



***SACCHAROMYCES CEREVISIAE*'DA ASİT STRESİNİN
SUC2 GEN EKSPRESYONUNA ETKİLERİNİN
GENETİK VE BİYOKİMYASAL ANALİZİ**

AYLİN KAHRAMAN



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

***SACCHAROMYCES CEREVISIAE*'DA ASİT STRESİNİN *SUC2* GEN
EKSPRESYONUNA ETKİLERİNİN GENETİK VE BİYOKİMYASAL ANALİZİ**

Aylin KAHRAMAN

Prof. Dr. Sezai TÜRKEL
(Danışman)

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

**BURSA-2016
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ ONAYI

Aylin KAHRAMAN tarafından hazırlanan "Saccharomyces cerevisiae'da Asit Stresinin SUC2 Gen Ekspresyonuna Etkilerinin Genetik ve Biyokimyasal Analizi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliğiyle Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Başkan: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL
U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza



Üye: Yrd. Doç. Dr. Figen ERSOY
U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza




Üye: Yrd. Doç. Dr. Hülya KARACA GENÇER
Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylıyorum


Prof. Dr. Ali Osman DEMİR
Enstitü Müdürü

29 / 07 / 2016

Bilimsel Etik Bildirim Sayfası

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

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

beyan ederim.

29 / 07 / 2016

Aylin KAHRAMAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SACCHAROMYCES CEREVISIAE'DA ASİT STRESİNİN *SUC2* GEN EKSPRESYONUNA ETKİLERİNİN GENETİK VE BİYOKİMYASAL ANALİZİ

Aylin KAHRAMAN

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

İnvertaz enzimi *Saccharomyces cerevisiae*'nın melas ortamında üretimi için gerekli bir enzim olup *SUC2* geninden kodlanmaktadır. Periplasmik bir enzim olan invertazın ekspresyonu glukoz baskılaması ile transkripsiyon seviyesinde kontrol edilmektedir. Zayıf organik asitler olan asetik asit, sitrik asit, süksinik asit, sorbik asit ve benzoik asit gibi asitler mikroorganizmaların üreme ortamlarında doğal olarak bulunabileceği gibi bazen de gıda katkı maddeleri olarak kullanılmaktadırlar. Bu asitlerin üreme ortamında bulunması asit stresi olarak tanımlanan metabolik yanıtı oluşturmaktadır. *S. cerevisiae*'da bu metabolik yanıtta Msn2p, Haa1p, War1p, Hot1p gibi transkripsiyon faktörlerinin yer aldığı bilinmektedir. Bu çalışmada sitrik asit, sorbik asit ve benzoik asit gibi asitlerin *SUC2* geni ekspresyonuna ve invertaz aktivitesine etkileri bu transkripsiyon faktörlerinin delesyonlu suşları ve ayrıca stres yanıtında yer alan protein kinazlar olan Hog1p, Snf1p'nin delesyonlu suşları kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen araştırma sonuçları sorbik asit ve benzoik asitin invertaz aktivitesine ciddi derecede etki etmediğini göstermektedir. Bununla birlikte, sitrik asitin ise konsantrasyona ve pH'a bağlı olarak invertaz aktivitesini en az 10 kat azalttığı bulunmuştur. Şaşırtıcı bir şekilde çalışmada elde edilen sonuçlar *SUC2* geninden transkripsiyon yapılabilmesi için Hog1p'nin gerekli olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlara ek olarak, çalışmada elde edilen sonuçlar sitrik asitin *S. cerevisiae*'da invertaz enziminin periplasmik alana sekresyonunu engellemiş olabileceğini de öne sürmektedir.

Anahtar Kelimeler: *S. cerevisiae*, İnvertaz aktivitesi, Organik asit stresi, *SUC2* Geni, Sitrik asit, Hog1p, Transkripsiyon.

2016, XII + 64 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

GENETIC AND BIOCHEMICAL ANALYSIS OF THE EFFECTS WEAK ORGANIC ACID STRESS ON THE *SUC2* GENE EXPRESSION AND INVERTASE ACTIVITY IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Aylin KAHRAMAN

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

Supervisor: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Invertase enzyme, which is encoded by *SUC2* gene, is required for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in molasses. Invertase is a periplasmic enzyme and its expression is regulated by glucose repression at transcription level. Weak organic acids, such as acetic acid, citric acid, succinic acid, sorbic acid, and benzoic acid, can be found in the growth medium as natural components. These organic acid is also used as food additives. Presence of these acids in the growth medium triggers metabolic signal known as acid stress. It is known that the transcriptional regulators Msn2p, Haa1p, War1p, Hot1p involves in the acid stress response pathway in *S. cerevisiae*. In this research, the effects of organic acids on the *SUC2* gene expression and invertase activity were investigated by using wild type and deletion mutants that lacks one of the transcriptional regulators Msn2p, Haa1p, War1p, Hot1p and also protein kinases Hog1p, Snf1p involves in the stress response. Results of this study revealed that sorbic acid and benzoic acid has no significant effects on the invertase expression. On the other hand, it was clearly shown that the citric acid decreased invertase activity at least 10-fold in concentration and pH dependent manner. Unexpectedly, results of this research indicated that Hog1p is essential for the *SUC2* gene transcription. Moreover, our results suggests that citric acid stress might interferes with the secretion of invertase to periplasmic space in *S. cerevisiae*.

Keywords: *S. cerevisiae*, Invertase activity, Organic acid stress, *SUC2* gene, Citric acid, Hog1p, Transcription.

2016, XII + 64 pages

TEŐEKKÖR

Çalıőmalarımın her aşamasında destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve akademik hayata umutla bakmamı sağlayan danıőmanım Sayın Prof.Dr. Sezai TÖRKEL'e, akademik hayatım boyunca maddi ve manevi anlamda benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme, arkadaşlarım Sinem ANGIN ve Tuğçe KARADUMAN'a sonsuz teőekkürlerimi sunuyorum.

Aylin KAHRAMAN
29/ 07/ 2016



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLERİN DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	2
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nin Genom Yapısı ve Önemi.....	2
2.2. <i>SUC2</i> Geni ve İnvertzın Özellikleri.....	6
2.3. <i>SUC2</i> Geninin Transkripsiyonel Kontrolü.....	8
2.4. Zayıf Asit Stresi ve Önemi.....	17
2.5. Zayıf Asit Stresinin Hücrel Etkileri ve Önemi.....	18
2.6. <i>HOG</i> Sinyal Yolu ve Asit Stresi.....	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	32
3.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Suşları ve Genetik Özellikleri.....	32
3.2. Üreme Ortamı ve Özellikleri.....	34
3.3. <i>YE_p-Suc2-LacZ</i> Plazmitinin Transformasyonu.....	35
3.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'da β -Galaktozidaz Aktivitesinin Ölçülmesi.....	36
3.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'da İnvertz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	37
3.6. Zayıf Asit Stresinin Uygulanması.....	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. Zayıf Asit Stresinin İnvertz Aktivitesine Etkisi.....	39
4.2. Zayıf Asit Stresinde <i>msn2</i> , <i>hog1</i> , <i>haa1</i> , <i>war</i> 'in İnvertz Aktivitesine Etkileri.....	41
4.3. <i>HOG</i> Sinyal İletim Yolunun İnvertz Aktivitesine Etkisi.....	42
4.4. Zayıf Asit Stresinin <i>SUC2</i> Geni Transkripsiyonuna Etkisi.....	43
4.5. Zayıf Asit Stresinin Toplam İnvertz Aktivitesine Etkisi.....	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	46
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	51
EKLER.....	60
Ek 1: Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması.....	60
Ek 2: β - Galaktozidaz Aktivitesinin Hesaplanması.....	62
ÖZGEÇMİŞ.....	63

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%:	Yüzde
°C:	Santigrat derece
µm:	Mikron
g:	Gravity (santrifuj birimi)
α:	Alfa
β:	Beta
Δ:	Delta, delesyon
µg:	Mikrogram
µl:	Mikrolitre

Kısaltmalar	Açıklama
ATP:	Adenosin tri fosfat
cAMP:	Halkasal Adenosin Mono Fosfat
CLN:	Cyclin, hücre döngü proteinleri
DNA:	Deoksiribonükleik asit
DR:	Glukoz baskısı altında olmayan, (Derepressed)
GAL:	"Galactose metabolism"
HXK:	Hekzokinaz
<i>LacZ</i> :	β-galactozidaz geni
Leu:	Lösin
M:	Molar
MAT:	Mating type, <i>S. cerevisiae</i> 'da eşleşme tipi
Met:	Metionin
mg:	Miligram
MIG:	Multicopy inhibitor of GAL gene expression
ml:	Mililitre
mM:	Milimolar
mRNA:	Mesajcı ribonükleik asit
N:	Normalite
NAD:	Nikotin amid di-nükleotid
OD:	Optical Density, optik yoğunluk
ORFs:	Açık okuma bölgeleri
PEG:	Polyetilen glikol
pH:	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PKA:	Protein Kinaz A
R:	Glukoz baskılaması (Repressed)
RNA:	Ribonükleik asit
<i>S. cerevisiae</i> :	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC- Ura:	Urasil içermeyen sentetik tam üreme ortamı
SGD:	Saccharomyces Genome Database
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
SNF:	Sucrose non-fermenting

SUC:	Sucrose
TE:	Tris-EDTA
UDP:	Uridin di fosfat
URA:	Uracil
YNB:	Yeast Nitrogen Base
YPD:	Yeast extract pepton dextrose



ŞEKİLLERİN DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. <i>S. cerevisiae</i> genomunun fonksiyonel sınıflandırılması	5
Şekil 2.2. Düşük ve yüksek glukoz sinyalinin algılanması	10
Şekil 2.3. <i>SUC2</i> promotor bölgesinde transkripsiyon faktörlerinin bağlanma yerleri ve nükleozomların yerleşim bölgeleri	11
Şekil 2.4. <i>S. cerevisiae</i> 'da asetik asit stres yanıt mekanizması	22
Şekil 2.5. Zayıf asit stresinde görev alan bazı transkripsiyon faktörlerinin <i>SUC2</i> geni promotor bölgesine bağlanma yerleri	27
Şekil 2.6. Hiper ozmotik stres sinyal iletim yolunun bileşenleri ve ozmotik stresin <i>GPD1</i> geni ve diğer genlere iletilmesi	29
Şekil 3.1. Suc2-LacZ plazmitinin yapısı	34

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. <i>S. cerevisiae</i> mayasının taksonomik sınıflandırması	2
Çizelge 2.2. <i>S. cerevisiae</i> 'nin genom yapısı ve genom bileşenleri	3
Çizelge 2.3. <i>S. cerevisiae</i> 'nin kromozom uzunlukları	4
Çizelge 2.4. <i>SUC2</i> promotoruna bağlandığı belirlenen transkripsiyon faktörleri	12
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşları ve özellikleri	33
Çizelge 4.1. Benzoik asit, sorbik asit ve sitrik asitin invertaz aktivitesine etkileri	39
Çizelge 4.2. 3 farklı pKa da sitrik asitin invertaz aktivitesine etkisi	40
Çizelge 4.3. Sitrik asitin farklı konsantrasyonlarının invertaz aktivitesine etkisi	41
Çizelge 4.4. <i>msn2</i> , <i>hog1</i> , <i>haal</i> , <i>war1</i> 'in invertaz aktivitesine etkisi	42
Çizelge 4.5. <i>HOG</i> sinyal iletim yolunun invertaz aktivitesine etkisi	43
Çizelge 4.6. Sitrik asitin <i>SUC2</i> geni transkripsiyonuna etkisi	44
Çizelge 4.7. Toplam invertaz aktivitesinin ölçümü	45

1. GİRİŞ

İnvertaz enzimi *S.cerevisiae*'da *SUC2* geni tarafından kodlanır. İnvertaz enzimi sukroz ve rafinozun hidrolizi için gerekli bir enzimdir. *S.cerevisiae*'da invertaz iki farklı formda bulunur. Bu formlardan biri glikozillenip hücre dışına salgılanarak periplazmik alanda depolanırken, diğer form ise glikozillenmeyen, salgılanamayan ve hücre içerisinde bulunan formdur. Periplazmik alanda depolanan invertaz aktif form olup sentezi glukoz baskılaması ile kontrol edilir.

Zayıf organik asitler olan asetik asit, sitrik asit, süksinik asit, benzoik asit ve sorbik asit gibi asitler mikroorganizmaların üreme ortamlarında doğal olarak bulunabildiği gibi bazen üreme ortamlarına veya mikrobiyal ürünlere gıda katkı maddesi olarak ilave edilmektedirler. Bu asitler *S. cerevisiae*'da asit stresi olarak tanımlanan metabolik yanıtı oluşturmaktadır. Özellikle asetik asitin belirli konsantrasyonun üzerinde bulunmasının *S. cerevisiae*'da mitokondriyal bozunmaya ve apoptoza neden olduğu bilinmektedir. Bu zayıf organik asitlerin *SUC2* geni ekspresyonuna ve invertaz aktivitesine etkileri ise henüz moleküler seviyede incelenmemiştir.

Glukoz sinyaline ek olarak *SUC2* geni ekspresyonunun üreme ortamında meydana gelen asidifikasyondan nasıl etkilendiği bilinmemektedir. Bu tez araştırmasının amacı *SUC2* geni ekspresyonunun ve invertaz biyosentezinin üreme ortamı asidifikasyonundan nasıl etkilendiğini ve bu etkinin de *S.cerevisiae*'da hangi sinyal iletim yolları ve genler tarafından nasıl kontrol edildiğini genetik ve biyokimyasal yöntemler ile belirlemektir. Araştırmada hem yaban tip hem de asit stres metabolizmasında transkripsiyon faktörü olarak yer alan Hot1p, Msn2p, Haa1p, War1p mutant suşları ve ayrıca stres yanıtında yer alan protein kinazlar olan Hog1p, Snf1p mutant suşları kullanılarak sitrik asit (E330), benzoik asit (E211) ve sorbik asitin (E202) *S. cerevisiae*'da invertaz aktivitesine ve *SUC2* geni transkripsiyonuna etkileri incelendi.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

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

S. cerevisiae mantarlar aleminde yer alan tomurcuklanan tek hücreli ökaryot bir maya türüdür (Çizelge 2.1). *S. cerevisiae* 24 Nisan 1996'da genomu tam olarak sekanslanan ilk ökaryottur (Goffeau ve ark. 1996). Sekanslama Avrupa, Kuzey Amerika ve Japonya'da 600 den fazla bilim adamı tarafından 100 laboratuvarında yapılmıştır. SGD (Saccharomyces Genome Database) bu çalışmanın üzerine inşa edilmiş bir veri bankasıdır ve içinde maya genlerinin çeşitli özellikleri gayet ayrıntılı bir şekilde kaydedilmiştir (Cherry ve ark. 2012). SGD ökaryotik hücre genetiği ve fizyolojisinin yapısı ve organizasyonu hakkında temel bilgilerin geliştirilmesinde çok önemli bir konuma sahiptir. Dizilenen genom ve hızla gelişen moleküler biyoloji yöntemleri ile birlikte uluslararası araştırma ortaklıklarının ve maya delesyon projesi gibi büyük çaplı projelerin önünü açarak maya biyolojisi alanında büyük gelişmeler görülmüştür (Winzler ve ark. 1999).

