göre -693'den -177 bç aralığındaki bölge olup *lacZ* gen füzyonu olarak YEp vektörü üzerine klonlanmıştır (Rep ve ark. 1999). *GPD1-lacZ* gen füzyonundan yapılan transkripsiyonun *S. cerevisiae*'da genomik *GPD1* geninden yapılan transkripsiyonla doğru orantılı olarak bulunduğu da daha önce Rep ve ark. (1999) tarafından gösterilmiştir. *GPD1-lacZ* gen füzyonu vektörü Prof.Dr. S. Hohmann (University of Gothenburg) tarafından laboratuvarımızdaki araştırmalar için daha önceden sağlanmıştır.

### **3.3. *Saccharomyces cerevisiae* Suşlarına Transformasyon**

*GPD1-LacZ* ve *CYC1-LacZ* gen füzyonlarını içeren plazmitlerin ilgili maya suşlarına transformasyonu için daha önce açıklanan ve standart metod olan lityum asetat-polietilen glikol metodu açıklandığı şekilde değiştirilmeden uygulandı (Rose ve ark. 1990). Transformasyon metodu kısaca aşağıda açıklandığı şekilde uygulandı.

Transformasyon yapılacak *S. cerevisiae* suşları 25 ml'lik YPD besiyerinde standart şartlar olarak kabul edilen 30 C sıcaklıkta ve 150 devir/dk karıştırma hızı olan inkübatörde logaritmik aşamaya kadar üretildi. Bu aşamada maya hücreleri 50 ml'lik falkon tüplerine alınarak masa üstü santrifüjde 1000 g'de 5 dk çöktürüldü. Çöken maya peletleri 25 ml'lik steril saf suda süspanse edilerek tekrar çöktürüldü. Elde edilen maya pelletleri bu kez 1 ml, 0.1 M lityum asetatı süspanse edilerek mikrofüj tüplerine aktarıldı ve tekrar çöktürüldü ve tekrar 500 µl 0.1 M lityum asetat'da süspanse edildi. Bu maya süspanسیونlarından taze mikrofüj tüplerine 50 µl alındı ve bu maya karışımına aşağıda verilen sırada ve miktarda diğer çözeltiler ilave edildi.

240 µl PEG (steril %50'lik stoktan)

36 µl 1 M LiAOc (taze hazırlanan stokdan)

6 µl denatüre Herring sperm DNA'sı



4-5 µl (1-2 µg) plazmid DNA'sı (GPD1-LacZ veya CYC1-LacZ plazmitlerinden)  
64 µl dsH<sub>2</sub>O (son hacim 350 µl olacak şekilde streil saf su ilave edildi)

Maya transformasyon karışımına verilen çözeltiler ilave edildikten sonra vorteksle son hızda 1 dk vortekslendi ve daha sonra 30 C'de etüvde 30 dk bekletildi. Bu süre sonunda bu kez transformasyon karışımları 42 C'de su banyosunda 20 dk bekletildi. Bekleme süresi sonunda transformasyon karışımı mikrofüjde 12500 rpm de 1 dk santrifüj edilerek maya pelletleri elde edildi, sıvı faz atıldı. Maya pelletleri 500 µl steril saf suda yavaşça süspanse edildi. Bu transformant maya süspanسیونlarından 100 µl alınarak Sc-Ura+dekstroz petrilere steril şartlarda yayma ekimi yapıldı. Transformant maya suşlarının seçici üreme ortamında üremeleri için petriyer 30 C'de inkübatörde maya kolonileri beklenen büyüklüğe erişinceye kadar bekletildi. Bu süre maya suşuna göre değişmekte olup özellikle yavaş üreyen mutant suşlarda 7-10 gün kadar olabilmektedir. Araştırmamızda kullanılan maya suşlarının transformantları 3-5 gün sonra beklenen büyüklüğü erişmiştir.

Maya transformantlarında raportör gen aktivitesi tayini için genellikle birincil transformant koloniler kullanılmaz. Çünkü bu transformant kolonilerde yeterince maya hücresi bulunmaz. Ayrıca bazı transformantlar stabil olmayabilir. Transformant koloniler direkt olarak sıvı kültüre ekildiğinde çok uzun bir lag aşaması vardır. Bu da bu tür deneylerde tercih edilmez. Bu nedenle sıvı kültürler ekim yapmak için tekrar daha fazla üretilen ve stabil oldukları da test edilen transformant pasajları hazırlanmaktadır. Bu araştırmada kullanılan transformant pasajları da aşağıda açıklandığı gibi hazırlanmıştır.

Elde edilen birincil transformantlardan 8-10 bağımsız koloni seçilerek tekrar taze Sc-Ura +dekstroz petrilere 0.5 x 0.5 cm ebatlarında küçük pasajlar yapıldı ve tekrar 30 C'de etüvde inkübe edilerek bu kez pasajların üremesi beklendi. Pasaj olarak üretilen transformantlar bir sonraki deneysel aşama için +4 C'de buzdolabında bekletildi. Bu şekilde hazırlanan pasajların hücre ve plazmit kaybı olmadan yaklaşık 1 ay uygun şartlarda sakalanabileceği bilinmektedir. Transformant pasajlar sıvı kültür deneyleri için aşağıda verildiği şekilde kullanıldı.

### 3.4. *S. cerevisiae* Transformantlarına Asit Stresi Uygulaması

Sitrik asit, asetik asit ve laktik asit belirlenen pHlarda 1.5 M stok çözeltileri şeklinde hazırlandı ve devamında sterilizasyon için 0.45 mM'lik filtre kullanıldı. Hazırlanan stok sitrik asit, laktik asit ve asetik asit çözeltilerinden repres ve derepres üreme ortamda logaritmik seviyeye kadar üretilen *S. cerevisiae* kültürlerine, ayrı ayrı sitrik asit konsantrasyonu 300 mM olacak şekilde, asetik asit 40 mM olacak şekilde üreme ortamlarına eklendi. Asit stresi uygulanan maya kültürlerinde standart üreme şartlarında 4 saat üremeye bırakıldı. Üreme süreleri sonunda maya hücreleri masa üstü santrifüjde 5 dakika çöktürüldü, sıvı faz atıldı. Maya peletleri bu kez 1 ml steril saf suda suspans edildi ve mikrofüjde tekrar çöktürüldü. Sıvı faz atıldı, maya peletleri bu kez 200 µl β-galaktozidaz lizat hazırlama tampon çözeltisinde (β-gal break buffer) pipetaj ve vorteks ile suspans edildi. Hazırlanan maya süspansiyonları gen füzyonlarından yapılan transkript miktarları tayin edilinceye kadar -80 C`de depo edildi.