Çizelge 2.1: *S.cerevisiae* mayasının taksonomik sınıflandırması

ÖKARYOTLAR	
Alem	Fungi
Şube	Ascomycota
Takım	Saccharomycetes
Sınıf	Saccharomycetales
Aile	Saccharomycetaceae
Cins	<i>Saccharomyces</i>
Tür	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

S. cerevisiae büyüklükleri 200 ile 2.200 kb arasında değişen 16 kromozoma sahip olup genomu yaklaşık 13.392 kb büyüklüğündedir (Madigan ve Mertingo 2010). *S. cerevisiae* nükleer DNA, sitoplazmada bulunan mitokondrial DNA, viral DNA ve dairesel plazmit DNA olmak üzere dört farklı ve birbirinden bağımsız genetik elemente sahiptir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2: *S. cerevisiae*'nin genom yapısı ve genom bileşenleri (Olson 1991)

Genom Büyüklüğü	12.5 Mb + rDNA (rDNA genellikle 1-2 Mb, oldukça değişken)
Tek Kopya DNA	12.0 Mb
Genetik harita uzunluğu	>4300 Cm
Kromozom sayısı	16
Organel DNA	Mitokondriyal DNA, 75 kb
Ekstrakromozomal elementler	2- mikron plazmiti DNAsı, Çift zincirli RNA virüsleri

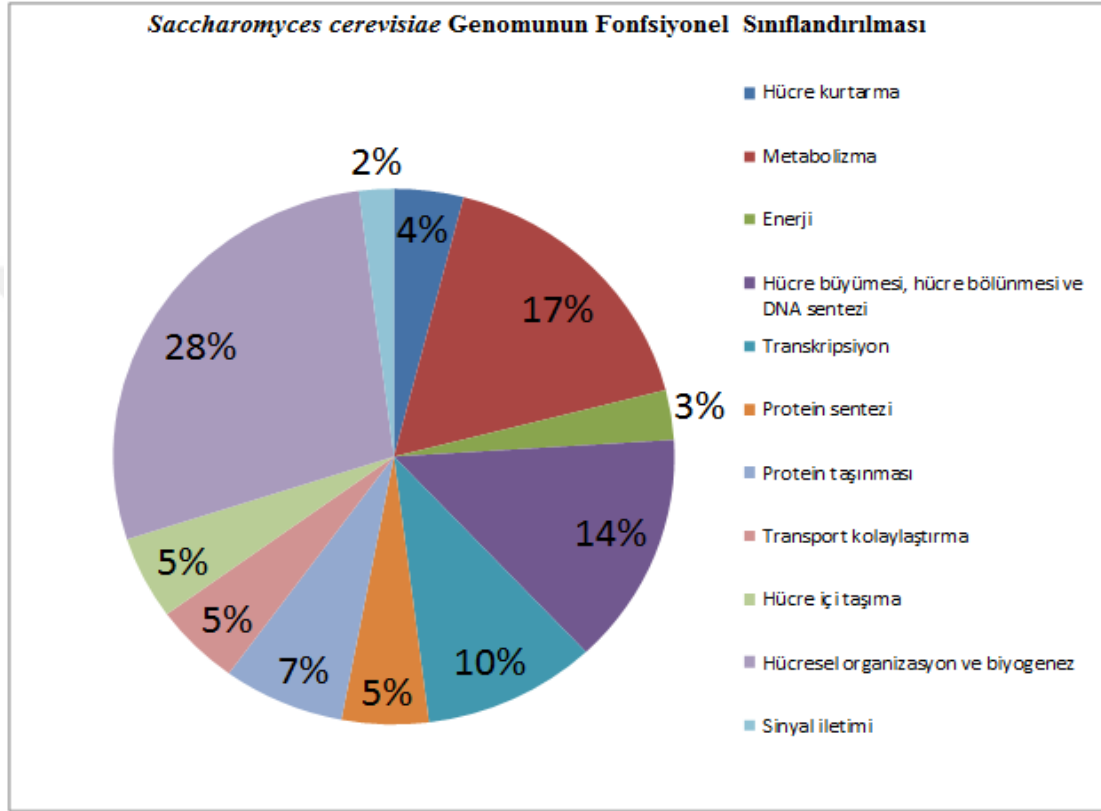
S. cerevisiae'nin XII. kromozomu en büyük kromozomdur. XII. kromozomun büyüklüğü 100-200 kopya arasında değişen rDNA tekrarları nedeni ile 2060-3060 kb arasında değişmektedir (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3: *S. cerevisiae*'nin kromozom uzunlukları (Olson 1991)

Kromozom No*	Kromozom uzunluğu (Kbç)
I	240
VI	280
III	350
IX	440
V	590
VIII	590
XI	680
X	755
XIV	810
II	840
XIII	950
XVI	980
VII	1,120
XV	1,130
IV	1,640
XII	1,095 + rDNA
Toplam	12,490 + rDNA

*Sıralama kromozom uzunluklarına göre yapılmıştır. rDNA kopya sayıları *S. cerevisiae* suşuna göre değişkenlik gösterebilmektedir.

Ribozomal DNA kromozom XII'de tekrarlı diziler olarak bulunur. *S. cerevisiae*'da 80 tanesi intron içeren 262 tRNA geni vardır. *S. cerevisiae*'nın farklı suşlarında kromozomlar çeşitli sayıda ve pozisyonda retrotranspozon (Ty elementi) içerirler. Genomun yaklaşık %70'i ORFs dir. Genomun her 2kb'ında ORFs bulunur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: *S. cerevisiae* genomunun fonksiyonel sınıflandırılması (Mewes ve ark. 1997)

S. cerevisiae biyolojide en çok çalışılan model organizmalardan biridir. Bu konuma endüstrideki yaygın kullanımından dolayı ulaşmıştır. Maya araştırmalarında elde edilen veriler işlemsel biyolojide gelişmelere yol açmış ökaryot hücrelerinin çalışma mekanizmasının anlaşılmasında kapsamlı modellerin oluşturulmasını sağlayan sistemsel yaklaşımlara olanak sunmuştur (Duina ve ark. 2014). İnsan biyolojisinde önemli olan pek çok protein önce mayada bulunan karşılıklarının araştırılması sonucunda keşfedilmiştir. Bunların arasında hücre döngüsü proteinleri, sinyalleme proteinleri ve protein işleme proteinleri yer alır.

S. cerevisiae dünyanın ilk sentetik ökaryot hücresinin oluşturulması için seçilmiş ve sentetik maya projesi sentetik bir *S. cerevisiae* maya suşu oluşturmak için kurulmuştur (Dymond ve ark. 2011).

S. cerevisiae başta gıda olmak üzere, endüstriyel alanda farklı amaçlar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılmasının nedeni patojenik özellik taşıması ve GRAS (Genellikle Güvenli Olarak Değerlendirilir) kategorisinde yer almasıdır. Ayrıca *S. cerevisiae*'nın pH değişimlerini tolere edebilmesi ve 40 °C' ye kadar sıcaklıkta üremesi, bu mayayı endüstri için cazip kılmaktadır (Rudolf ve ark. 2009).

S. cerevisiae ilaç endüstrisinde yeni ilaçların keşfinde de hem üretim hem de araştırma amaçlı kullanılmaktadır. Biyofarmasötikler olarak bilinen peptid yapılı bileşikler, enzim, hormon veya aşı amaçlı antijenik bileşikler *S. cerevisiae*'da üretilmektedir (Mattanovich ve ark. 2012). Rekombinant protein üretiminde önemli bir organizmadır (Porro ve ark. 2011). *S. cerevisiae* enerji sektöründe fosil kaynaklara alternatif olarak biyoyakıt üretiminde kullanılmaktadır. Çevre endüstrisinde biyoremediasyon işlemi için yine *S. cerevisiae*'dan yararlanılmaktadır. Son yıllarda başka bir uygulama alanı ise *S. cerevisiae*'da yeni metabolik yolak oluşturup nadir bulunan önemli ikincil metabolitlerin üretilmesidir. Taksol öncül maddesi olan taksadien, vanilya ve resveratrol *S. cerevisiae*'da üretilen bitkisel kaynaklı ikincil metabolitlerden sadece bazılarıdır (Wang ve ark. 2011, Engels ve ark. 2008).

2.2. SUC2 Geni ve İvertazın Özellikleri

S. cerevisiae endüstride yaygın kullanım alanına sahiptir. Endüstriyel amaçlar için kullanımda *S. cerevisiae* melas ortamında üretilmektedir. *S. cerevisiae*'nın melas ortamında üreyebilmesi için yüksek invertaz aktivitesine sahip olması gerekmektedir.

İnvertaz enzimi 60 yıldır aktif olarak gıda sektöründe özellikle şekerleme ve tatlı endüstrisinde kristal şekerin inversiyonu ve bitmiş ürünlerin raf ömrünü uzatmak amacıyla invert şeker elde etmede kullanılmaktadır. İnvertaz enzimi sukrozu hidrolize ederek invert şeker meydana getirir ve invert şeker ile içi sıvı olan şekerler ve çikolatalar üretilmektedir. İnvertaz enzimi ile ürünlerin içerisindeki su aktivitesi yüksek şeker konsantrasyonu ile düşürülmekte, mikroorganizmaların daha zor yaşayabileceği ortamlar oluşturulmakta böylece ürünlerin raf ömrü uzatılmaktadır. Ayrıca invertaz enzimi analitik alanda sukroz konsantrasyonunun tayini amaçlı biyosensörlerde kullanılmaktadır.

Endüstriyel bir enzim olan invertaz *SUC2* geni tarafından kodlanmaktadır. İnvertaz β -D fruktofuranoside-fructohydrolase enzimidir (E.C.3.2.1.26). İnvertaz enzimi glukoz ve fruktoz monosakkaritlerinden oluşan ekstraselüler sukrozu hidrolize eder.

SUC gen ailesinde *SUC1*, *SUC2*, *SUC3*, *SUC4*, *SUC5* ve *SUC7* genleri bulunur. *SUC* genlerinin her biri farklı kromozomların telomerlerine yakın bölgelerde bulunur (Carlson ve ark. 1985). *SUC1* kromozom 7, *SUC2* kromozom 9, *SUC3* kromozom 2, *SUC4* kromozom 13, *SUC5* kromozom 4'ün telomerik bölgelerinde bulunur. *S. cerevisiae* suşlarına bakıldığında *SUC* genlerinden sadece birinin aktif olarak bulunduğu görülmüştür. Çoğunlukla da bu genlerden *SUC2* geni aktif olarak bulunurken diğer *SUC* genlerinden önemli seviyede transkripsiyon yapılmamaktadır (Sarokin ve Carlson 1985). *SUC2* geni kromozom 9 da bulunur ve 1599 bp uzunluğuna sahiptir. Bu genin sistematik kodu YIL162W olarak belirlenmiştir.

(www.yeastgenome.org/locus/S000001424/overview, 2016).

Yapılan çalışmalarda invertaz enziminin sitoplazmik formu ve hücre dışına salgılanan iki formu belirlenmiş ve *SUC2* geninin invertazın her iki formu için de yapısal gen olduğu gösterilmiştir (Carlson ve Botstein 1982). *SUC2* geninden 5' uçları farklılık gösteren iki farklı mRNA'dan iki farklı formda invertaz kodlanır. 1.9 kb'lik mRNA'dan sinyal peptidi içeren ve hücre dışına salgılanan invertaz enzimi salgılanır. Bu invertaz enzimi glikozillenebilir ve sukrozun ekstraselüler hidrolizinde görev alır. Bu mRNA'nın

üretimi glikoz baskılaması ile kontrol edilir. 1,8 kb'lik mRNA'nın ise 5' ucunda sinyal peptidi bulunmaz ve bu mRNA'dan glikozillenmeyen sitoplazmik formda invertaz enzimi kodlanır (Carlson ve ark. 1983). Bu sitoplazmik form düşük seviyede hem glukozlu hemde glukozsuz ortamlarda sürekli olarak üretilir. Sitoplazmik invertaz üreme ortamının glukoz konsantrasyonundan bağımsız olarak az miktarda sentez edilir (Carlson ve Botstein 1982). Sitoplazmik invertazın işlevi tam olarak bilinmemektedir. Hücre dışına salgılanan invertaz ile sitoplazmik invertazın kodlama bölgeleri farklı yerlerden başlar ancak aynı okuma çerçevesini paylaşırlar (Taussig ve Carlson 1983). Salgılanan invertaz +1 pozisyonundaki ATG kodonundan başlar ve 1596. konumda bulunan stop kodonu ile sonlanır. Sitoplazmik invertaz ise +61 pozisyonundaki ATG kodonu ile başlar ve yine 1596. konumda bulunan stop kodonu ile sonlanır.

2.3. *SUC2* Geninin Transkripsiyonel Kontrolü

S. cerevisiae ve diğer birçok maya türü çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilmektedir. Ancak ortamda glukoz ve fruktoz bulunduğunda öncelikle bu karbon kaynaklarını kullanmayı tercih eder ve diğer karbon kaynaklarının kullanımı ile ilgili enzim ve protein kodlayan genlerin transkripsiyonunu durdururlar. Bu olaya glukoz baskılaması (Glucose repression) veya karbon katabolit represyonu (carbon catabolite repression) adı verilir (Gancedo 1998). Bu olayda ayrıca glikoneogenez, glioksilat ve krebs döngüsü, solunum ve peroksizomal fonksiyonlara ait enzimleri kodlayan genler de baskılanır.

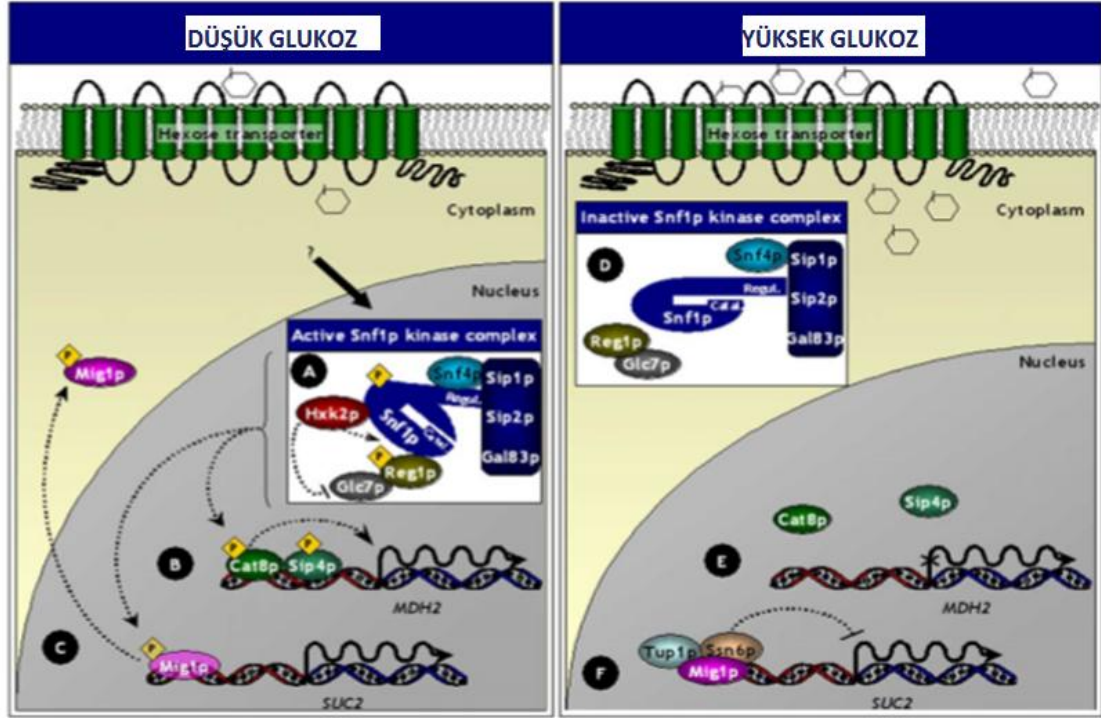
Üreme ortamında glukoz tüketildiğinde veya glukozlu ortamda üreyen *S.cerevisiae* hücreleri galaktoz, etanol, gliserol gibi farklı karbon kaynağı içeren bir ortama alındığında diğer karbon kaynaklarının kullanımı ile ilgili enzim ve protein kodlayan genlerin transkripsiyonu başlar. Bu olaya glukoz baskılamasının kaldırılması (derepresyon) adı verilir (Ronne 1995, Carlson 1998).

SUC2 geninin transkripsiyonel kontrolü glukoz baskılaması ile düzenlenmektedir. *SUC2* geninin transkripsiyonu üreme ortamındaki glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak düzenlenmektedir (Ronne 1995, Gancedo 1998). Bu genin transkripsiyonu yüksek glukozda baskılanır (Carlson ve Botstein 1982).

Glukoz baskılama şartları altında Mig1p-Cyc8p-Tup1p kompleksi doğrudan *SUC2* promotoruna bağlanır (Watson ve ark. 2000). Hxk2p, Grr1p, Reg1p, Glc7p ve Gcr1p nin içinde yer aldığı birçok diğer faktörler *SUC2* geninin baskılanmasında görev alır. Üreme ortamında yüksek miktarda glukoz bulunduğunda *SUC2* geninin transkripsiyonu Hxk2p ve Mig1p tarafından baskılanır (Herrero ve ark. 1998). *SUC2* geninin promotorunda farklı düzenleyici bölgeler tanımlanmıştır (Gancedo 1998). Bu düzenleyici bölgelerden ikisi -500'den -485'e ve -448'den -433'e kadar uzanan bölgelerde bulunmaktadır. Bu bölgeler Mig1p represörünün bağlanma yeridir. -500'den -485'e kadar uzanan birinci bölgeye ayrıca Mig1p'ye benzeyen bir protein olan Mig2p de bağlanabilir (Lutfiyya ve Johnston 1996). Glukoz konsantrasyonu fazla olduğunda Mig1p nükleusta bulunur ve *SUC2* geninin transkripsiyonunu baskılar. Glukoz konsantrasyonu düşük olduğunda ise repressor protein olan Mig1p fosforlanarak sitoplazmaya geçer ve *SUC2* genininden transkripsiyon başlar (De Vit ve Johnston 1999). Mig1p baskılamada Ssn6-Tup1p adı verilen iki farklı protein ile birlikte bulunur. Ssn6p ve Tup1p'nin tek başlarına DNA'ya bağlanma aktiviteleri yoktur ve Mig1p'ye spesifik olarak bağlanırlar. Bu nedenle Ssn6p-Tup1p kompleksine korepressör de denilmektedir. Korepresörler yalnız başlarına DNA'ya bağlanamazlar bu nedenle bağlanan çeşitli proteinlerle etkileşime girerler (Watson ve ark. 2000, Edmondson ve ark. 1996, Gancedo 1998).

S. cerevisiae'daki özellikle glukoz sinyaline bağlı birçok metabolik olay protein kinaz olan Snf1p ile kontrol edilir (Hardie 2007). Mig1p kompleksinin fosforlama olayını Snf1 protein kinaz kompleksi (Snf1p) gerçekleştirmektedir. Snf1p yüksek glukoz konsantrasyonunda inaktif, düşük glukoz konsantrasyonunda ise aktif halde bulunur. Düşük glukoz konsantrasyonunda Snf1p protein kinaz kompleksi aktif hale gelerek

Mig1p kompleksini fosforlar. İnaktif hale gelen Mig1p kompleksi *SUC2* promotorundan ayrılıp nükleustan sitoplazmaya geçer. Yüksek glukozda ise Snf1p kompleksi inaktiftir. Bu durumda Mig1p *SUC2* geni promotoruna bağlı kalıp diğer faktörler ile birlikte transkripsiyonu baskılar (Şekil 2.2) (Gagiano ve ark 2002).

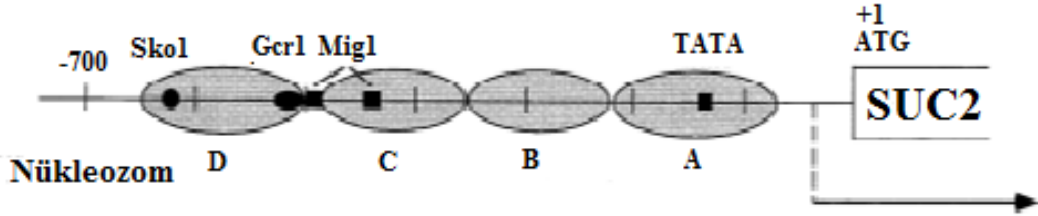


Şekil 2.2. Düşük ve yüksek glukoz sinyalinin algılanması (Gagiano ve ark 2002).

Üreme ortamındaki glukoz konsantrasyonu düşük olduğunda Snf1p protein kinaz kompleksi aktif hale gelerek Mig1p kompleksinin *SUC2* promotorundan ayrılıp sitoplazmaya geçmesine neden olur. Yüksek glukozda ise Snf1p kompleksi inaktiftir. Bu durumda Mig1p *SUC2* geni promotoruna bağlı kalıp diğer faktörler ile birlikte transkripsiyonu baskılar (Gagiano ve ark 2002).

SUC2 geninin glukozla baskılanması için nükleozomların da gerektiği gösterilmiştir (Wu ve Winston 1997, Bu ve Schmidt 1998). Repres şartlarda *SUC2* geninin promotor bölgesinde dört nükleozomun yerleştiği gösterilmiştir (Wu ve Winston 1997). Bunlardan birisi transkripsiyon başlatma kompleksinin oluştuğu, TATA kutusunun bulunduğu bölgeyi kapatmaktadır (Şekil 2.3). Derepres şartlarda ise bu bölge mikrokoccal nükleazlara açıktır. Bu da glukoz yokluğunda nükleozomların buradan uzaklaştırıldığını ya da yerlerinin önemli ölçüde değiştirildiğini gösterir (Wu ve

Winston 1997). Yabani tip ve *snf* mutanlığı oluşturulmuş *S. cerevisiae* hücrelerinde *SUC2* promotorunun kromatin yapısının analizleri ve genetik çalışmalar sonucu Snf/Swi kompleksinin enerji kullanarak kromatin yapısını bozduğunu ileri sürmektedir. Bu nedenden dolayı Snf/Swi kompleksi *SUC2* geni transkripsiyonunun ekspresyonu için gereklidir (Wu ve Winston 1997). Promotor bölgesinin yapısal düzenlenmesinde nükleozomların belirli bir bölgeye yerleşmesi veya bu bölgeden atılmaları da spesifik enzimlerce düzenlenmektedir. Bu enzim komplekslerinden HAT'lar (Histone Acetyl Transferase) histonlara asetil gurupları bağlayarak promotor bölgesinden ayrılmalarını sağlayabilirler.



Şekil 2.3. *SUC2* promotor bölgesinde transkripsiyon faktörlerinin bağlanma yerleri ve nükleozomların yerleşim bölgeleri (Wu ve Winston 1997).

SUC2 geninin glukoz baskılaması *S. cerevisiae*'de bulunan üç heksoz fosforlayan enzimlerden biri aracılığı ile olur. Glukoz varlığında uzun süreli cevapta (long term) Hxk2p'ye ihtiyaç duyulur. Fruktoz üzerinde üreyen *S. cerevisiae*'da ise Hxk1p proteinine veya Hxk2p'ye gereksinim duyulur (Rolland ve ark. 2001).

SUC2 promotoruna Mig1p'den başka birçok düzenleyici transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı düşünülmektedir. Bu faktörlerin bağlandığı diziler ve promotor üzerindeki yerleri YEASTRACT'dan sağlanmıştır (Çizelge 2.4). Bu transkripsiyon faktörlerinden bazılarının direkt olarak *SUC2* promotoruna bağlandığı çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir.

Çizelge 2. 4. *SUC2* promotoruna bağlandığı belirlenen transkripsiyon faktörleri

Transkripsiyon Faktörünün Adı	Bağlanma Dizisi	<i>SUC2</i> Geninde Bağlanabileceği Yer
Azf1p	AAAAGAAA	(-468, -460)
Azf1p	AAGAAAAA	(-466, -458)
Crz1p	CCCGAG	c*(-223, -217)
Fkh1p	GTAAACA	(-968, -961)
Fkh1p	ATAAATA	(-132, -125)
Fkh1p	ACAAACG	c*(-302, -295)
Fkh2p	GTAAACA	(-968, -961)
Fkh2p	ATAAATA	(-132, -125)
Fkh2p	ACAAACG	c*(-302, -295)
Gcr1p	CATCC	(-836, -831)
Gcr1p	CTTCC	(-510, -505)
Gcr1p	CTTCC	(-153, -148)
Gcr1p	CCTTC	c*(-202, -197)
Gis1p	AGGGG	(-846, -841)
Gis1p	AGGGG	(-759, -754)
Gis1p	GGGGA	c*(-976, -971)
Haa1p	CAGGGG	(-760, -754)
Haa1p	CCGGGG	(-439, -433)
Haa1p	GGGGAC	c*(-976, -970)

Çizelge 2. 4. (devam)

Haa1p	GGGGCG	c*(-499, -493)
Hac1p	CCAGC	(-644, -639)
Hsf1p	TTTCTGGAAA	(-377, -367)
Hsf1p	AAAGACCTTT	c*(-377, -367)
Mac1p	ACTCGTTT	c*(-604, -596)
Mac1p	ACTCGTTTAAT	c*(-604, -593)
Mbp1p	ACGCGT	(-423, -417)
Mbp1p	TGCGCA	c*(-423, -417)
Mcm1p	GGTCAAATCCT	c*(-456, -445)
Mcm1p	GGTCAAATCC	c*(-456, -446)
Mig1p	GGGGCGTAAAAA	c*(-499, -487)
Mig1p	AATTATCCGGGG	(-445, -433)
Mig2p	AATTATCCGGGG	(-445, -433)
Mig2p	GGGGCGTAAAAA	c*(-499, -487)
Mig3p	GGGGCGTAAAAA	c*(-499, -487)
Mig3p	AATTATCCGGGG	(-445, -433)
Mot3p	AAGGTA	(-739, -733)
Mot3p	AAGGTA	(-315, -309)
Mot3p	AGGGAA	c*(-342, -336)
Mot3p	TAGGTA	c*(-734, -728)
Mot3p	TAGGTA	c*(-524, -528)
Mot3p	TAGGAA	(-456, -450)

Çizelge 2. 4. (devam)

Mot3p	TAGGAT	c*(-163, -158)
Msn2p	CCCCT	(-976, -971)
Msn2p	TCCCC	c*(-846, -841)
Msn2p	TCCCC	c*(-759, -754)
Msn4p	CCCCT	(-976, -971)
Msn4p	TCCCC	c*(-846, -841)
Msn4p	TCCCC	c*(-759, -754)
Nrg1p	CTCCC	c*(-515, -510)
Nrg1p	CCCCT	(-976, -971)
Nrg1p	TCCCC	c*(-846, -841)
Nrg1p	TCCCC	c*(-759, -754)
Rgt1p	AATAGGC	c*(-447, -436)
Rlm1p	TATAAATAGA	(-133, -123)
Rph1p	CCCCT	(-976, -971)
Rph1p	TCCCC	c*(-846, -841)
Rph1p	TCCCC	c*(-759, -754)
Rtg1p	GTCAC	(-832, -827)
Rtg1p	GGTAC	(-313, -308)
Rtg3p	GGTAC	(-313, -308)
Rtg3p	GTCAC	(-827, -822)
Stb5p	CGGAG	(-948, -943)
Stb5p	CGGTG	(-752, -747)

Çizelge 2. 4. (devam)

Stb5p	CGGGG	(-438, -433)
Stb5p	GGGGC	c*(-499, -495)
Stb5p	CGGGC	c*(-308, -303)
Tec1p	CATTCT	(-104, -98)
Tec1p	GAATTCCC	(-939, -931)
Tec1p	ACATTCTG	(-105, -97)
Tec1p	TCCTTACA	c*(-359, -351)
Tec1p	TCCTTACG	c*(-265, -257)
Tec1p	CCTTAC	c*(-358, -352)
Tec1p	CCTTAC	c*(-264, -258)
Xbp1p	CTCGA	(-528, -523)
Xbp1p	AGCTC	c*(-811, -806)
Xbp1p	AGCTC	c*(-268, -263)
Yap1p	TGACAAA	(-242, -235)
YER130C	AGGGG	(-846, -841)
YER130C	AGGGG	(-759, -754)
YER130C	GGGGA	c*(-976, -971)

c*, Crick zincirindeki dizilimi göstermektedir.

(www.yeasttract.com/findregulators.php?type=pot&genes=YIL162W, 2016)

Mig1p glukoz baskılamasında çok önemi olan bir transkripsiyon faktörüdür. Bu protein glukozla baskılanan çeşitli genlerin promotorlarına bağlanır. Cys2-His2 çinko parmak yapısındadır (De Vit ve ark. 1997). Mig1p (G/C)(C/T)GGGG konsensus dizilimini içeren ve GC box adı verilen bölgeye bağlanır (Wu ve Trumbly 1998). Ayrıca bu GC dizisinin 5' bölgesinde A,T bakımından zengin bölge de bu proteinin bağlanması için

gereklidir (Gancedo 1998). Mig1p memelilerdeki Sp1 proteinine benzer. Krox/Egr ve Williams tümör proteinleri de GC box bağlanma proteinleri olarak bilinir (Ronne 1995).

Gcr1p (Glycolysis regulatory protein-1) ise glikolitik enzim genlerinin yüksek seviyede transkripsiyonu için gerekli olan bir transkripsiyon faktörüdür. Spesifik olarak glikolitik genlerde CT kutusu (5'-CTTCC-3' nükleotid dizisi) adı verilen bölgeye bağlanır (Baker 1991). Genetik çalışmalar Gcr1p'nin Gcr2p ile etkileşimde olduğunu göstermektedir (Uemura ve Jigami 1995). Türkel ve ark. (2003) Gcr1p'nin *SUC2* geninin promotor bölgesine bağlandığını göstermişlerdir. *gcr1* mutantlarında *SUC2* transkripsiyonu sürekli (devamlı) ve invertaz aktivitesi üreme ortamındaki glukoz konsantrasyonundan bağımsızdır. Bu da Gcr1p proteininin *SUC2* transkripsiyonu için gerekli olduğunu göstermektedir. Gcr1p, *SUC2* geninin düzenleyici bölgesinde Mig1p'nin yanında bulunan bölgeye (-519, -495) bağlanır ve Gcr1p tam anlamıyla *SUC2* geninin baskılanması için gereklidir. Ancak Gcr1p'nin *SUC2* geninin baskılanmasındaki rolü tam olarak açık değildir. Fakat Mig1p'nin yanına bağlanması transkripsiyon faktörleri arasında bir yarışın olabileceğini öne sürmektedir (Türkel ve ark. 2003).

SUC2 promotoruna bağlanan diğer bir protein Med8p'dir (Moreno- Herrero ve ark. 1999). Bu protein transkripsiyonel mediator olarak da bilinmektedir ve lösün fermuarı (Leucin Zipper) yapısına sahiptir. Med8p'nin lösün fermuar kısmı proteinler arası etkileşim bölgesi olarak çalışır. Böylece Med8p homodimer oluşturabilir veya lösün fermuar yapısı içeren diğer proteinler ile etkileşerek heterodimer oluşturabilir. Bu şekilde monomer veya dimer olarak *SUC2* promotoruna bağlanabilir. Med8p spesifik olarak *HXK2* geninin downstream repressing sequence bölgelerine (DRS) ve *SUC2* geninin upstream activating sequence (UAS) bölgesine bağlanır. Bağlanma bölgesi (C/A)(G/A)GAAT heptamerik motiftir (Moreno- Herrero ve ark. 1999, De la Cera ve ark. 2002). Med8p ayrıca *HXT1* (Hexose transporter-1), *GLK1* (Glucokinase-1), *HXK1* (Hexokinase-1) genlerinin düzenleyici bölgelerinde UASsuc benzeri korunmuş (C/A)(G/A)(G/A)AAT dizisine de bağlanır. De la Cera ve ark. (2002) bu diziyi "MED8 bölgesi" olarak adlandırmışlardır. Bu genlerden *HXT1* ve *HXK2* yüksek glukozda

uyarılırken *GLK1*, *HXK1* ve *SUC2* genleri baskılanır (Moreno- Herrero ve ark. 1999, De la Cera ve ark. 2002).