### 3.5. Gen Füzyonlarından Promotor Aktivitesi Tayini

*GPD1-LacZ* ve *CYCI-LacZ* gen füzyonlarından ekspres edilen β-galaktozidaz enzim aktiviteleri kantitatif olarak ölçülerek belirlendi. β-galaktozidaz aktivitelerinin tayininde daha önce açıklanan standart yöntem uygulandı (Rose ve ark. 1990, Guarantee 1983). Bölüm 3.4'de açıklandığı şekilde üretilen maya transformantları 200 µl β-galaktozidaz lizis tampon çözeltisinde süspanse edildi. Bu maya süspansiyonlarına hücre membranını permeabilized etmek için %0.1'lik SDS den ve %100'lük kloroformdan 20'şer µl ilave edildi ve 1 dk son hızda vorteksledi. Bu aşamada 10x100 mm'lik test tüplerine 980 µl Z-buffer ilave edildi. Bu Z-buffer içine hazırlanan transformants hücre lizatlarından 10-20 µl ilave edilerek yavaşça karıştırıldı ve test tüpleri 30 C'deki su banyosunda optimum sıcaklığa ulaşılması için 3 dk bekletildi. Lizat içeren test tüplerine β-galaktozidaz enzimi substratı olan ONPG çözeltisinden 200 µl eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Bu aşamada deney başlangıç zamanı kayıt edildi. Test tüplerinde ONPG'nin β-galaktozidaz ile hidrolizi sonucu oluşan sarı rengin spektrofotometrede ölçülebilecek aralığına (OD<sub>420</sub>=0.1-1.5) kadar gelişimi için beklendi. Bu renk tonu açık sarı olarak kabul edildi. Beklenen renk oluşumu süresi sonunda geçen zaman tekrar kayıt edildi ve enzimatik reaksiyon test tüplerine 500 µl 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklenerek

durduruldu. Test tüpleri masa üstü santrifüjde 1000 g'de 5 dk santrifüj edilerek hücre lizatları çöktürüldü. Test tüplerindeki sıvı kısım 2 ml'lik spektrofotometre ölçüm hücrelerine aktarıldı ve sıvıdaki sarı rengin 420 nm'deki absorbası, lizat içermeyen kontrol reaksiyonuna karşı tayin edildi. Hücre lizatlarının toplam çözüner protein konsantrasyonları ise daha önce açıklandığı şekilde standart Lowry metodu ile tayin edildi. Bunun için 10x100 mm'lik test tüplerine önce 180 µl steril saf su alındı. Bu saf su içine önceki aşamada hazırlanan hücre lizatlarından 20 µl ilave edildi ve vorteksle karıştırıldı. Bu lizat çözeltisine önce 1 ml Lowry-C çözeltisi ilava edildi, vortekle karıştırıldı ve 10 dk oda sıcaklığında beklendi. Bu süre sonunda test tüplerindeki lizat süspansiyonuna taze hazırlanmış 100 µl 1N folin çözeltisi ilave edildi ve karışım vorteks ile son hızda karıştırıldı. Bu aşamada lizat karışımı oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. Bekleme süresi sonunda test tüpleri masa üstü santrifüjde 1000 g'de 5 dk santrifüj edildi. Elde edilen sıvı faz 2 ml'lik spektrofotometre hücrelerine aktarıldı ve oluşan mavi rengin absorbası spektrofotometrede OD<sub>750</sub> nm'de lizat içermeyen kontrol reaksiyonuna karşı ölçüldü. β-galaktozidaz aktiviteleri (ünitesi) dakikada hidroliz edilen nm ONPG/mg protein olarak ifade edildi (nm ONPG/dk/mg protein). GPD1-LacZ ve CYC1-LacZ transformantları ilgili üreme ortamlarında 2'şerli olarak üretildi. Herbir transformants maya kültüründen β-galaktozidaz aktivite tayinlei ise 3'lü set olarak yapıldı. Deneyle en az bir kez aynı koşullarda tekrarlandı. Sonuçlar bölümünde verilen β-galaktozidaz aktiviteleri yapılan en az 12 β-galaktozidaz test sonuçlarının ortalamasıdır. Aynı maya suşundan elde edilen transformantların β-galaktozidaz ünitelerinin standart sapmalarının %10 aralığında olduğu görülmektedir.

### **3.6. Sitrik Asidin Hücre Morfolojine Etkilerinin İncelenmesi**

Sitrik asidin hücre morfolojisi üzerine olan etkileri direkt görüntüleme ile ışık mikroskopunda 40x ve 100x objektifleri, 10x oküler kullanılarak lam-lamel arası preparat ile incelendi. Logaritmik aşamaya kadar 10 ml YPD besiyerinde ve standart üreme koşullarında üretilen yaban tip (BY4741: YST124) ve mutant *S. cerevisiae* hücreleri bu aşamada 5'er ml'lik iki kısma ayrıldı. Bu maya kültürlerinden bir bölümüne son konsantrasyonu 300 mM olacak şekilde steril sitrik asit ilave edildi ve 3 saat daha standart şartlarda üreme bırakıldı. Üreme süreleri sonunda bu maya kültürlerinden 5 ml alınarak lam-lamel arası preparat hazırlandı ve

ışık mikroskopunda hücre bölünme durumları ve hücre morfolojileri incelendi. İncelenen maya suşlarının mikroskop görüntüleri fotoğraflarak sonuçlar bölümünde verildi.

## 4- BULGULAR

### 4.1. Zayıf Asitlerin *CYCI* ve *GPD1* Transkripsiyonuna Etkileri

*CYCI* geni Cytochrome C, isoform 1 proteinini kodlamaktadır ve iki önemli işlevi vardır. Sitokrom C, iç mitokondrial membrana gevşek olarak bağlanmış solubl bir proteindir ve mitokondrial solunum zincirinin gerekli bir komponentidir. Ayrıca, Cyc1 proteininin mitokondriyal hasarlara yanıt olarak apoptozu başlattığı bilinmektedir. *GPD1* geni de NAD-bağımlı gliserol 3-fosfat dehidrojenaz enzimini kodlamaktadır ve hücrede NAD/NADH redoks dengesinin sağlanmasında çok önemli metabolitik görevi vardır. Aynı zamanda hücrenin ozmotik strese karşı korunmasını sağlayan gliserol biyosentezi için de anahtar enzim konumundadır.

Normal, zayıf asit içermeyen ve düzgün üreyebilmesi için %2 glukoz içeren üreme ortamı içerisinde (repress şartlar) standart üreme koşullarında *CYCI* gen ekspresyonu  $150 \pm 2$  ünite olarak bulundu. *GPD1* gen ekspresyonu  $1762 \pm 92$  ünite olarak bulundu. Üreme ortamlarına tek tek sırasıyla Asetik asit, Sitrik asit, Laktik asit eklenen kültürlerde *CYCI*'in ve *GPD1*'in transkripsiyonuna ortamdaki asit çeşitine göre etkileri görüldü. Normal ortamdaki ekspresyon seviyesi ile zayıf asit eklenen ortamlardaki ekspresyon seviyesi sonuçları karşılaştırıldığında *CYCI* ekspresyonuna laktik asitin önemli bir etkisinin olmadığını, sitrik asitin ise *CYCI* transkripsiyonunu yaklaşık %40 seviyesinde baskıladığı bulundu. Asetik asitin ise *CYCI* geninin transkripsiyonunu yaklaşık %50 oranında baskıladığı ve asetik asitin üreme ortamına eklenmesi sonucunda *CYCI* transkripsiyonunun  $79 \pm 4$  üniteye azaldığı bulundu. Sitrik asitin üreme ortamına eklenmesi sonucunda bazal transkripsiyon seviyesi  $1237 \pm 72$  ünite olan *GPD1* ekspresyonunun 2.7-kat aktive edilerek 4848 ünite transkripsiyonun gerçekleştiği bulundu. Laktik asitin de *GPD1* ekspresyonunu 2-kat aktive ettiği tayin edildi. Asetik asitin ise *GPD1* transkripsiyonunda önemli ölçüde (yaklaşık %30 oranında) baskılamaya neden olduğu, görüldü (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** Farklı zayıf asitlerin *CYCI* ve *GPD1*'de repres şartlarda transkripsiyona etkileri (\* $\beta$ -Galaktozidaz aktiviteleri nmol ONPG/dakika/mg protein olarak verilmiştir.  $\pm$  SD: Standart sapma değerlerini göstermektedir).