Represör Rgt1p ve cAMP bağımlı protein kinazlar *S. cerevisiae*'da *SUC2* gen ekspresyonunu kontrol eder (Gancedo ve ark. 2015). Rgt1p *SUC2* geninin promotor bölgesine bağlanabilmesine rağmen *SUC2* geninin ekspresyonunda az bir etkiye sahiptir. Rgt1p Mth1p ile birlikte glukoz transporterlarını kodlayan *HXT* geninini baskılar. *HXT* promotorlarından Rgt1p salınması cAMP bağımlı protein kinaz (PKA) aktivitesini gerektirir (Gancedo ve ark. 2015).

2.4. Zayıf Asit Stresi ve Önemi

Zayıf organik asitler gıda ve kimya sanayinde yaygın olarak kullanılırlar. Gıda endüstrisinde zayıf asitler mikrobiyal üremeyi kontrol etmek veya çeşitli gıdalara renk, koku, tat kazandırmak amacıyla kullanılırlar. Zayıf organik asitler olan asetik asit, sitrik asit, süksinik asit, sorbik asit ve benzoik 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), sorbik asit (pKa 4.76) veya benzoik asitin (pKa 4.19) RCOOH grubu ayrılmamış halde bulunur ve bu durumda önemli derecede mikroorganizmaların üremesini inhibe ederler (Piper ve ark. 2001).

Sitrik asit ve sitrik asitin tuzu organik asit düzenleyicidir ve ürünlerin pH kontrolü için yiyecek ve içecek endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yiyecek ve içeceklerin üretiminde sitrik asit genellikle tad geliştirmek amacıyla aroma olarak kullanılır. Ayrıca sitrik asit yiyecek ve içeceklerdeki mikrobiyal üremeyi önlemek içinde kullanılır. Bununla birlikte sorbik ve benzoik asit gibi diğer zayıf asitlerle birlikte gıda bozulmasını önlemek amacıyla şelat oluşturucu olarak kullanılmaktadır (Lawrence ve ark. 2004).

Hijyenik üretim ve organik asit koruyucu kullanılmasına rağmen, maya ve küf bozulmaları yiyecek ve içecek endüstrisinde hala büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Düşük pH ve organik asit varlığı gibi ekstrem koşullara maya hücreleri uyum gösterirler ve bu koşullarda üremeye devam ederler. Ancak bu ekstrem koşullar sıklıkla mayada bozulmaya neden olur. Zayıf organik asitler *S. cerevisiae* tarafından degrid edilmeyp hücrede asit stresini oluştururlar (Piper ve ark. 2001).

2.5. Zayıf Asit Stresinin Hücresel Etkileri ve Önemi

S. cerevisiae hücreleri fizyolojik olarak uygun miktarlardaki stres yaratıcı maddelere maruz bırakıldığında, sadece bu stres yaratıcı ajanın yüksek dozuna karşı değil ayrıca stres yaratıcı diğer ajanlara karşı da tolerans geliştirirler. Bu olay çapraz koruma (crossprotection) adını alır. Örneğin birçok sıcaklık şoku proteini termal stresin yanında besin açlığı gibi başka stresler ile de uyarılır. Stresle uyarılan birçok genin promotorlarında STRE (Stress Response Element) dizilimi bulunur (Estruch, 2000).

Maya hücreleri endüstriyel alanda üretilirken çeşitli stres etmenlerine maruz kalırlar. Hücresel makromoleküller olan proteinler, nükleik asitler ve hücre membranı bu stres şartlarında büyük oranda hasar görür ve bu durum hücre büyümesinin, hücre yaşamının ve fermentasyonun inhibe edilmesine neden olur. Bu etkilerden korunmak için maya hücreleri stres proteinlerinin uyarılması, stres koruyucuların oluşturulması, membran yapısının değiştirilmesi, translasyonun baskılanması, stres tarafından tetiklenen sinyal transdüksiyon yolları ile ilgili gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi çeşitli stres tolerans mekanizmalarına ihtiyaç duyar (Shima ve Takagi 2009).

Endüstriyel fermentasyonda mayalar düşük su aktivitesi ve sitotoksik bileşiklerin varlığı gibi çeşitli stres koşullarına maruz kalırlar. Maya hücreleri oluşan yeni ortama adapte olabilmek için stres yanıtını tetikleyerek bu olumsuz koşullara yanıt verir. Ancak bazen bu yanıt yetersiz olabilir ve hücre ölümü gerçekleşir (Sousa ve ark. 2012).

Düşük pH'da zayıf organik asitlerin antimikrobiyal etkilerinin hücre içi asidifikasyonuna ve anyon birikimine neden olduğu gösterilmiştir (Krebs ve ark. 1983, Salmond ve ark. 1984).

Besinlerdeki bakteriyel ve fungal üreme, üreme ortamındaki çözünmemiş asit konsantrasyonuyla orantılı olarak asidifikasyonun artmasıyla engellenir. Zayıf asitlerin çözünmemiş nötr toksik formu pasif difüzyon ile hücre içerisine geçer ve bu form hücre sitozolünde çözünerek proton ve asid anyonları oluşur. Bu durum sitoplazmanın asidifikasyonuna ve intraselüler asid iyonu birikimine neden olarak birçok metabolik yolağı etkiler (Krebs ve ark. 1983, Pampulha ve Loureiro-Dias 1990, 2000, Holyoak ve ark. 1996).

Hücresinin zayıf organik asitlere maruz kalması sonucunda maya hücrelerinin membran permeabilitesi azalır, anyon ekstrüzyonu (çıkışı) olur, hücrenin zayıf organik asitleri katabolize etme yeteneğı artar ve genlerin ekspresyonu değışir. Benzer olarak hücre membranının H^+ permeabilitesi değışir, hücreden aktif proton çıkışı olur (Holyoak ve ark. 1996).

Asetik asit, sitrik asit, süksinik asit, sorbik asit ve benzoik asit gibi zayıf organik asitler önemli gıda koruyucu ve güçlü fungustatik maddelerdir. Bu zayıf asitler hücrenin sitozolünde birikerek hücre pH'nı ve enerji dengesini bozarlar. Yüksek anyon birikimi hücrede anormal derecede yüksek turgor basıncı oluşturabilir. Ayrıca hücrede serbest radikal oluşumunu etkileyip şiddetli oksidatif strese neden olur (Giannattasio ve ark. 2013).

Zayıf organik asitler üreme ortamına eklendikten hemen sonra hücreler, hücre döngüsünden çıkıp uzun bir süre latent faza geçerler. Birkaç saat sonra hücreler tekrar üremeye devam ederler (Piper ve ark. 1997, 1998, Holyoak ve ark. 1999). Sorbik asit ve benzoik asit *S. cerevisiae*'da glikolizisi inhibe ederek enerji azalmasına neden olur (Warth 1991, Piper ve ark. 1997). İnhibisyon fosfo-fruktokinaz reaksiyonunda

gerçekleşir (Krebs ve ark. 1983, Pearce ve ark. 2001). pH'ın azalması 6-fosfofruktokinazı (PFK1) inhibe ederek glikolitik yolağa etki eder.

S. cerevisiae'da hücre bütünlüğünü sağlayan protein kinaz C yolağının asit stresi ile aktive olduğu ve bu aktivasyonun hücre membranında yer alan Mid2p sensörüne bağlı olduğu daha önceki araştırmalarda gösterilmiştir. Hücre duvarı sensörü Mid2p ve Rgd1p (HOG yolu)'yi kapsayan iki ayrı yolak birlikte hücre bütünlüğünü sağlayarak asit toleransını artırır (Claret ve ark. 2005).

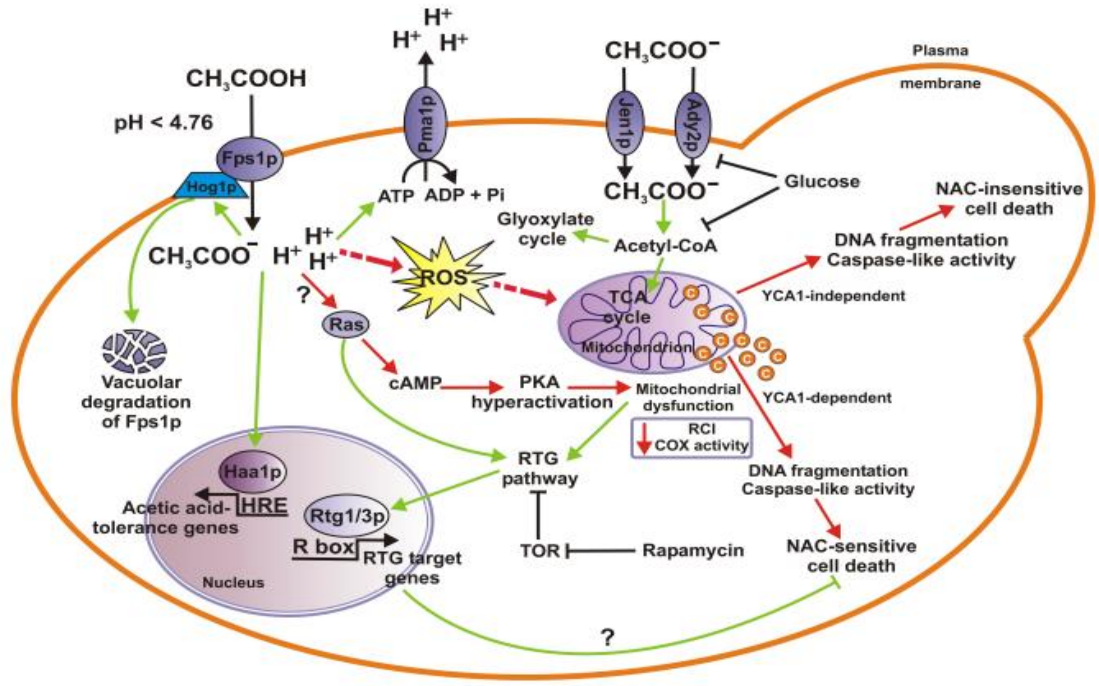
Asidik koşullar hücre duvarı yapısını, metal metabolizmasında rol alan genlerin ekspresyonunu, vakuoler H⁺-ATPaz ve HOG MAPK protein düzeyini etkiler (Claret ve ark. 2005, Holyoak ve ark. 1996, Lawrence ve ark. 2004). *S. cerevisiae* hücrelerinin zayıf asit stresine tolerans sağlamak amacıyla prolin amino asidi biriktirdiği gösterilmiştir (Greetham ve ark. 2014).

Zayıf organik asit stresine adaptasyonda alternatif stres cevapları uyarılır, bunun sonucunda plazma membran proteini olan Pdr12p ve ısı şok proteini Hsp30p uyarılır. Pdr12p *S. cerevisiae* genomunda ABC (ATP Binding Casette) taşıyıcı genlerinden biri tarafından kodlanır (Bauer ve ark. 1999). Organik asit veya alkol stresine yanıtta Pdr12p önemli bir etkiye sahiptir (Holyoak ve ark. 1999, 2000). Pdr12p toksik etkisi olan ve hücre membran bütünlüğünü bozan kısa zincirli alkollere karşı direnç sağlar. ABC taşıyıcılar, asit anyonlarına ve alkollere bağlanırlar ve hücre membranının iç kısmında bulunurlar. Pdr12p, ABC taşıyıcı bağlanmış asid anyon ve alkollerini periplazma alanına taşır. Böylece sitoplazmadaki asid anyon ve alkol oranı düşürülür (Piper ve ark. 2001).

Bir ATP-bağımlı proton salınım pompası olan plazma membran H⁺-ATPaz da zayıf asit stresi toleransında önemli bir etkiye sahiptir. Organik asitlerin hücre içerisinde çözünmesi sonucu sitoplazmada oluşan asidifikasyona hücreden H⁺-ATPaz aracılı proton çıkışı ile direnç gösterilir. Plazma membran H⁺-ATPaz zayıf asit stresiyle aktive

olur. Yapılan çalışmalarda H^+ -ATPaz'ı kodlayan *PMA1* geninin ekspresyonu azaldığında hücrelerin zayıf asite olan duyarlılığının arttığı gösterilmiştir (Holyoak ve ark. 1996).

Zayıf organik asitlerin üreme ortamında bulunması asit stresi olarak tanımlanan metabolik yanıtı oluşturmaktadır. Bu metabolik yanıtta Msn2p, Haa1p, Warp1, Hot1p gibi transkripsiyon faktörleri görev alır. *S. cerevisiae*'da zayıf asit stresine adaptasyon Haa1 ve Haa1p ile düzenlenen genleri içerir. Transkripsiyon faktörü olan Haa1p 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 sağlar. Dokuz *HAA1* hedef geninin transkripsiyonu zayıf asit stresinde aktive olur. Haa1p, plazma membran multidrug transporterları olan *TPO2* ve *TPO3*'ü ve hücre duvarı glikoproteinlerini kodlayan *YGP1* genlerini düzenler. Haa1p'nin asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asit stresine direnç için gerekli olduğu ancak lipofilik olan benzoik ve oktanoik asit için önemli bir role sahip olmadığı gösterilmiştir (Şekil 2.4) (Fernandes ve ark. 2005).



Şekil 2.4. *S.cerevisiae*'da asetik asit stres yanıt mekanizması (Giannattasio ve ark. 2013)

Maya hücreleri asetik asiti karbon kaynağı olarak kullandığında asetat anyonları Jen1p veya Ady2p monokarboksilat taşıyıcıları ile TCA ve glioksilat çevriminin başlatan asetil-CoA dönüştürülür. Asetat transportu ve metabolizması glukoz tarafından inhibe edilir. Düşük pH da glukoz varlığında asetik asit hücre içine girer. Asetik asit Fps1p aquaglikoporin kanaldan kolaylaştırılmış difüzyon ile çözünmemiş formda hücre içine girer. Daha nötral olan sitosolik pH asit anyonlarının ve protonlarının ayrılmasına neden olur. Sitolazmik asidifikasyon sonucunda protonlar Pma1p nin aktivasyonunu uyarırlar, proton pompası olan plazma zarı ATPaz protonları hücre dışına gönderir. Asetik asite direnç Hog1p yi aktive edebilir, Map-kinaz fosforilasyon ve ubikütinasyon, endositoz ve son olarak Fsp1p nin vakuolar degredasyonunu sağlar ve transkripsiyon faktörü Haa1p çeşitli seviyelerdeki asetik asite hücrenin adaptasyonunu sağlar. Diğer yandan asetik asitin lethal konsantrasyonu ROS (reaktif oksijen türleri) birikmesini uyarır, cyt c (sitokrom c) serbest kalır ve mitokondrial fonksiyon bozukluğuna neden olur, kaspaz benzeri aktivite önemli derecede artarak kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanması ile sonuçta hücre ölümüne neden olur. RTG sinyal yolu asetik asit stresine hücrel adaptasyonda aktive olur. RTG sinyal yolu TOR ve Ras sinyal yollarına bağlıdır. Rtg1 / 3-bağımlı gen ekspresyonu üzerinde inhibe edici bir etkiye sahiptir. Ras-cAMP PKA yolağının aşırı aktivasyonu mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna, ROS üretimi ve apoptoza neden olur.

Diğer zayıf organik asitler gibi asetik asitte düşük pH'da çözünmemiş durumda yüksek antimikrobiyal etkiye sahiptir (Lambert ve Stratford 1999). pH 4.5 da nötr moleküller Fsp1p aquagliseroporin kanalından kolaylaştırılmış difüzyon ile hücreye girerler (Mollapour ve Piper 2007), sitoplazmada asetat ve protonlara ayrılırlar. Bu protonlar sitoplazmik asidifikasyona neden olarak önemli metabolik süreçlerin inhibisyonuna neden olurlar (Arneborg ve ark. 2000). Zayıf asitler maya plazma membranındaki proton-taşıyıcı ATPaz Pma1p yi aktive ederek, sitosolde zayıf asitlerin ATP ye bağımlı olarak çözünmesi sonucu oluşan protonların hücre dışına pompalanmasını sağlar (Şekil 2.4).