Üreme ortamı	Gen Füzyonları ve $\beta$ -Galaktozidaz Aktiviteleri* ( $\pm$ SD)	
	<i>CYCI-LacZ</i>	<i>GPD11-LacZ</i>
Normal ortam	150 $\pm$ 2	1762 $\pm$ 92
+ Sitrik asit	100 $\pm$ 4	4848 $\pm$ 132
+ Laktik asit	140 $\pm$ 4	3621 $\pm$ 137
+ Asetik asit	79 $\pm$ 4	1237 $\pm$ 72

Glukoz baskılaması ile kontrol olan *CYCI* geni %2 glukoz bulunan ortamda bazal seviyede transkribe edilirken; düşük seviyede glukoz veya gliserol laktat bulunan ortamda transkripsiyonu aktive edilir. *CYCI* geni kontrolü glukoz baskılaması ile olduğundan, hem normal üreme ortamında (repres) hem de derepres şartlarda aradaki farkı görmek adına zayıf asitlerle derepres şartlarda deney yapıldı ve sonuçları değerlendirildi. Glukoz baskılamasının olmadığı (%2 gliserol/laktat) üreme ortamlarında *CYCI* ekspresyonu 344 ünite olarak bulundu. Derepres üreme ortamlarına eklenen zayıf asitlerin *CYCI*'in transkripsiyonuna etkileri karşılaştırıldığında; sitrik asitin *CYCI* geni transkripsiyonunu yaklaşık 2-kat baskıladığı (repres şartlarda olduğu gibi) bulundu. Glukoz baskılamasının olmadığı derepres ortamda (%2 gliserol/laktat) üretilen maya transformantlarında *GPD1* ekspresyonu 2630 ünite olarak bulundu. Derepres üreme ortamına eklenen zayıf asitlerin *GPD1* geni transkripsiyonuna etkileri karşılaştırıldığında sitrik asitin bu genin transkripsiyonunu yaklaşık %40 oranında artırdığı bulundu (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.2.** Sitrik asidin *CYCI* ve *GPD1*'de derepres şartlarda transkripsiyona etkileri (\*Birim tanımları Çizelge 4.1`de verildiği gibidir).

Üreme Ortamı	Gen Füzyonları ve $\beta$ -Galaktozidaz Aktiviteleri* ( $\pm$ SD)	
	<i>CYCI-LacZ</i>	<i>GPD1-LacZ</i>
Derepres ortam	344 $\pm$ 16	2630 $\pm$ 45
+ Sitrik asit	130 $\pm$ 7	3591 $\pm$ 84

#### 4.2. Sitrik Asitin Derişime Bağlı *CYCI* ve *GPD1* Transkripsiyonuna Etkileri.

Normal, zayıf asit içermeyen ve düzgün üreyebilmesi için %2 glukoz içeren üreme ortamı içerisinde (repres şartlar) standart üreme koşullarında *CYCI* gen ekspresyonu 150 $\pm$ 2 ünite olarak bulundu. *GPD1* gen ekspresyonu 1762 $\pm$ 92 ünite olarak bulundu. Daha sonra üreme ortamlarına farklı konsantrasyonlarda sitrik asit eklendi ve gen ekspresyonları tayin edildi (Çizelge 4.3). Sitrik asidin farklı konsantrasyonlarının *CYCI* ve *GPD1* gen ifadelerine etkileri incelendiğinde konsantrasyona bağlı olarak *CYCI* geni transkripsiyonunda baskılanmanın arttığı, en yüksek baskılanma oranının ise sitrik asidin 300 mM olarak bulunduğu ortamda gerçekleştiği bu konsantrasyonda *CYCI* in transkripsiyonunun %50 kadar baskılandığı bulundu. *GPD1* geni ekspresyonunda ise konsantrasyona bağlı olarak önemli dercede aktivasyon gerçekleştiği ve en yüksek aktivasyonun 300 mM sitrik asit varlığında gerçekleştiği bulundu (Çizelge 4.3).

**Çizelge 4.3.** Farklı sitrik asit derişimlerinin *CYCI* ve *GPD1* 'de transkripsiyona etkileri (\*Birim tanımları Çizelge 4.1`de verildiği gibidir).

Sitrik asit derişimleri	Gen Füzyonları ve $\beta$ -Galaktozidaz Aktiviteleri*( $\pm$ SD)	
	<i>CYCI-LacZ</i>	<i>GPD1-LacZ</i>
Normal ortam	150 $\pm$ 2	1762 $\pm$ 92
+50 mM Sitrik Asit	126 $\pm$ 3	3134 $\pm$ 59
+100 mM Sitrik Asit	112 $\pm$ 6	3247 $\pm$ 204
+200 mM Sitrik Asit	117 $\pm$ 5	3721 $\pm$ 103
+300 mM Sitrik Asit	100 $\pm$ 4	4848 $\pm$ 132

#### **4.3. Asit Stresi Transkripsiyon Faktörlerinin *CYCI* ve *GPD1* Transkripsiyonuna Etkileri.**

*S. cerevisiae*`da asit stresine yanıt olarak aktive edilen transkripsiyon faktörleri War1 ve Haa1`dir. Bu transkripsiyon faktörlerinin sitrik asit stresine yanıt oluşumunda *CYCI* ve *GPD1* transkripsiyona etkileri de bu faktörelri içermeyen mutant suşlar kullanılarak tayin edildi. *HAA1* ve *WAR1* genleri silinmiş mutant *S. cerevisiae* suşlarına transform edilen *Cyc1-LacZ* ve *Gpd1-lacZ* gen füzyonlarının ekspresyon seviyeleri normal koşullarda ve sitrik asit içeren üreme ortamı koşullarında tayin edildi (Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5). *CYCI* transkripsiyonunun mutant suşlarda normal ortamda ekspresyon seviyesinde önemli değişim gözlenmedi. Bu sonuç War1p ve Haa1p`nin *CYCI* transkripsiyonu için normal koşullarda gerekli olmadığını göstermektedir. Ancak, asit stresi uygulanan koşullarda da mutant suşlarda yaban tip maya suşunda olduğu seviyede *CYCI* transkripsiyonunda baskılanma olduğu görüldü. Bu durum *CYCI* geni transkripsiyonunun asit stresi koşullarında baskılanmasında Haa1p veya War1p`nin yer almadığını göstermektedir.



**Çizelge 4.4.** War1p ve Haa1p *CYC1* transkripsiyona etkileri (\*Birim tanımları Çizelge 4.1`de verildiği gibidir).

Üreme ortamı koşulları	Maya Suşları ve $\beta$ -Galaktozidaz Aktiviteleri*( $\pm$ SD)		
	YST124 (Yaban tip)	YST321 ( $\Delta$ haa1 mutanı)	YST320 ( $\Delta$ war1 mutanı)
Normal ortam	150 $\pm$ 2	197 $\pm$ 34	145 $\pm$ 20
+0.3 M Sitrik Asit	100 $\pm$ 4	103 $\pm$ 1	104 $\pm$ 14

*GPD1* geni ekspresyonuna War1p ve Haa1p`nin etkileri incelendiğinde bu faktörlerin *GPD1* de normal koşullarda bazal transkripsiyona etkilerinin olmadığı görüldü. *HAA1* ve *WAR1* genleri silinmiş mutant suşlarda da *GPD1* geni ekspresyon seviyesinin ortalama 1800 ünite olarak gerçekleştiği görülmektedir (Çizelge 4.5). Sitrik asit stresinin uygulandığı koşullarda ise *GPD1* ekspresyonunun haa1 ve war1 mutant suşlarında 800-1000 ünite kadar azaldığı (ortalama %20-25) bulundu. Bu durum transkripsiyon faktörleri Haa1p ve War1p`nin *GPD1* geni transkripsiyonunun aktivasyonu için kısmen de olsa gerekli olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.5.** War1p ve Haa1p`nin *GPD1* transkripsiyona etkileri (\*Birim tanımları Çizelge 4.1`de verildiği gibidir).

Üreme ortamı koşulları	Maya Suşları ve $\beta$ -Galaktozidaz Aktiviteleri* ( $\pm$ SD)		
	YST124 (Yaban tip)	YST321 ( $\Delta$ haa1 mutanı)	YST320 ( $\Delta$ war1 mutanı)
Normal ortam	1762 $\pm$ 2	1835 $\pm$ 155	1807 $\pm$ 130
+0.3 M Sitrik Asit	4848 $\pm$ 132	3835 $\pm$ 3902	4048 $\pm$ 515

#### 4.4. Genel Stres Faktörü Msn2p'nin CYC1 ve GPD1 Transkripsiyonuna Etkileri.

*S. cerevisiae*'da stres koşullarında aktive edilen diğer bir transkripsiyon aktivatörü de Msn2p'dir. Bu faktörün sitrik asit stresi koşullarında *CYC1* ve *GPD1* transkripsiyonuna etkileri de incelendi. *MSN2* geni silinmiş mutant *S. cerevisiae* suşunda *CYC1-LacZ* ve *GPD1-LacZ* gen ifadesi sevipleri tayin edildi. Normal üreme koşullarında yani sitrik asit içermeyen üreme koşullarında hem *CYC1* ve hem de *GPD1* transkripsiyonunun yaban tip *S. cerevisiae* suşu seviyelerinde gerçekleştiği tayin edildi (Çizelge 4.6). Ancak sitrik asit koşullarında *GPD1* transkripsiyonunun aktivasyonunun yaban tip suşa göre çok düşük seviyede olduğu görüldü. Sitrik asit stresine yanıt olarak yaban tip suşta 4800 ünite olan transkripsiyonun *msn2* mutant suşunda 2000 ünite kadar gerçekleştiği bulundu. Bu sonuç bize Msn2p'nin sitrik asit stresine yanıt olarak *GPD1* transkripsiyonunun aktivasyonun da gerekli olduğunu göstermiştir. *CYC1* transkripsiyonunun da ise sitrik asit koşullarında normal ortama göre değişiklik olmadığı transkripsiyonunun aynı seviyede kaldığı bulundu (Çizelge 4.6). Bu durum sitrik asite bağlı olarak *CYC1*'de gerçekleşen baskılamada Msn2p'nin işlevi olduğunu göstermektedir. Msn2p'nin sitrik asit stresine yanıt olarak *CYC1* genini baskılayan bir faktörü aktive ettiği düşünülebilir.

**Çizelge 4.6.** Msn2p'nin *CYC1* ve *GPD1*'de transkripsiyona etkileri (\*Birim tanımları Çizelge 4.1'de verildiği gibidir).

Üreme ortamı koşulları	Gen Füzyonları ve $\beta$ -Galaktozidaz Aktiviteleri*( $\pm$ SD)	
	<i>CYC1-LacZ</i>	<i>GPD11-LacZ</i>
Normal ortam	162 $\pm$ 1	1777 $\pm$ 46
+300 mM Sitrik Asit	168 $\pm$ 11	2010 $\pm$ 36

#### 4.5. Hog1p'nin *CYCI* ve *GPD1* Transkripsiyonuna Etkileri.

Hog1p kinaz stres faktörleri ile aktive edilir. *GPD1* transkripsiyonunda ozmotik stres koşullarında (örneğin 1 N NaCl veya %10 glukoz gibi) işlevi olduğu bilinmektedir. Araştırmamızın bu aşamasında sitrik asit stresine bağlı *CYCI* ve *GPD1* geni regülasyonunda Hog1p kinazın işlevi olup olmadığı da test edildi. Bunun için *HOG1* geni silinmiş mutant *S. cerevisiae* suşu kullanıldı. Normal koşullarda ve sitrik asit stresi uygulanmış üreme koşullarında *CYCI*-LacZ ve *GPD1*-LacZ gen ekspresyon sevipleri karşılaştırmalı olarak analiz edildi (Çizelge 4.7). Beklenmedik bir şekilde Hog1p kinaz aktivitesinin *CYCI* geni transkripsiyonu için gerekli olduğu bulundu. Yaban tip maya suşunda 150 ünite olan *CYCI* transkripsiyonunun hog1 mutant suşunda normal koşullarda 86 üniteye düştüğü ve sitrik asite yanıt olarak da *CYCI* geninde bu mutant suşta baskılanma olmadığı bulundu (Çizelge 4.7). Bu durum Hog1p kinazın *CYCI* geni transkripsiyonu için hem normal koşullarda ve hem de sitrik asit stresi koşullarında gerekli olduğunu göstermektedir.

*GPD1* transkripsiyonunda ise beklendiği şekilde bazal transkripsiyonun normal koşullarda yaban tip maya suşundaki ekspresyon seviyesine göre azaldığı bulundu. Normal yaban tip maya suşunda 1762 ünite olan *GPD1* transkripsiyonunun hog1 mutant suşunda 719 üniteye azaldığı görülmektedir (Çizelge 4.7). Ayrıca, sitrik asit stresine yanıt olarak yaban tip maya suşunda görülen 2.5-kat aktivasyonun hog1 mutant suşunda gerçekleşmediği de görülmektedir. Bu durum Hog1p kinaz aktivitesinin hem normal koşullarda ve hem de sitrik asit stresine yanıt olarak *GPD1* transkripsiyonu aktivasyonunda gerekli olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.7)

**Çizelge 4.7.** Hog1p'nin *CYC1* ve *GPD1*'de transkripsiyona etkileri (\*Birim tanımları Çizelge 4.1'de verildiği gibidir).