Asetik asit *S. cerevisiae*'da karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılır ve bu şartlar altında toksik etkiye sahip değildir. Böylece *S. cerevisiae* hücreleri asetik asit içeren ortamlarda normal olarak üremesini sürdürür. Bu koşullarda asetik asit çözünmemiş formda bulunur ve ADY2 tarafından kodlanan elektro nötral proton simport taşınımı veya JEN1 tarafından kodlanan monokarboksilat taşınımı ile asetat plazma membranından taşınarak asetil-CoA'ya dönüştürülür. Asetil-CoA ya glioksilat yan yolağında harcanır ya da mitokondride trikarboksilik asid döngüsü boyunca okside edilir. Glukozlu ortamda büyüyen *S. cerevisiae* hücreleri glukoz baskılamasından dolayı asetik asiti metabolize edemezler. Bu nedenle maya hücreleri asetik asit stresine duyarlı hale gelir. Mayada en yaygın monooksilat koruyucu mekanizma plazma zarı taşıyıcılarını ve proton taşıyıcı ATPaz ı içeren mekanizmadır. ABC ailesinin üyesi olan plazma membran taşıyıcı Pdr12p sorbik asit, benzoik asit ve diğer bazı lipofilik karboksilat bileşikler tarafından güçlü bir şekilde uyarılırken asetik asit ile az miktarda uyarılır. Plazma membranında Pdr12p birikimi War1p transkripsiyon faktörüne bağlıdır (Hatzixanthis ve ark. 2003, Piper 2011).

Mayanın asetik asit ve propiyonik asite hızlı adaptasyonu için transkripsiyon faktörü olan Haa1p gereklidir (Fernandes ve ark. 2005). Özellikle Haa1p doğrudan ya da dolaylı olarak, spesifik olarak, asetik asit ile indüklenen gen ifadesini yaklaşık olarak % 80 düzenler (Mira ve ark. 2010a,b,c, 2011).

Asetik asit iki mitojen-aktif protein (MAP) kinazın, yüksek ozmolarite gliserol sinyal yolağı (HOG) ve Slk2p hücre duvarı bütünlüğünü sağlayan sinyal yolağının düşük pH da aktive olmasını sağlar (Fuchs ve Mylonakis 2009). Fps1p'nin hog1p bağımlı fosforilasyonu ubiquitinyasyon, endositozis ve vakuolde yıkıma neden olur (Mollapour ve Piper 2007, Mollapour ve ark. 2009). Bu nedenle, zayıf asite özgül bir şekilde Hog1p Fps1p'yi destabilize edip asetik asitin hücreye girişini engelleyerek asetik asitin farklı çeşitli seviyeleri için direnç oluşturur (Piper 2011, Zhang ve ark. 2011). Asetik asit stres yanıtı hiper ozmotik stres yanıtından farklıdır.

Asetik asit programlanmış hücre ölümünü indükler. Konsantrasyonlarına veya lipofilik kısımlarına göre zayıf asitler mikrobiyal hücre üremesinin gecikmesine, stostazi ve hücre ölümüne neden olurlar (Stratford ve Anslow 1996, 1998, Piper ve ark. 2001). Asetik asitin lethal konsantrasyonunda *S. cerevisiae*'da programlanmış hücre ölümü gerçekleşir. Ekspansiyon üreyen *S.cerevisiae* hücreleri 80 mM asetik asite maruz kaldığında hücrelerin programlı hücre ölümü gerçekleşir (Ludovico ve ark. 2001, Giannattasio ve ark. 2005). Asetik asit mayada fermentasyon sonucu fizyolojik olarak oluşabildiği gibi özellikle gıda endüstrisinde antimikrobiyal etkisinden dolayı gıda koruyucu olarak kullanılmaktadır. Asetik asitin mayada hücre ölümü ve yaşlanmasına neden olduğu gösterilmiştir. Daha önceki çalışmalarda asetik asiti içeren iç ve dış uyaranların *S.cerevisiae*'da programlı hücre ölümüne (apoptozis) neden olduğu gösterilmiştir (Madeo ve ark. 1997, 1999, Ludovico ve ark. 2001, 2003).

Yapılan çalışmalarda asitin glukoz alımını inhibe etmediği, glikolitik yoldaki enolaz enzimini inhibe ettiği bu durumda glikolitik akışı sınırladığı gösterilmiştir (Pampulha ve Loureiro-Dias 1990). Yapılan proteomik analizlere göre asetik asitle muamele edilen hücrelerde karbonhidrat metabolizmasının güçlü bir şekilde etkilendiği gösterilmiştir. Glikolitik proteinler olan fosfofruktokinaz (Pfk2p) ve frukto 1,6-bifosfat aldolaz (Fba1p) seviyeleri azalırken piruvat dekarboksilaz izoenzimi (Pdc1p) posttranslasyonel modifikasyona uğrar (Almeida ve ark. 2009).

Mayada sorbik asit stresi transkripsiyon faktörü olan Msn2p ve Msn4p aracılığıyla birçok genin aktivasyonuna neden olur. Bununla birlikte sorbik asit stresine direnç için transkripsiyon faktörü War1p aracılığı ile Pdr12p salınım pompası aktif hale gelir. War1p ve Msn2p/Msn4p regülonları zayıf asit stresi ile aktive edilir (Schüller ve ark. 2004).

Sitrik asitin etkilerinin araştırılması için yapılan çalışmalar sonucunda mitojen-aktive protein kinaz (MAPK) yüksek ozmolarite gliserol (HOG) yolağının zayıf asit stres yanıtında görev aldığı ve sitrik asit stresinden sorumlu birçok genin aktivasyonunu sağladığı belirtilmiştir. Sitrik asit bulunan ortamda üreyen hücrelerde normal ortamda üreyen hücelere göre daha fazla gliserol birikimi olduğu gösterilmiştir (Nielsen ve Arneborg 2007). Sorbik asitte olduğu gibi vakuoler asidifikasyon sitrik asit adaptasyonu için önemlidir. Glukoz baskılaması için transkripsiyon faktörleri, enzimler için aminoasit biyosentezi ve plasma membran kalsiyum kanalı, sitrik asit adaptasyonu için gereklidir. Sitrik asit pH'a bağlı olarak *S. cerevisiae*'da üremeyi inhibe eder.

Sorbik ve sitrik asitte olduğu gibi düşük pH'da vakuolar asidifikasyon ve Hog1p yolunun laktik ve asetik asit direnci için önemli olduğu bilinmektedir. Asetik asidin subletal üreme önleyici konsantrasyonu *Saccharomyces cerevisiae*'da Hog1p, Slt2p ve iki MAP kinazın fosforilasyonunu teşvik eder. Hog1p'nin asetik asit ile aktivasyonu *SSK1* ve *PBS2*'nin varlığına bağlıyken, *SHO1* ve *STE11*'e bağlı değildir. Yapılan çalışmalarda hücre bütünlüğü MAP kinaz kaybının asetat direncini arttırdığı gösterilmiştir (Mollapour ve Piper 2006).

Proteomik analizler sonucunda asetik asit ile muamele edilmiş *S. cerevisiae* hücrelerinde amino asitlerden protein biyosentezi, transkripsiyon/translasyon mekanizması, karbonhidrat metabolizması, nükleotid biyosentezi, stres yanıtı, protein döngüsü (turnover) ve hücre döngüsünün etkilendiği gösterilmiştir (Almeida ve ark 2009).

S. cerevisiae'da strese cevap veren birçok gen STRE (Stress Response Element) adlı promotör elementi ile kontrol edilir. Asit stresi de kapsayan çeşitli streslere karşı Msn2p ve Msn4p transkripsiyon faktörleri nükleusta birikir. Bu proteinler homologtur ve çinko parmak yapısındadır. Asit stresine yanıtta birçok genin ekspresyon seviyesi düzenlenir. Gen ekspresyonunun düzenlenmesi Msn2p ve Msn4p tarafından gerçekleşir (de Nobel ve ark. 2001). Msn2p ve Msn4p genel stres yanıtı ana düzenleyicileridir ve ayrıca sorbik ve benzoik asit tarafından aktive edilirler (Görner ve ark. 1998). Pdr12'nin asit tarafından uyarılması transkripsiyonel seviyede düzenlenir. Pdr12p'nin uyarılması zayıf asit stresi için özgül iken diğer stres tipleri için özgül değildir ve Msn2p/4p den bağımsızdır (Piper ve ark. 1998). Transkripsiyon faktörü olan War1p, Pdr12'nin stres koşullarında düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır (Kren ve ark. 2003).

S. cerevisiae daki snf1 protein kinaz Snf1/AMPK (AMP-aktive edilmiş protein kinaz) ailesi üyesi olup metabolik kontrolde ve özellikle besin stresine yanıtta önemli role sahiptir. Hücreler sodyum iyonu stresi, alkali pH veya oksidatif strese maruz kaldığında Snf1p'nin katabolik aktivasyonu ve Thr-210'un fosforlanarak aktivasyonu artar. Snf1 / AMP-aktive protein kinaz (AMPK) ailesi ökaryotlar arasında korunmuş olup metabolik stres yanıtında önemli bir role sahiptir. Memelilerde AMPK glukoz ve lipit metabolizmasını düzenler. *S. cerevisiae*'daki Snf1p protein kinaz metabolik kontrolde önemli role sahiptir. Snf1 protein kinaz, hücrelerin glukoz sınırlamasına (limitation), sukroz gibi glukozu göre daha az tercih edilen alternatif karbon kaynaklarına ve nonfermente karbon kaynaklarına adaptasyonunu düzenler. Snf1p glukoz baskılaması ile aktive edilir. Snf1p yüksek glukoz ortamında inaktif halde bulunurken düşük glukoz ortamında aktif haldedir. Snf1 yağ asit metabolizmasında ve karbon depolamadaki metabolik enzimlerin kontrolünü sağlayan ve mayoz, yaşlanma, otofaji, filamentöz invazif büyüme gibi besine duyarlı hücresel süreçlerde rol alan birçok genin transkripsiyonunu düzenler. Snf1 protein kinaz bazı çevresel streslere cevap olarak aktive edilir (Hong ve Carlson 2007). Stres yanıtında glukoz sınırına bağlı olarak Snf1 Thr-210 un aktif lobu tarafından fosforlanır (McCartney ve Schmidt 2001).

Yap1p oksidatif stres yanıtı için gerekli olan bir transkripsiyon faktörüdür. Oksidatif streste Yap1p aktif hale gelerek glutasyon ve tiyoredoksin yollarını aktif hale getirir. Yap1p özellikle hidrojen peroksit stresine yanıtta önemli olan bir transkripsiyon faktörüdür. Yap1p stres koşulları olmadığında sitoplazmada bulunurken hücreler çeşitli oksidatif strese maruz kaldığında nükleusta birikir ve oksidatif stres yanıtı için gerekli olan genlerin transkripsiyonunu uyarır (Şekil 2.5) (Rodrigues ve ark. 2010).

Msn2p

ATAGTAAAAAAAAAACTAAGT TTT **CCCCT** GTAGTAAACAGGGAGATACCGTACG
GAGGTCTGAATTCCTACAGAAGTAGCTGTAAAAATT CAGAATTCGCAACAACC
TATAATTGAGTTAAGTGCCTT TCCAAGCTAAAAAGTT TGAGGTTATAGGGGCTT
AGCATCCACACGT CACAATCTCGGGTATCGAGTATAGTATGTAGAATTACGGCA
GGAGGTTTCCAAATGAACAAAGGA **CAGGGG** CACGGTGAGCTGTCGAAGGTATCC
ATTTTATCATGTTTCGT TTGTACAAGCACGACATACTAAGACATT TACCGTATG
GGAGTTGTTGTCCTAGCGTAGTTCTCGCTCCCCCAGCAAAGCTCAAAAAAGTAC
GTCATTTAGAATAGTTTGTGAGCAAATTACCAGTCGGTATGCTACGTTAGAAAG
GCCACAGTATTCTTCTACCAAAGGCGTGCCTT TGTGAACTCGATCCATTATG
AGGGCTTCCATTATCCCGCATTTT **TAT** TACTCTGAACAGGAATAAAAAGAAA
AAACCAGTTTAGGAA **TTAT CCGGGG** CGGAAGAAATACGCGTAGCGTTAATCC
CCCACGTCCAGGGTTTT TCCATGGAGGTT TCTGAAAAACTGACGAGGAATGTG
ATTATAAATCCCTTTATGTGATGTC TAAGACTTTTAAGGTACGCCCGATGTTTG
CCTATTACCATCATAGAGACGTTTCTTTT CGAGGAATGCTTAAACGACTTTGTT
Yap1p
TGACAAA AATGTTGCCTAAGGGCTCTATAGTAAACCAATTTGGAAGAAAGATTTG
ACGACTTTTTTTTTTTGGATTTCGATCCTATAATCCTTCCTCCTGAAAAGAAAC
ATATAAATAGATAATGATTATCTTCAAACATCTCTTGTCTTTGTGCTTTTT
TTTTACCATATATCTTACTTTTTTTTTCTCTCAGAGAAAACAAGCAAAACAAAA
AGCTTTTCTTTTCACTAACGTATATG

Şekil 2.5. Zayıf asit stresinde görev alan bazı transkripsiyon faktörlerinin *SUC2* geni promotor bölgesine bağlanma yerleri (www.yeasttract.com/view.php?existing=locus&orfname=YIL162W, 2016)

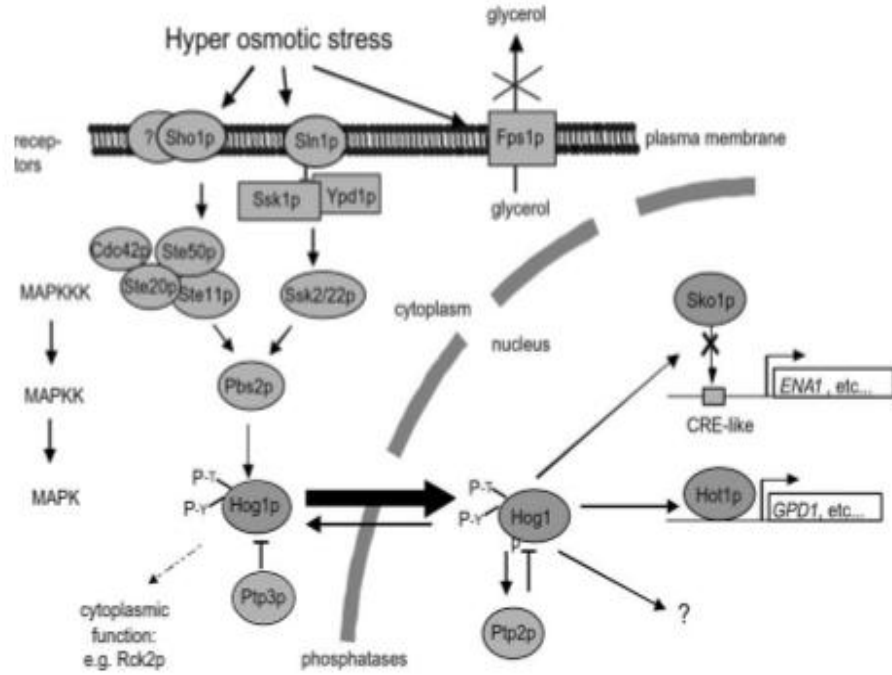
2.6. HOG Sinyal Yolu ve Asit Stresi

Aktif olarak üreyen maya hücrelerinde hücre içi ozmolarite dış ozmolariteden daha yüksek tutulur. Ozmotik yoğunluk sonucu plasma membranından içeriye su girer ve hücre genişler, bu olay turgoru yaratır. *S. cerevisiae*'nın ozmotik stres altında kalması doğal ortamlarda görülebilen bir olaydır. Yüksek miktarda sukroz veya glukoz içeren fermentasyon ortamları buna iyi bir örnek teşkil eder. (Gasch ve WernerWashburne 2002, Johnston 1999). Fizyolojik olarak ozmostres, serbest su aktivitesinin ya da serbest su potansiyelinin düşmesi şeklinde tanımlanabilir. *S. cerevisiae*'nın dış ortamdaki hiperozmolariteye karşı metabolik adaptasyonu birkaç aşamada gerçekleşir (Hohmann 2002).