Üreme ortamı koşulları	Gen Füzyonları ve $\beta$ -Galaktozidaz Aktiviteleri*( $\pm$ SD)	
	<i>CYC1-LacZ</i>	<i>GPD11-LacZ</i>
Normal ortam	86 $\pm$ 5	719 $\pm$ 12
+300 mM Sitrik Asit	96 $\pm$ 8	726 $\pm$ 22

#### 4.6. Asit Stresinin Hücre Döngüsü ve Morfolojisine Etkileri

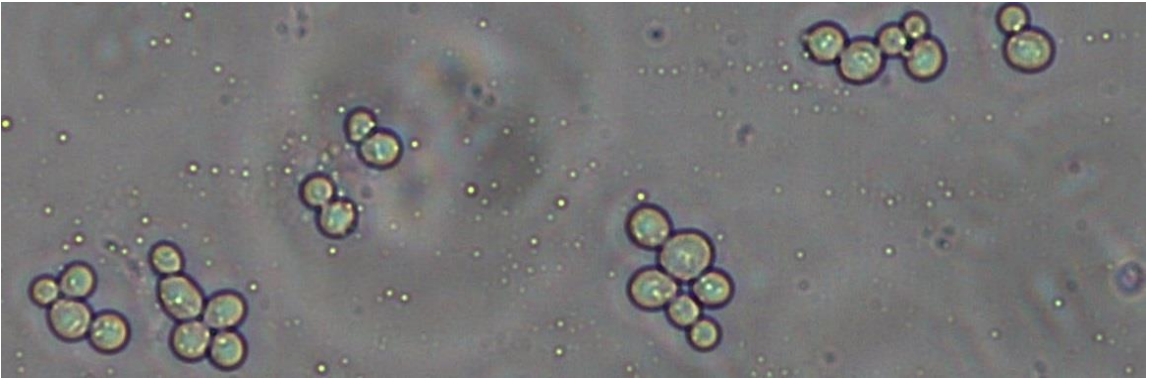
Sitrik asit stresinin hücre morfolojisine olan etkileri de mikroskopik olarak analiz edildi. Hem yaban tip ve hem de hog1 mutant suşu maya hücreleri normal ortamda (YPD) ve sitrik asit içeren ortamda üretildi. Normal ortamda üretilen yaban tip maya hücre morfolojilerinde tomurcuklanma oranlarında ve tomurcuklanma durumlarında (mitoz ve hücre döngüsü aşamaları morfolojilerinde) daha önce rapor edilen morfolojik durumlardan farklılık olmadığı görüldü (Şekil 4.1). Verilen mikroskop görüntüsünde S fazı (küçük tomurcuklu), eşit tomurcuklu (G2 veya M fazı) ve tomurcuksuz (G1 fazı) hücreleri görüntü alanında tespit edildi. Ancak, sitrik asit içeren ortamda üretilen maya hücrelerinde G1 aşaması hücrelerinin azaldığı hücrelerin daha çok G2 ve M aşamasında olduğu görüldü. Ayrıca, bazı hücrelerde mitoz aşaması bitmeden ikinci bir tomurcuklanmanın da başladığı görüldü (Şekil 4.2). Bu durum sitrik asit stresinin hücre döngüsüne etki ettiği ve mitozda hücrelerin ayrışmasında anomaliye neden olabileceğini öne sürmektedir.

Sitrik asidin hog1 mutant suşunda hücre döngüsü ve mitoz etkileri de normal ortamda ve sitrik asit içeren üreme ortamlarında karşılaştırmalı olarak mikroskopta analiz edildi. Normal ortamda yaban tip hücreler göre herhangi bir hücresel anomali gözlenemedi. Sitrik asit stresi uygulanan ortamda ise yaban tip maya hücrelerinde olduğu gibi tomurcuklanma şeklinde (G2 ve M fazında) anomaliler olduğu görüldü (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).

**Şekil 4.1.** Normal üreme ortamında yaban tip (YST124) maya hücrelerinin görüntüsü.

**Şekil 4.2.** Yaban tip maya hücrelerinin morfolojisine sitrik asit stresinin etkisi

**Şekil 4.3.** Normal üreme ortamında  $\Delta hog1$  mutant (YST240) maya suşu hücrelerinin görüntüsü.



**Şekil 4.4.** Sitrik asit stresinin maya hücrelerinde hücre bölünmesi üzerindeki etkilerinin analizi. Sitrik asit stresinden kaynaklanan anormal tomurcuklanma modelleri, ışık mikroskobu altında açıkça görülebilir.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mikroorganizmalar buldukları üreme ortamlarına çeşitli organik asitleri salgılamaktadır. Mikroorganizmanın türüne göre değişim gösterebilen bu organik asitler; asetik asit, sitrik asit ve laktik asittir. Asetik asit, sitrik asit, laktik asit gibi zayıf organik asitler, endüstriyel alanda üreme ortamlarında doğal olarak bulunabilecekleri gibi çoğunlukla mikrobiyal üremeyi engellemek amacıyla gıda katkı maddesi olarak da yaygın kullanılmaktadırlar.

Asetik asit, laktik asit, sitrik asit gibi bu zayıf organik asitler *S. cerevisiae* hücrelerinde asit stresi olarak tanımlanan metabolik yanıtı oluşturmaktadırlar. Bu metabolik yanıtta Msn2p, Haa1p, War1p, Hog1p gibi transkripsiyon faktörleri yer almaktadır. Msn2p genel stres yanıtında görev alarak birçok genin transkripsiyonunu kontrol etmektedir. Mayanın asetik asite hızlı adaptasyonu için transkripsiyon faktörü olan Haa1p gerekmektedir (Fernandes ve ark. 2005). Özellikle Haa1p doğrudan ya da dolaylı olarak, spesifik bir şekilde, asetik asit ile indüklenen gen ifadesini yaklaşık olarak % 80 düzenlemektedir (Mira ve ark. 2011).

HOG MAPK yolağı hiperozmotik stres ortamında aktifleşerek maya hücrelerinde gliserol sentezini sağlar ve hücrelerin stresi tolere edebilmesi için gereklidir. Hiperozmotik stres, hücre zarındaki Sln1p ve Sho1p reseptörleri ile algılanıp sitoplazmadaki MAPKKK'lara aktarılmaktadır. Sonuçta bir tür protein kinaz olan Hog1p fosforlanarak nükleusa geçer ve ilgili transkripsiyon faktörlerine etki ederek, ozmotik strese yanıt olarak bazı genlerin transkripsiyonlarının aktive edilmesini sağlamaktadır (Mager ve Siderus, 2002). MAPK HOG yolağı sitrik asit direncini düzenlemektedir (Lawrence ve ark. 2004). Hücrelerin sitrik asite maruz kalması sonucunda Hog1p fosforlanarak aktif hale gelmektedir.

Araştırmamız sonucunda elde edilen verilere göre, *CYCI* geni bazal transkripsiyonunun sitrik asit ve asetik asit stresi tarafından en az %50 baskılandığı, laktik asitin ise *CYCI* transkripsiyonuna etkisinin olmadığı görüldü. Araştırmamızda bu asitlerin etkileri sub-letal seviyede tek doz olarak ve asenkronize hücre kültürlerinde logaritmik aşamada incelendi. Sitrik asit ve laktik asitin *CYCI* transkripsiyonunu baskıladığı, *GPD1* transkripsiyonunu ise aktive ettiği bulundu. Asetik asit ve sitrik asitin araştırmamızda incelenen promotorlara olan

etkilerinin kümülatif veya sinerjistik olup olmadığı da aynı anda iki asit stresi uygulanarak incelendi. Elde edilen sonuçlar çiftli asit stresinin de tek asit stresi gibi etki ettiğini göstermiştir. Asetik asit varlığında yaptığımız araştırma deneylerimiz sonucunda ise hem *CYC1* hem de *GPD1* transkripsiyonunda önemli bir ölçüde baskılanmaya neden olduğu tespit edildi. Asetik asidin maya hücrelerinde apoptozu indüklediği de bilinmektedir.

*CYC1* ve *GPD1* genleri transkripsiyonları glukoz baskılaması ile kontrol edilen genlerdir. Üreme ortamlarında glukoz varlığında bu genlerin transkripsiyonları bazal seviyede ve sürekli yapılmaktadır. Üreme ortamında fermente edilemeyen karbon kaynağı bulunduğu anda ise her iki genin de promotor bölgelerine bağlanan faktörler hızlı bir şekilde değişerek transkripsiyonları yeniden programlanmakta ve promotor yapıları bazal durumdan aktive edilmiş duruma geçmektedir. Araştırmamızın bir bölümünde sitrik asit stresinin *CYC1* ve *GPD1* promotorlarının baskılanmış/bazal durumdan aktive edilmiş duruma geçişte asit stresinin etkisi incelendi. Elde edilen sonuçlar sitrik asit stresinin *CYC1* transkripsiyonunun aktivasyonunu engellediğini göstermektedir. *GPD1* transkripsiyonunda ise sitrik asit stresi dolayısıyla aktivasyonun tam olarak gerçekleşemediği, aktive edilmiş transkripsiyon seviyesine göre *GPD1* transkripsiyonunda azalma olduğu görüldü.

Araştırmamızda sitrik asitin ortamda varlığı, *CYC1* geni transkripsiyonunu önemli ölçüde baskıladığı fakat *GPD1* transkripsiyonunu 3-4 kat artırarak aktive ettiği tayin edildi. Transkripsiyon faktörleri olan Msn2p, Haa1p, War1p, ve Hog1p nin de sitrik asite yanıt oluşumunda *CYC1* ve *GPD1* genleri regülasyonunda işlevleri olup olmadığı da incelendi. Bu incelemede verilen transkripsiyon faktörlerinin delesyonla silindiği mutant *S. cerevisiae* suşları kullanıldı ve elde edilen sonuçlar yaban tip maya suşu ile elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılarak analiz edildi. Asit stresi şartlarında msn2, haa1, war1 mutantlarının asit stresine yanıtta *CYC1* ve *GPD1* geni transkripsiyonunda kısmen etkisi olduğu bulundu. Bu transkripsiyon faktörlerine ek olarak asit stresi ile aktive edilen protein kinaz olan Hog1p nin de *CYC1* ve *GPD1* geni transkripsiyonuna etkileri incelendi. Elde edilen sonuçlar özellikle *GPD1* geni transkripsiyonunda sitrik asit stresine bağlı olarak görülen aktivasyonun tamamen Hog1pye bağlı olduğunu göstermektedir.



*S. cerevisiae* yaban tip ve mutant suşlarında hücre döngüsü kontrol mekanizma noktaları hakkında birçok çalışma yapılmıştır. Hücre döngüsünün başlangıcı olabilmesi için, yani mitotik döngünün meydana gelebilmesi için, başlangıç aşamasında sınır noktasının aşılması gerekmektedir. Eğer bu sınır noktası aşılamıyorsa hücre döngüsü G1 fazında bloke olmaktadır. G1 fazını geçip ilerleyen hücre döngüsü için S fazı devamında G2/M fazları arasında bir sınır kontrol noktası daha bulunmaktadır. Burada ki kontrol noktasını aşamayan hücreler tetraploid bir halde kalmaktadırlar (Amon 1999).

Septinler, bitkiler hariç, mantarlarda, memelilerde ve şimdiye kadar incelenen tüm ökaryotlarda bulunan yüksek oranda korunmuş hücre iskeleti bileşenleridir (Barral ve ark. 2000). Septin proteinleri, plazma membranının altında bulunan filamentlere toplanmaktadır. Çok hücreli organizmalarda, bölünen hücre aralıklarında ve diğer kortikal bölgelerde bulunmaktadır. Lokalizasyonlarına uygun olarak, septinlerin maya hücrelerinde sitokinez için gerekli olduğu gösterilmiştir (Asamayor ve Snyder 2004).

*S. cerevisiae*, hücre döngüsü regülasyonunun analizi için iyi bir model sistemdir. Aslında, mayalarda hücre döngüsü aşamaları mikroskopik görüntülerle kolayca tanımlanabilmektedir. Mayalarda hücre döngüsü regülasyonunun (Cln, Cdk, Cki) genetik bileşenleri bulunmuştur (Hartwell ve ark. 1973). Araştırmamızda sitrik asit stresinin mayalarda hücre döngüsü ilerlemesi üzerindeki etkileri de analiz edildi. İlk aşamada maya hücreleri sitrik asit ortamında üretildi. 4 saatlik inkübasyondan sonra üretilen *S. cerevisiae* hücreleri mikroskop ile direkt görüntüleme ile hücre morfolojileri incelendi. Sitrik asite maruz bırakılan *S. cerevisiae* hücrelerinde septin mutantlarında görülen fenotipik özellikler (çoklu tomurcuklanma gibi) ortaya çıktığı bulundu. Bu nedenle sitrik asit stresinin Cdc28p ve septinlere etki ederek bölünmede anomaliye neden olduğu düşünülmektedir.

Elde edilen araştırma sonuçları zayıf asit stresinin hücrelerde GPD1 ve CYC1 gibi önemli metabolik işlevleri olan genlerde transkripsiyonu ve ayrıca hücre bölünmesini etkilediğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- Amon, A. 1999.** The spindle checkpoint. *Curr. Opin. Genetics & Development.*, 9: 69-75.
- Anonim, 2020a.** *Saccharomyces cerevisiae* Genome Database (SGD). <https://www.yeastgenome.org/>(Erişim tarihi: 30 Temmuz, 2020)
- Anonim, 2020b.** YEASTRACT (Yeast Search for Transcriptional Regulators and Consensus Tracking). <http://www.yeasttract.com/> (Erişim tarihi: 30 Temmuz, 2020)
- Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J.M., Adler, L. 1997.** The two isoenzymes for yeast NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J.*, 16:2179-2187.
- Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J.M., Prior, B.A. 1994.** *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell. Biol.*, 14(6): 4135-4144.
- Almeida, B., Ohlmeier, S., Almeida, A.J., Madeo, F., Leão C., Rodrigues, F., Ludovico, P. 2009.** Yeast protein expression profile during acetic acid-induced apoptosis indicates casual involvement of the TOR pathway. *Proteomics.*, 9: 720-732.
- Gladfelter, A.S., Kozubowski, Zyla, T.R., Lew, D.J. 2005.** Interplay between septin organization, cell cycle and cell shape in yeast. *J. Cell Sci.*, 118: 1617-1628.
- Ullah, A., Orij, R., Brul, S., Smits, G.J. 2012.** Quantitative analysis of the modes of growth inhibition by weak organic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78: 8877-8887.
- Blomberg, A., Larsson, C., Gustafsson, L. 1988** Microcalorimetric monitoring of growth of *Saccharomyces cerevisiae*: osmotolerance in relation to physiological state. *J.Bacteriol.*, 170: 4562-8.
- Burtner, C.R., Murakami, C.M., Kennedy, B.K., Kaeberlein, M. 2009.** A molecular mechanism of chronological aging in yeast. *Cell Cycle*, 15: 1256-1270.
- 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: 763–773.
- Cherry, J.M., Hong, E.L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E.T., Christie, K.R., Costanzo, M.C., Dwight, S.S., Engel, S.R., Fisk, D.G., Hirschman, J.E., Hitz, B.C., Karra, K., Krieger, C.J., Miyasato, S.R., Nash, R.S., Park, J., Skrzypek, M.S., Simison, M., Weng, S., Wong, E.D. 2012.** The genomiks resource of budding yeast. *Nucleic Acids Res.*, 40: 700- 705.