Hiperozmotik streste High Osmolarity Glycerol (HOG) Mitogen-activated protein (MAP) kinase sinyal iletim yolu uyarılır. *S. cerevisiae*'da hücre zarında bulunan ve ozmotik sensör olarak da adlandırılan Sln1p ve Sho1p reseptör proteinleri, ozmotik stresi algılayıp iki parçalı sinyal aktarma mekanizması ile sitoplazmadaki protein kinaz sinyal iletim yolunu aktive ederler (Şekil 2.6). Ökaryotik organizmalarda MAPK, MAPKK ve MAPKKK ailelerinin birçok üyesi bulunur ve bu proteinler farklı sinyal iletim yollarında yer alırlar.

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 ise *GPD1* genidir (Albertyn ve ark. 1994). 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. *GPD1* geninin ayrıca glukoz baskılaması ile de kontrol edildiği gösterilmiştir. Glukoz baskılaması ve hiperozmotik stres *GPD1* geninin transkripsiyonunu bağımsız olarak düzenlerler (Albertyn ve ark. 1994).

HOG MAP kinase pathway



Şekil 2.6. Hiper ozmotik stres sinyal iletim yolunun bileşenleri ve ozmotik stresin *GPD1* geni ve diğer genlere iletilmesi (Mager ve Siderus 2002).

Hiperozmotik stres, hücre zarındaki Sln1p ve Sho1p reseptörleri ile algılanıp sitoplazmadaki MAPKKK'lara aktarılır. Sonuçta Hog1p fosforlanarak nükleusa geçer ve ilgili transkripsiyon faktörlerine etki ederek, ozmotik strese yanıt olarak bazı genlerin transkripsiyonlarının aktive edilmesini sağlar.

Daha sonraki çalışmalarda hiperozmotik stresin birçok genin işleyişine de etki ettiği gösterilmiştir (Yale ve Bohnert 2001, Erasmus ve ark. 2003). Bu genlerden bir kısmı sıcaklık şoku gibi diğer tür stresle de aktive edilirler ve promotor bölgelerinde STRE (Stres Response Element) adı verilen DNA dizilerine sahiptirler. Nükleusa giren Hog1p çeşitli transkripsiyonel aktivatör ve represörlerin aktivitesini kontrol edecek birçok geni düzenler (Hohmann 2002). Ayrıca yapılan birçok çalışmada Hog1p'nin transkripsiyon faktörlerini nasıl düzenlediği gösterilmiştir (O' Rourke ve ark. 2002). Birçok transkripsiyon faktörü (Örneğin Msn1p, Msn2p, Msn4p, Hot1p, Sko1p ve Smp1p) Hog1p MAPK'nın kontrolü altındadır (Alepuz ve ark. 2003).

SKO1 geni *SUC2* promotoruna bağlanabilen bir protein olan *Sko1p* yi kodlar. *Sko1p* ozmotik stresle uyarılan birçok geni baskılar. CRE benzeri DNA elementine (Örneğin *GRE2*, *ENA1* genlerinde) bağlanır (O' Rourke ve ark. 2002, Alepuz ve ark. 2003, Mager ve Siderus 2002). *Sko1p* baskılama işleminde genel korepresör kompleksi *Ssn6/Tup1*'i yapısına katar. Artan ozmolarite boyunca *Hog1p*, *Sko1p*' yi fosforile eder ve *Sko1p*'in *Tup1p*'e olan ilgisi azalır. *Sko1p*'nin fosforlanması bu proteinin baskılayıcı etkisinin aktive edici etkiye dönüşmesine neden olur (Alepuz ve ark. 2003). Aktive etme mekanizmasının özellikleri tam olarak bilinmemektedir. Ancak burada RNA pol-II holoenzim kompleksi ile *Hog1p* arasında direkt bir etkileşim olabilir (Alepuz ve ark. 2003, O' Rourke ve ark. 2002). *Sko1p*'in veya *Tup1p/Ssn6p*'nin yokluğu *Sko1p* ile düzenlenen genlerin sürekli aktif olmasına neden olur (O' Rourke ve ark. 2002).

Hot1p ise *Hog1p* ile etkileşebilen bir transkripsiyonel aktivatördür. Bu protein *Hog1p* ve ozmotik şoka bağımlı bir fosforilasyon gösterir. Başka bir çalışmada *Hot1p*'in sürekli *GPD1* promotoruna bağımlı olduğu ozmotik şok boyunca *Hog1p*, *Msn1p* ile DNA üzerinde toplandığı bulunmuştur.

Ozmotik stres boyunca *Msn2p* ve *Msn4p*'ye bağlı genlerin en üst seviyede uyarılması *Hog1p*'yi gerektirir. Bununla birlikte *Msn2p* ve/veya *Msn4p*, hem *Hog1p* hem de *Hot1p*'i *CTT1* ve *HSP12* promotoruna toplar. Bu da *Msn2p* ve *Msn4p*'nin HOG yolu ile olan fonksiyonel ilişkisini göstermektedir (O' Rourke ve ark. 2002).

MAPK HOG yolağı sitrik asit direncini ayarlar (Lawrence ve ark. 2004). 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 gelir. HOG yolağının uyarılması ile trionin-174 ve tirozin-176'nın fosforilasyonu sonucunda MAP kinaz *Hog1p* aktif hale gelir. *Hog1p* 300 mM sitrik asid ya da 0.4 mM NaCl'e maruz kaldığında fosforlanarak aktif hale gelir (Lawrence ve ark. 2004).

Sitrik asit tarafından HOG yolağının aktivasyonu ozmotik stres nedeniyle olmaz (Lawrence ve ark. 2004). HOG yolağı yüksek ozmolarite ortamına adaptasyonu sağlar ve *S. cerevisiae*'nin yüksek konsantrasyonda NaCl ve sorbik asit bulunan üreme ortamında üremesini düzenler. HOG yolağının aktivasyonu yüksek ozmolarite ortamında üremeye izin veren gliserol konsantrasyonunun hücre içerisinde artmasına neden olur. *GPD1* geninden kodlanan NAD-bağımlı gliserol 3-fosfat dehidrogenaz enzimi gliserol biyosentezi için önemli bir enzimdir. Sitrik asite maruz kalma *GPD1* geninin ekspresyonunu arttırır. 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).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

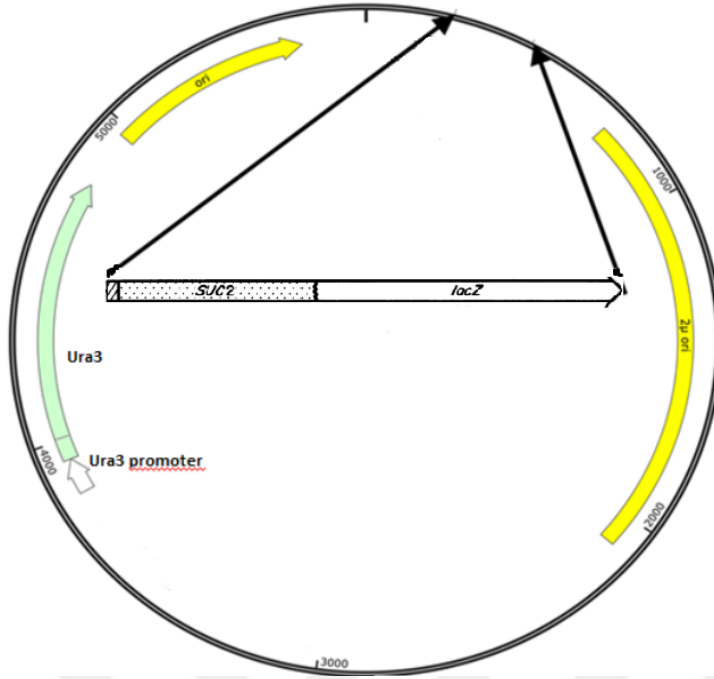
3.1. *Saccharomyces cerevisiae* Suşları ve Genetik Özellikleri

Yapılan tez çalışmasında kullanılan YST124 (yaban tip), YST159 ($\Delta snf1$), YST240 ($\Delta hog1$), YST241 ($\Delta hot1$), YST299 ($\Delta msn2$), YST320 ($\Delta war1$) ve YST321 ($\Delta haa1$) suşları Frankfurt Üniversitesi Mikrobiyoloji Enstitüsü'ndeki EUROSCARF *S.cerevisiae* koleksiyonundan temin edilip kullanıldı. Tez çalışmasında kullanılan suşlar ve genotipleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. *S.cerevisiae* YST124 suşu genomu tümüyle sekanslanmış olup bu araştırma için herhangi bir mutasyon içermeyen yaban tip standart suş olarak kullanıldı. Diğer suşlar ise YST124 suşu ile izogenik suş olup bu suştan sırasıyla *SNF1*, *HOG1*, *HOT1*, *MSN2*, *WAR1* ve *HAA1* genlerinin delesyonu ile elde edilen mutant suşlar olarak kullanıldı.

Çalışmada asit stresinin *SUC2* geni transkripsiyonuna etkilerini tayin etmek için Suc2-LacZ gen füzyonu kullanılmıştır. Bu gen füzyonu daha önceki çalışmalar sırasında hazırlanmış olup *SUC2* geni promotor bölgesi CYC1-LacZ gen füzyonunun promotor bölgesi ile değiştirilmiştir (Türkel ve ark. 2003). Suc2-LacZ gen füzyonu *S.cerevisiae*'da çoğalma ve seleksiyon için 2 μ m replikasyon orijini ve *URA3* geni içeren (2 μ m-URA3) YE_p vektörü üzerinde bulunmaktadır (Şekil 3.1). Bu gen füzyonunda kullanılan *SUC2* geni promotor bölgesinin transkripsiyonunun glukoza bağlı olarak düzenlenmesi için yeterli olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Sarokin ve Carlson 1985).

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

Euroscarf Kodu	ST Lab Kodu	Genotipi ve ilgili mutasyonlar
Y00000	YST124	MAT a, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0. (Haploid, Yaban tip)
Y14311	YST159	MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YDR477w::kanMX4 (Δ snf1 mutanti)
Y02724	YST240	MAT a, ura3 Δ 0; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; YLR113w::kanMX4 (Δ hog1 mutanti)
Y06957	YST241	MAT a, ura3 Δ 0; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; YMR172w::kanMX4 (Δ hot1 mutanti)
Y007117	YST299	MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YMR037c::kanMX4 (Δ msn2 mutanti)
Y06734	YST320	MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YML076c::kanMX4 (Δ war1 mutanti)
Y07137	YST321	MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YPR008w::kanMX4 (Δ haa1 mutanti)



Şekil 3.1: Suc2-LacZ plazmitinin yapısı

3.2. Üreme Ortamı ve Özellikleri

S. cerevisiae suşları rutin çalışmalar için zengin besi yeri olan YP (1% yeast extract, 2% peptone) ortamında üretildi (Guthrie ve Fink 1991). Karbon kaynağı olarak da ilgili deneylerin sonuçlar bölümünde açıklandığı gibi glukoz baskılaması için (Repres şartlar) % 2 (w/v), glukoz baskılamasının istenmediği üreme şartlarında ise (Derepres şartlar) % 0.1 (w/v) glukoz eklendi. Araştırmalar boyunca *S. cerevisiae* hücreleri 25-28°C'de, karıştırılmalı etüvde (140 devir/dakika) üretildi.

β -galaktozidaz aktivitesinin ölçülebilmesi için *S. cerevisiae* suşları Sc-Ura (1.7 g/L YNB, 5 g/L amonyum sülfat) ortamında (urasil içermeyen minimal sentetik üreme ortamı) üretildi. Tez çalışmasında kullanılan besiyerleri ve içerikleri Ek-1'de detaylı olarak verildi.

3.3. YEp-Suc2-LacZ Plazmitinin Transformasyonu

Yaban tip ve mutant *S. cerevisiae* suşlarına daha önce tanımlanan lityum asetat-poli etilen glikol (PEG) yöntemi kullanılarak Suc2-LacZ plazmiti transforme edildi (Ito ve ark. 1983). Transformasyon için 5 ml YPD ortamlarına steril kürdan kullanılarak 4 °C'de muhafaza edilen stok *S. cerevisiae* suşlarından ekim yapıldı ve çalkalamalı inkübatörde 140 devir/dakika hızda ve 30°C'de bir gece boyunca üretildi. Sıvı kültürdeki *S. cerevisiae* suşlarının 1 ml'i taze 25 ml YPD ortamına eklendi ve aynı şartlarda logaritmik aşamaya ($OD_{600}=0.8-1.0$) kadar üretildi. Logaritmik fazdaki *S. cerevisiae* hücreleri santrifüjde 3000 g'de 5 dakika çöktürüldü. Çöken *S. cerevisiae* hücreleri süpernatant atıldıktan sonra 25 ml steril saf su eklenip vortekslendikten sonra tekrar santrifüj ile 3000g'de 5 dakika çöktürülerek yıkandı. Süpernatant atılıp çöken *S. cerevisiae* hücreleri taze 1 ml 0.1M lityum asetat çözeltisinde çözüldü. Sıvı faz atılıp çöken *S. cerevisiae* hücreleri taze hazırlanmış 1ml steril 0.1 M lityum asetat çözeltisinde süspansiyon edildi. Mikrofüj tüplerindeki süspansiyon 10 sn boyunca mikrosantrifüj cihazında en yüksek hızda çöktürüldü. Sonrasında lityum asetat *S. cerevisiae* süspansiyonundan pipet aracılığıyla uzaklaştırıldı ve 450 µl 0.1 M lityum asetat eklenerek hücreler ile tekrar bir süspansiyon oluşturuldu. Bu süspansiyondan 50 µl miktarlık kısım steril mikrofüj tüplerine alındı ve en yüksek hızda tekrar 10 sn boyunca mikrosantrifüj cihazında çöktürüldükten sonra lityum asetat pipetle uzaklaştırıldı. Daha sonra mikrofüj tüplerindeki *S. cerevisiae* çökeltilerinin üstüne 5-6 µg denatüre edilmiş herring sperm DNA'sı, 4-5 µg plazmid DNA'sı, 36 µl 1 M lityum asetat, 240 µl PEG ve 60 µl steril saf su ilave edildi. Bu plazmit-maya hücresi karışımları 30°C'de etüvde 30 dakika bekletildi. Daha sonra bu hücre plazmit karışımı 42°C'lik su banyosunda 30 dakika ısı şokuna maruz bırakıldı. Ardından mikrosantrifüjde 8000 rpm'de 15 sn çöktürüldü ve transformasyon karışımı mikropipetle uzaklaştırıldı. Çöken *S. cerevisiae* hücreleri 400-500 µl steril saf suda süspansiyon edildi. Bu hücre süspansiyonundan 75-100 µl miktarlık kısmı urasil içermeyen sentetik tam minimal üreme ortamı (SC-Ura + %2 glukoz) petrilere ekildi ve 30°C'deki etüve bırakıldı (Ek 1). *S. cerevisiae* transformantlarının üremeleri için petrilere 30°C'de 3-4 gün bekletildi. *S. cerevisiae* transformantlarını içeren petrilere +4 °C'de saklandı. Suc2-LacZ transformantı koloniler

belirli büyüklüğe ulaştığında steril kürdan ile Sc-ura+ %2 glukoz petrilere yayma ekimi ile pasajlandı ve 30 °C’de 3-4 gün inkube edilerek üremeleri sağlandı.