- Pereira, C., Camougrand, N., Manon, S., Sousa M., Côte M., 2007.** ADP/ATP carrier is required for mitochondrial outer membrane permeabilization and cytochrome c release in yeast apoptosis. *Mol. Microbiol.*, 66: 571-582.
- Claret, S., Gatti, X., Doignon, F., Thoraval, D., Crouzet, M. 2005.** The Rgd1p Rho GTP-ase-activating protein and the Mid2p cell wall sensor are required at low pH for protein kinase C pathway activation and cell survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell*, 4: 1375-1386.
- Bassett, D.E., Boguski, M.S., Hieter, P. 1996.** Yeast genes and human disease. *Nature*, 379: 589-590.
- Estruch, F. 2000.** Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24(4): 469-486.
- Feldman, H., 2012.** Yeast: Molecular and Cellular Biology, Wiley-Blackwell, Weinheim, Germany, 1650pp.
- Fernandes A.R., Mira, N.P., Vargas R.C., Canelhas I., Sa-Correia, I., 2005.** *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to weak acids involves the transcription factor Haa1p and Haa1p-regulated genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 337: 95-103.
- Forsburg, S.L., Guarente, L., 1988.** Mutational analysis of upstream activation sequence 2 of the *CYCI* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: a HAP2-HAP3- responsive site. *Mol. Cell. Biol.*, 8: 647-654.
- Foury, F., 1997.** Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene.*, 195: 1-10.
- Galisson, F., Dujon, B. 1996.** Sequence and analysis of a 33 kb fragment from the right arm of chromosome XV of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12: 877-885.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., Weissman, J.S. 2003.** Global analysis of protein expression in yeast. *Nature.*, 425: 737-741.
- Giannattasio, S., Guaragnella, N., Zdravlevic, M., Marra, E. 2013.** Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. *Front. Microbiol.*, 4: 1-7.
- Goffeau, A., Barrel, B.G., Bussey, H., Dawis, R.W., Feldman, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G. 1996.** Life with 6000 genes. *Science*, 274: 546-567.
- Guarente, L., Lalonde, B., Gifford, P., Alani, E. 1984.** Distinctly regulated tandem upstream activation sites mediate catabolite repression of the *CYCI* gene of *S. cerevisiae*. *Cell*, 36: 503-511.
- Hartwell, L.H., Mortimer, R.K., Culotti, J., Culotti M. 1973.** Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of *cdc* Mutants. *Genetics*, 74: 267-286.

- Herrero, P., Martinez-Campa, C., Moreno, F. 1998.** The hexokinase 2 protein participates in regulatory DNA-protein complexes necessary for glucose repression of the *SUC2* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 434: 71-76.
- Holyoak, C.D., Stratford, M., McMullin, Z., Cole, M.B., Crimmins, K., Brown, A.J., Coote, P.J. 1996.** Activity of the plasma membrane H(+)-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 3158-3164.
- Holyoak, C.D., Bracey, D., Piper, P.W., Kuchler, K., Coote, P.J. 1999.** The *Saccharomyces cerevisiae* weak-acid-inducible ABC transporter Pdr12 transports fluorescein and preservative anions from the cytosol by an Energy-Dependent Mechanism. *J Bacteriol.*, 4644-4652.
- Jung, J., Joopark, H., NamUhm, K., Kwounkim H., 2010.** Asymmetric synthesis of (S)-ethyl-4-chloro-3-hydroxy butanoate using a *Saccharomyces cerevisiae* reductase: enantioselectivity and enzyme-substrate docking studies. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1804: 1841-1849.
- Lambert, R.J., Stratford, M. 1999.** Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *J. Appl. Microbiol.*, 86: 157-164.
- Lawrence, C.L., Botting, C.H., Antrobus, R., Coote, P.J. 2004.** Evidence of a new role for the high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway in yeast: regulating adaptation to citric acid stress. *Mol. Cell. Biol.*, 24: 3307-3323.
- Lee, J., Moir, RD., McIntosh, KB., Willis, IM., 2012.** TOR signaling regulates ribosome and tRNA synthesis via LAMMER/Cik and GSK-3 family kinases. *Mol. Cell*, 45: 836-843.
- Guarente, L. 1994,** Yeast Promoters: Positive and negative elements. *Cell*, 36, 799-800.
- Ludovico, P., Sousa M.J., Silva M.T., Leao C.L., Corte-Real M., 2001.** *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiolgy.*, 147: 2409-2415.
- Mager, W.H., Siderius, M., 2002.** Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Res.*, 2: 251-257.
- Valli, M., Sauer, M., Branduardi, P., Borth, N., Porro D., Mattanovich D., 2006.** Improvement of lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by cell sorting for high intracellular pH. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 5492-5499.
- Mira, N.P., Henriques, S.F., Keller, G., Teixeira, M.C., Matos, R.G., Arraiano, C.M., Winge, D.R., Sà-Correia, I. 2011.** Identification of a DNA-binding site for the transcription factor Haa1, required for *Saccharomyces cerevisiae* response to acetic acid stress. *Nucleic Acids Res.*, 39: 6896-6907.
- Mollapour, M., Piper, P.W. 2006.** Hog1p mitogen-activated protein kinase determines acetic acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 6: 1274-1280.

- Nielsen, M.K., Arneborg, N. 2007.** The effect of citric acid and pH on growth and metabolism of anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* cultures. *Food Microbiol.*, 24: 101-105.
- Piper, P.W., Ortiz-Calderon, C., Holyoak, C., Coote, P., Cole, M. 1997.** Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein in *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H(+)-ATPase. *Cell Stress Chaperones.*, 2: 12-24
- Piper, P.W. 2011.** Resistance of yeast to weak organic acid food preservatives. *Adv. Appl. Microbiol.*, 77: 97-113.
- Rep, M., Reiser, V., Gartner, U., Thevelein, J.M., Hohmann, S., Ammerer, G., Ruis, H. 1999.** Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol. Cell. Biol.*, 19(8): 5474-5485.
- Schmitt, AP., McEntee, K. 1996.** Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 5777-5782.
- Sousa, M.J., Ludovico, P., Rodrigues, F., Leão C., Côrte-Real, M. 2012.** Stress and cell death in yeast induced by aceric acid: Cell metabolism- cell homeostasis and stress response, *Intech.*, 73-100.
- Stratford, M., Anslow, P.A. 1998.** Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic weak acid preservative. *Microbiol.*, 27: 203-206.
- Wieser, R.J., Renauer, D., Schäfer, A., Heck, R., Engel, R., Schütz, S., Oesch, F., 1990.** Growth control in mammalian cells by cell-cell contacts. *Environ. Health Perspect.*, 88:251-253.
- Winzler, E.A, Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Betino, R., Boone, J.D., Bussey, H., Chu, A.M., Connelly, C., Dawis, K., Dietrich, F., Dow, S.W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S.H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J.H., Jones, T., Loub, M., Liao, H., Liebudguth, N., Lockhart, D.J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M' Rabert, N., Mennard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J.L., Riles, L., Roberts, C.J., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Synder, M., Sookhi-Mahadeo, S., Storms, R.K., Véronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T.R., Wysocki R., Yen, G.S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M., Dawis, R.W. 1999.** Functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 285: 546-567.

## **EKLER**

**EK 1.** Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması

**EK 2.**  $\beta$ - Galaktozidaz Aktivitesi Hesaplanması

## **EK 1. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması**

### **1: Yeast Ekstrakt, Pepton, Dekstroz (YPD) (Tam Besiyeri)**

10 g yeast ekstrakt ve 20 g pepton saf suda çözüldü. Katı besiyeri (petriler) için, sıvı besiyeri ortamına 20 gram/litre oluşturacak şekilde *Agar agar* eklendi ve 121°C sıcaklıkta, 25 dk steril edildi. Karbon kaynağı olarak %20'lik stok çözelti halinde glikoz hazırlandı, 121°C'de 25 dakika otoklavda steril edildi. Glikoz, kullanımından önce besiyerlerine son konsantrasyonu %2 olacak şekilde ortama ilave edildi. Tam besiyeri *S. cerevisiae* suşlarının transformasyon öncesi rutin üremesi için kullanıldı.

### **2: Urasil İçermeyen Sentetik Tam Besiyeri (Sc-Ura)**

Sc-Ura besiyerini hazırlamak için 1.7 gram/litre Yeast Nitrogen Base (YNB), 5 gram/litre Amonyum sülfat distile suda çözülüp, otoklavda steril edildi. Otoklavdan sonra Sc-Ura amino asit karışımı xx gram/litre olacak şekilde saf suda çözüldü ve 0.45 mm'lik disk filtre ile steril edilerek verilen konsantrasyonlarda besiyerine eklendi.

Sc-Ura katı besiyerleri için 20 gram/litre olacak şekilde *Agar agar* ilave edildi. Glukoz son konsantrasyonu %2 olacak şekilde %20'lik steril stok çözeltilerden deneydeki kullanımdan hemen önce ilave edildi. Derepres şartlar için son konsantrasyon %0.1 olacak şekilde steril glukoz ilavesi yapıldı.

### **3: Lityum Asetat Çözeltileri (1M ve 0,1M)**

Lityum asetat (Molekül ağırlığı: 102,02) 1M olacak şekilde saf suda hazırlandı ve 0,45 µm por çaplı steril disk filtreler ile steril edildi. Maya transformasyonu için kullanıldı.

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

Polietilen Glikol (PEG) (Molekül ağırlığı: 3,350) distile suda %50'lik stok çözelti olarak hazırlanıp, 121°C'de 25 dk otoklavda steril edildi. Maya transformasyonu için kullanıldı.

### **5: Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (%0,1) ve Kloroform Çözeltileri**

Sodyum dodesil sülfat (SDS), steril distile suda %0,1'lik stok çözelti olarak hazırlandı. Kloroform seyreltilmeden, doğrudan stoktan kullanıldı. Bu çözeltiler maya hücrelerini permeabilized ederek hücre lizati hazırlamak için kullanıldı.

### **6: Lizis Tampon Çözeltisi ( Break Buffer)**

Lizis Tampon Çözeltisinin (Break Buffer) Bileşenleri:

100 mM Tris.HCl (pH: 8)

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

%20 Gliserol

4 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF).

### **7: $\beta$ - Galaktozidaz Tampon Çözeltisi (Z Buffer)**

Z Buffer içeriği:

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

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

10 mM KCl,

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

50 mM  $\beta$ -Merkepto-etanol çözeltisi

Yukarıda belirtilen son konsantrasyonlarda, steril distile su ile hazırlanıp +4°C'de saklandı

### **8: Lowry Çözeltileri**

I: Lowry A çözeltisi:

20 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ve 4g NaOH, toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü.

II: Lowry-B1 çözeltisi:

1 g  $\text{CuSO}_4$ , toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile su ile çözümlü, +4 °C'de depolandı.

III: Lowry-B2 çözeltisi:

2 g Sodyum potasyum tartarat, toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile su ile çözümlü, +4 C'de depo edildi. (Stok çözelti)

IV: Lowry-C çözeltisi:

Her deney için, Lowry-A, Lowry-B1 ve Lowry-B2 stok çözeltilerden belirlenen konsantrasyonda taze olarak hazırlandı.



### Lowry-C Çözeltisinin İçeriği:

24,5 ml Lowry A,

250 µl Lowry B1,

250 µl Lowry B2.

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

ONPG (Sigma N1127), en son konsantrasyonu 4 mg/ml olacak şekilde Z-tampon çözeltisi içinde hazırlanıp, +4°C'de saklandı.

### **10: Zayıf asit stok çözeltilerinin hazırlanması**

Sitrik asit tri-protik asit olduğundan 3 farklı pKa değeri vardır. Bunlar pKa1: 3.08, pKa2: 4,74, pKa3: 5.40'dır. Sitrik asitin farklı konsantrasyonlarının ve farklı pKa'larının *CYCI* ve *GPD1* geni ekspresyonuna ve hücre morfolojisine etkilerini belirlemek için önce 3 farklı pH'da 1.5 M stok sitrik asit çözeltisi hazırlandı ve 0.45 mM filtre ile steril edildi. Bu stok sitrik asit çözeltisinden repres ve derepres şartlarda üretilen logaritmik aşamadaki *S. cerevisiae* kültürlerine son konsantrasyonları 25 mM (83 µl), 50 mM (166 µl), 100 mM (332 µl), 200 mM (664 µl) ve 300 mM (1 ml) olacak şekilde ilave edildi. Sitrik asit ilave edilen maya kültürleri standart şartlarda 4 saat üretildi. Daha sonra β- galaktozidaz aktiviteleri tayini için kullanıldı.

## EK 2. $\beta$ - Galaktozidaz Aktivitesi Hesaplanması

$\beta$ -Galaktozidaz aktivitesi aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

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

$OD_{420}$ : Sarı rengin absorbansı

1.7: Sarı rengin bulunduğu tüpün hacmi (980 $\mu$ l Z buffer, 20 $\mu$ l lizat, 200 $\mu$ l ONPG, 500  $\mu$ l  $NaCO_3$ )

0,0045: ONPG'nin molar absorpsiyon katsayısı

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

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

P: Hücre lizatlarının protein konsantrasyonları (mg/ml)

$\beta$ -Galaktozidaz aktivitesi biririmi, dakika başına hücre lizatındaki 1 mg znr protein içindeki  $\beta$ -Galaktozidaz enzimince hidroliz edilen nmol ONPG (nmol ONPG/dk/ mg protein) cinsinden verilmiştir

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gözde ARSLAN  
Doğum Yeri ve Tarihi : Kastamonu, 05.03.1993  
Yabancı Dili : İngilizce  
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)  
Lise : Prof. Dr. Saime İnal Savi Anadolu Lisesi/ 2011  
Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü  
Malatya/Türkiye /2016  
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi/ 2020  
Çalıştığı Kurum/Kurumlar : -  
İletişim (e-posta) : arslangozde9337@gmail.com  
Akademik çalışmalar :

**Türkel, S., Arslan, G., İbrahimova, G. 2018.** Citric acid stress results with cell cycle abnormalities and activates *GPD1* expression in MAPK Hog1p/p38 dependent manner. 6th. International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey. DEÜ-İBG İzmir, 05-08 Eylül, 2018 (Poster)

**Türkel, S., Arslan, G., İbrahimova, G., Peters, T.S. 2018.** *Saccharomyces cerevisiae*'da organik asit stresinin *CYCI* ve *GPD1* genleri transkripsiyonuna etkilerinin incelenmesi. III. Ulusal Uygulamalı Biyolojik Bilimler Kongresi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir., 3-5 Mayıs, 2018. (Poster)