3.4. *Sacharomyces cerevisiae*’da β -Galaktozidaz Aktivitesinin Ölçülmesi

β -galaktozidaz aktivitesinin belirlenebilmesi için transformant *S.cerevisiae* suşları 5 ml Sc-ura %2 glukoz bulunan besiyerinde üretilerek gecelik ön kültürler hazırlandı. Sıvı kültürdeki *S. cerevisiae* suşlarınının 1 ml’i taze 5 ml Sc-ura %2 glukoz (repres) ortamına eklendi ve aynı şartlarda logaritmik aşamaya ($OD_{600}=0.8-1.0$) kadar üretildi. Logaritmik fazdaki *S. cerevisiae* hücreleri santrifüjde 3000 g’de 5 dakika çöktürüldü. Çöken *S. cerevisiae* hücreleri süpernatant atıldıktan sonra 1 ml steril saf su eklenip vortekslenip mikrosantrifüj tüplerine aktarılarak mikrosantrifüjde 1 dakika çöktürülerek yıkandı. Süpernatant atılıp çöken *S. cerevisiae* hücreleri 200 μ l break buffer çözeltisinde çözüldü. Hücreleri permeabilize etmek için 20 μ l 0,1M SDS ve 20 μ l kloroform eklenerek vortekslendi. Her suş için 3 deney tüpü hazırlandı. Bu deney tüplerine 980 μ l Z buffer kondu. İçerisinde Z buffer bulunan tüplere hücre lizatlarından 12,5-25 μ l eklendi. Deney tüpleri 30°C su banyosuna konularak 2 dakika ön inkübasyona bırakıldı. Tüplere 200 μ l ONPG eklendi. Post-it sarısı renk alana kadar beklenerek süre kayıt edildi. Bekleme süresi sonunda reaksiyon 500 μ l 1M sodyum karbonat ilave edilerek durduruldu ve çözelti absorbansı 420 nm’de belirlendi. β -galaktozidaz aktivitesinin hesabı için hücre süspansiyonlarındaki protein konsantrasyonları da Lowry metoduyla belirlendi (Lowry ve ark. 1951). Lowry metodu kullanılırken her suş için 1 tane deney tüpü hazırlanarak tüplere 180 μ l steril saf su eklendi. Steril saf su üzerine daha önce permeabilize edilen hücre lizatlarından 20 μ l eklendi. 24,5 ml Lowry A, 250 μ l Lowry B1 ve 250 μ l Lowry B2 bir beher içerisine konarak Lowry C çözeltisi hazırlandı. 1 ml Lowry C deney tüplerine eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında beklendi. Bekleme aşamasında 1 ml su, 1 ml folin (2 N stoktan) eklenerek folin hazırlandı. 10 dakika sonunda tüplere 100 μ l folin eklenip vortekslendi ve 30 dakika oda sıcaklığında beklendi. Bekleme süresi sonunda çözelti absorbansı 750 nm’de belirlenerek β -galaktozidaz aktivitesi hesaplandı. β -galaktozidaz aktiviteyi parçalanmış nmol ONPG/dakika/mg protein olarak verildi.

Derepres şartlar için logaritmik aşamaya kadar üretilen *S. cerevisiae* suşları 3000 g'de 5 dakika çöktürüldü. Çöken *S. cerevisiae* hücreleri süpernatant atıldıktan sonra 25 ml steril saf su eklenip vortekslendikten sonra tekrar santrifüj ile 3000g'de 5 dakika çöktürülerek yıkandı. Süpernatant atılıp çöken *S. cerevisiae* hücreleri Sc-ura %0,1 glukoz ortamına eklenerek 4 saat üremeleri beklendi ve β -galaktozidaz aktiviteleri belirlendi. .

3.5. *Sacharomyces cerevisiae*'da İnvertz Aktivitesinin Belirlenmesi

S. cerevisiae suşlarının hücre dışı invertz aktiviteleri de yine daha önce tanımlandığı şekilde belirlendi (Rothe ve Lehle 1998, Goldstein ve Lampen 1975). Bunun için *S. cerevisiae* suşları YPD (%1 yeast extract, %2 peptone, %2 glukoz) + 300 mM sitrik asit üreme ortamında üretildi. Repres ve derepres *S. cerevisiae* hücreleri daha önce açıklandığı şekilde hazırlandı. Logaritmik fazdaki *S. cerevisiae* hücrelerinin OD_{600} de asorbansları ölçüldü. Logaritmik fazdaki *S. cerevisiae* hücreleri santrifüjde 3000 g'de 4 dakika çöktürüldü. Çöken *S. cerevisiae* hücreleri süpernatant atıldıktan sonra 5 ml sodyum asetat (pH:5.2) eklenip vortekslendikten sonra tekrar santrifüj ile 3000g'de 5 dakika çöktürüldü. Süpernatant atılıp çöken *S. cerevisiae* hücrelerine 200 μ l sodyum asetat eklenerek stok hazırlandı. 0,684 gr sakkaroz 10 ml steril saf suda çözülerek sukroz çözeltisi hazırlandı. Mikrosantrifüj tüplerine 200 μ l sukroz konarak üzerine 50 μ l stok hücre lizatından eklenerek vortekslendi. 42°C'de reaksiyon için 20 dakika beklendi. Bekleme süresi sonunda 50 μ l pH:8,8 1M tris eklenerek reaksiyon durduruldu. İnvertz aktivitesini belirlemek için reaksiyon sonucunda oluşan glukoz miktarları tayin edildi. Glukoz tayini için spektrofotometrik yöntem olan Glukoz oksidaz-Peroksidaz (GOD-POD) yöntemi kullanıldı. Yöntemin uygulanmasında GOD-POD glukoz tayin kiti üreticisi firmanın (Spinreact-İspanya) verdiği deneysel koşullar kullanıldı (Goldstein ve Lampen 1975).

Toplam invertz (periplazmik + sitoplazmik invertz) aktivitesinin belirlenmesi için hücreler YP + % 0.1 glukoz + 300 mM sitrik asit pKa3 (pH:5.4) de 2 saat derepres

edildi. Stok hücre çözeltisine 20 µl SDS ve 20 µl kloroform eklenerek hücreler permeabilize edildi. Permeabilize edilen hücrelerde toplam invertaz aktivitesi belirlendi.

3.6. Zayıf Asit Stresinin Uygulanması

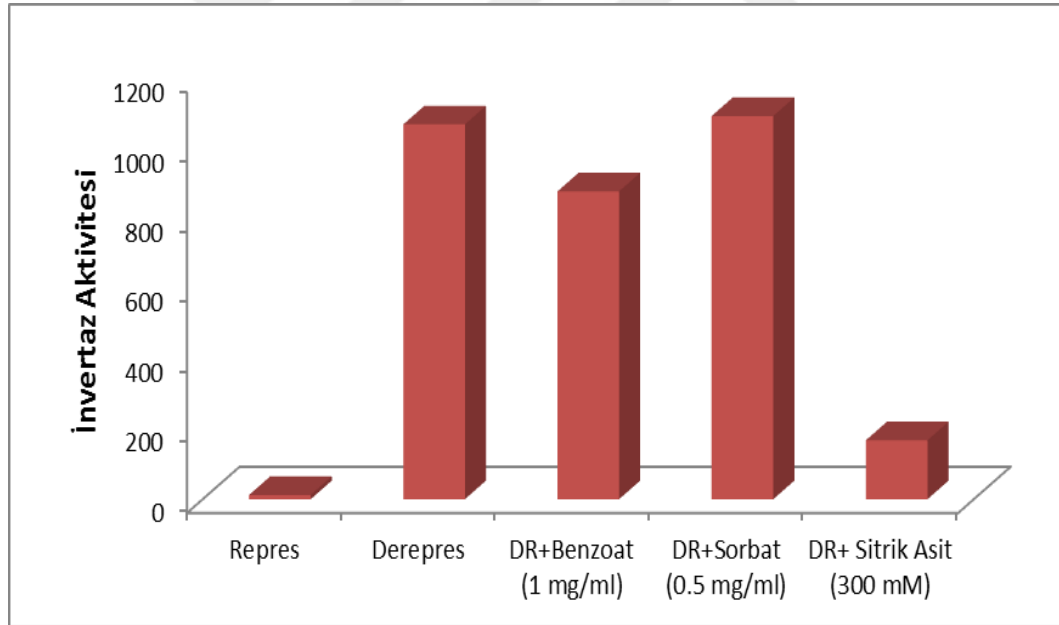
Sitrik asit tri-protik asit olduğundan 3 farklı pKa değeri vardır. Bunlar pKa1: 3.08, pKa2: 4,74, pKa3: 5.40'dır. Sitrik asitin farklı konsantrasyonlarının ve farklı pKa'larının *SUC2* geni ekspresyonuna ve invertaz aktivitesine etkilerini belirlemek için önce 3 farklı pH'da 1.5 M stok sitrik asit çözeltisi 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 veya invertaz aktivitelerinin tayini için kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Zayıf Asit Stresinin İnvertz Aktivitesine Etkisi

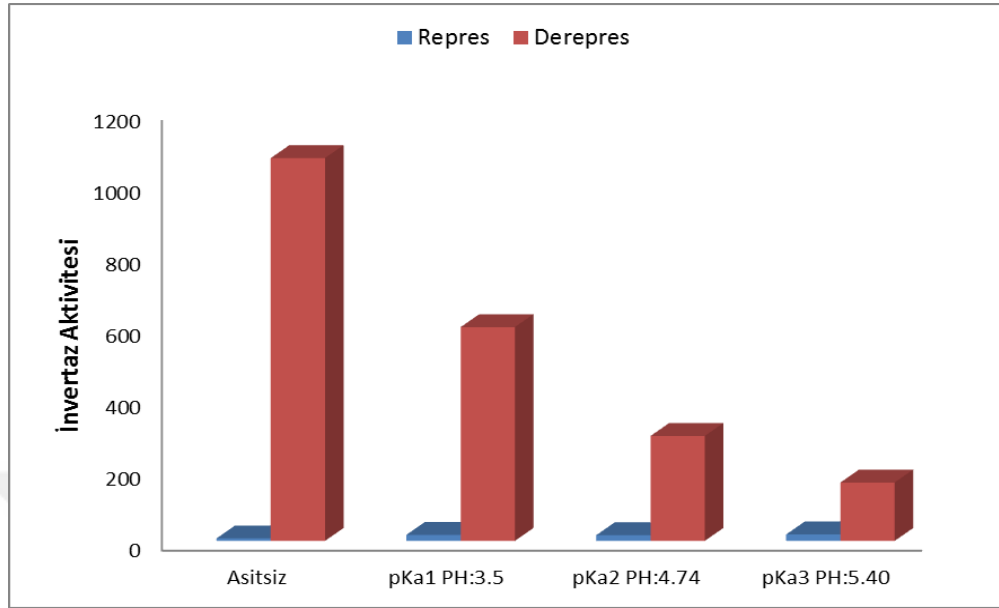
Zayıf organik asit stresinin SUC2 geni ekspresyonuna ve invertaz aktivitesine etkilerini incelemek için asidite kaynağı olarak gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan sorbik asit, benzoik asit, asetik asit ve sitrik asit seçildi. Üreme ortamında verilen konsantrasyonlarda bulunan sorbik asit ve benzoik asitin invertaz aktivitesinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı bulundu. Asetik asitte bölüm 2’de belirtildiği üzere apoptoza neden olduğu için çalışmalara sadece sitrik asit ile devam edildi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Benzoik asit, sorbik asit ve sitrik asitin invertaz aktivitesine etkileri



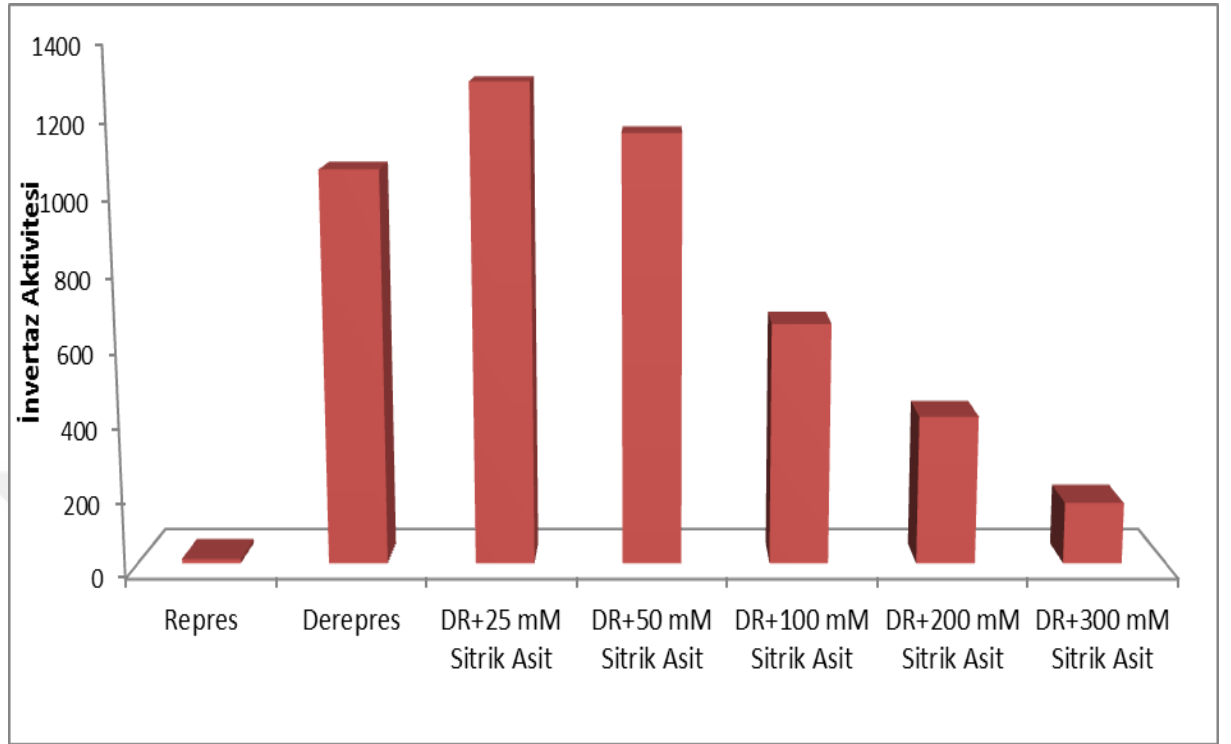
Sitrik asit triprotik organik asit olup 3 farklı pKa değeri vardır (pKa1:3.08, pKa2: 4.74, pKa3: 5.40). Bu 3 farklı pKa değerlerinin invertaz aktivitesine etkileri belirlendi ve pKa3: 5.40’ın invertaz aktivitesine en fazla etkide bulunduğu belirlendi. pKa3 değerinde invertaz aktivitesinde asitsiz ortama göre yaklaşık 9 kat azalma olduğu görüldü (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. 3 farklı pKa da sitrik asitin invertaz aktivitesine etkisi



Sitrik asitin invertaz aktivitesine etkisinin pKa3’de en etkin olduğu belirlendikten sonra farklı sitrik asit konsantrasyonları denenerek etkin konsantrasyon belirlendi. Bunun için stok sitrik asit çözeltisinden üreme ortamlarına 25 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM ve 300 mM olacak şekilde sitrik asit eklendi. 300 mM sitrik asit konsantrasyonunda invertaz aktivitesinde yaklaşık 10 kat azalma olduğu görüldü (Çizelge 4.3). Lawrence ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan çalışmada 200 mM, 300 Mm ve 400 mM sitrik asit konsantrasyonları denenmiş ve sitrik asitin toksik olmayan 300 mM konsantrasyonu bu çalışmada kullanılmıştır.

Çizelge 4.3. Sitrik asitin farklı konsantrasyonlarının invertaz aktivitesine etkisi

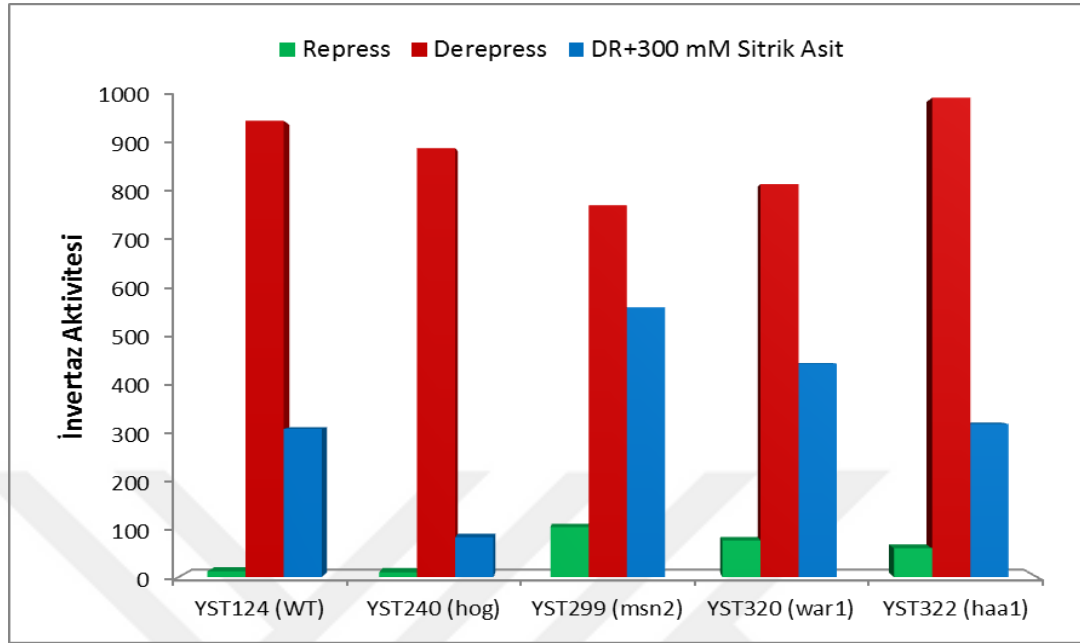


Bu sonuçlar doğrultusunda tüm deneylere pKa3'de (pH:5.40) 300 mM sitrik asit konsantrasyonunda devam edildi.

4.2. Zayıf Asit Stresinde *msn2*, *hog1*, *haa1*, *war1*'in İinvertaz Aktivitesine Etkileri

Bölüm 2'de belirtildiği üzere asit stresine yanıtta Msn2p, Hog1p, Haa1p, War1p transkripsiyon faktörleri yer alır. Yaban tip ve $\Delta msn2$, $\Delta hog1$, $\Delta haa1$, $\Delta war1$ delesyonlu mutantlarda repres, derepres ve derepres 300 mM sitrik asit ortamlarında invertaz aktiviteleri belirlendi. Sitrik asit bulunmayan ortamda derepres şartlarda yaban tip ve tüm mutantlarda invertaz aktivitelerinin aynı olduğu görüldü. Derepres 300 mM sitrik asit şartlarında ise $\Delta msn2$, $\Delta haa1$, $\Delta war1$ mutantlarında invertaz aktivitelerinde önemli bir etki görülmezken, $\Delta hog1$ mutantında invertaz aktivitesinde yaklaşık üç kat azalma görüldü ve deneylere $\Delta hog1$ mutantıyla devam edildi (Çizelge 4.4).

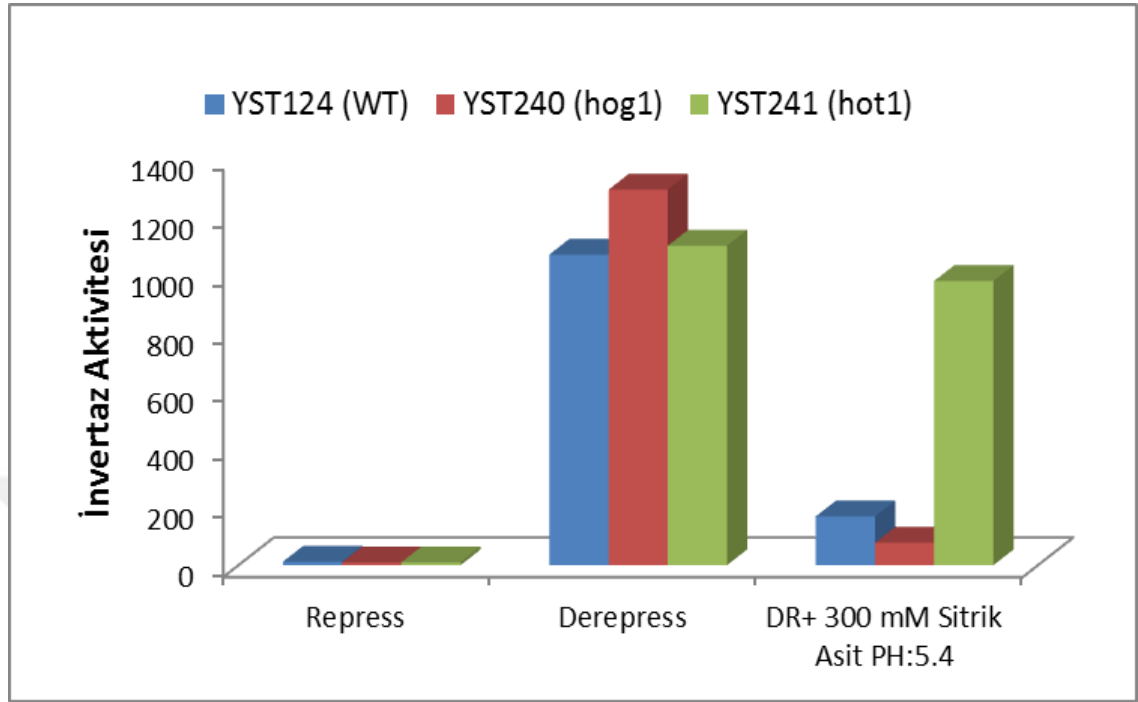
Çizelge 4.4. *msn2*, *hog1*, *haa1*, *war1*'in İnvertz Aktivitesine Etkisi



4.3. HOG Sinyal İletim Yolunun İnvertz Aktivitesine Etkisi

Bölüm 2’de belirtildiği gibi MAPK HOG yolağı sitrik asit direncini kontrol etmektedir (Lawrence ve ark. 2004). *Msn1p*, *Msn2p*, *Msn4p*, *Hot1p*, *Skolp* ve *Smp1p* gibi transkripsiyon faktörleri *Hog1p* MAPK’nın kontrolü altındadır (Alepuz ve ark. 2003). HOG MAPK yolağındaki genlerin delesyonu sonucunda sitrik asit duyarlılığının arttığı gösterilmiştir (Lawrence ve ark. 2004). Bu bilgiler doğrultusunda repres, derepres, derepres 300 mM sitrik asit şartlarında yaban tip ve $\Delta hog1$, $\Delta hot1$ delesyonlu mutantlarda invertaz aktivitesi tayin edildi. Derepres 300 mM sitrik asit şartlarında derepres şartlara göre $\Delta hot1$ mutantlarında invertaz aktivitesinde etki görülmezken yaban tip ve $\Delta hog1$ mutantında invertaz aktivitesinde yaklaşık 13 kat azalma görüldü. Repres şartlarda glukoz baskılamasından dolayı beklenildiği şekilde hem yaban tip hemde mutant suşlarda invertaz aktivitesinin düşük olduğu görüldü (Çizelge 4.5). *Hot1p*’nin ise *SUC2* ekspresyonuna etkisi olmadığı görüldü.

Çizelge 4.5 HOG sinyal iletim yolunun invertaz aktivitesine etkisi

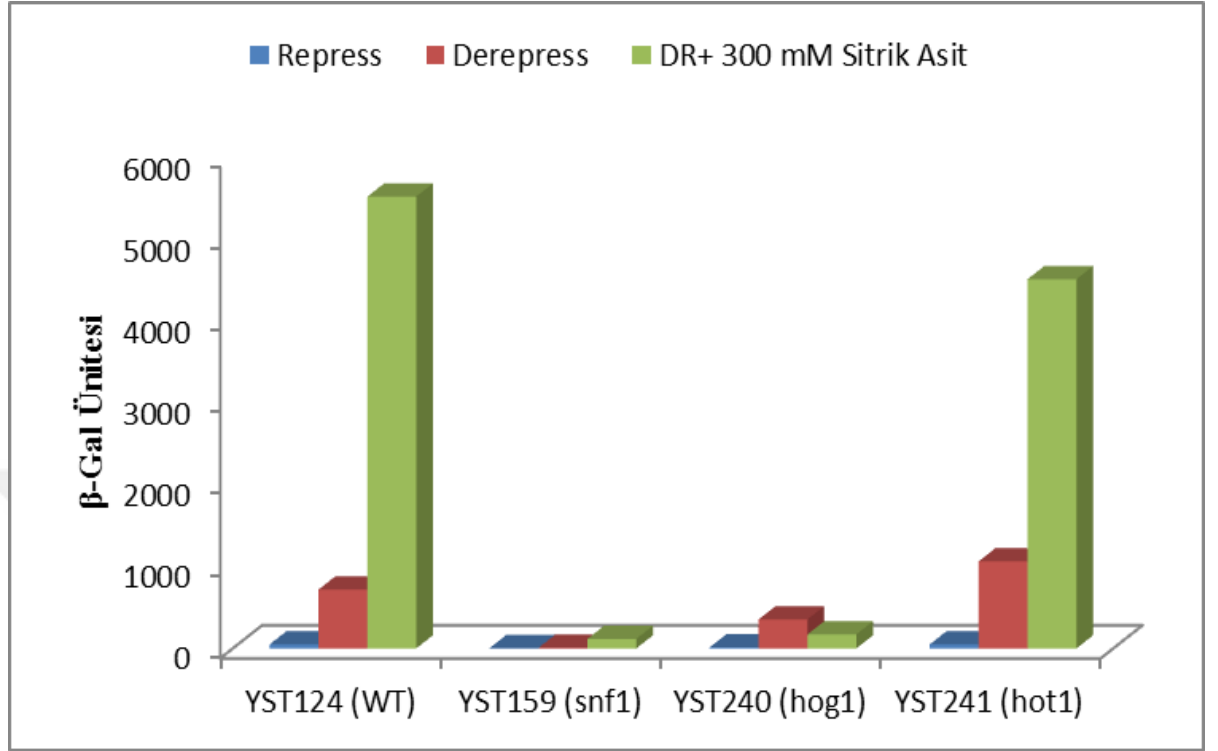


4.4. Zayıf Asit Stresinin *SUC2* Geni Transkripsiyonuna Etkisi

SUC2 geninin transkripsiyonel kontrolü glukoz baskılaması ile yapılmaktadır. Üreme ortamında yüksek glukoz varlığında *SUC2* geni transkripsiyonu baskılanır. Baskılama işleminde Mig1p kompleksi, Snf1p ve nükleozomlar görev alır. Üreme ortamındaki glukoz azaldığında ya da hücreler yüksek glukoz bulunan ortamdaki alınıp alternatif karbon kaynağı bulunan ortama konduğunda glukoz baskılaması kalkar ve *SUC2* geninden transkripsiyon yapılır (Ronne 1995, Carlson 1998).

Zayıf asit stresinin *SUC2* genine etkilerini belirlemek için deneyler yaban tip ve $\Delta snf1$, $\Delta hog1$, $\Delta hot1$ mutantlarıyla repres, derepres ve derepres 300 mM sitrik asit ortamlarında gerçekleştirildi. Repres şartlarda *SUC2* geni glukoz baskılaması altında olduğu için repres şartlarda *SUC2* geni transkripsiyonunun düşük seviyede olduğu görüldü. Derepres şartlarda ise *SUC2* geninden transkripsiyonun gerçekleştiği görüldü.

Çizelge 4.6. Sitrik asitin *SUC2* geni transkripsiyonuna etkisi



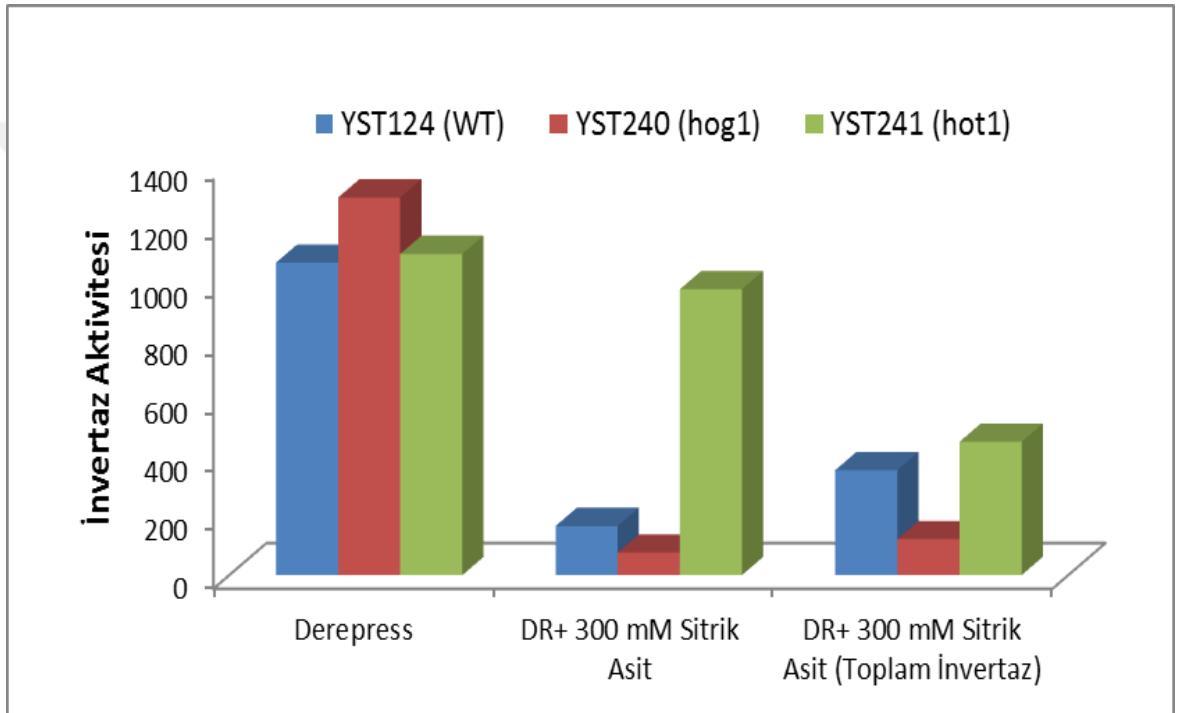
SUC2 geninin derepres olması ve dolayısıyla *SUC2* geninden transkripsiyonun yapılabilmesi için Snf1p gereklidir. Bu nedenle $\Delta snf1$ mutantlarında derepres ve derepres 300 mM sitrik asit şartlarında *SUC2* geni transkripsiyonu oldukça düşük seviyede yapılmaktadır. Derepres 300 mM sitrik asit ortamında yaban tip ve $\Delta hot1$ mutantında *SUC2* geni transkripsiyonunda 4-5 kat artış, $\Delta hog1$ mutantında ise 3 kat azalış gözlemlendi. Bu sonuç *SUC2* geninden transkripsiyonun yapılabilmesi için *Hog1*'in gerekli olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.6).

4.5. Zayıf Asit Stresinin Toplam İnvvertaz Aktivitesine Etkisi

Elde edilen sonuçlarda $\Delta hog1$ dışında yaban tip ve $\Delta hot1$ mutantında sitrik asitin *SUC2* geni transkripsiyonunu arttırdığı, invvertaz aktivitesini ise azalttığı gözlemlendi. İnvvertaz enziminin sitoplazmik form ve hücre dışına salgılanan form olmak üzere iki formu

vardır. Sukrozun hidrolizinde salgılanan form görev alır ve daha önce belirtilen invertaz aktiviteleri salgılanan invertaz enzimi aktivitesi belirlenerek verildi. Sitrik asitin *SUC2* geni transkripsiyonunu arttırdığı gözlemlendikten sonra sitrik asitin toplam invertaz aktivitesine etkisi belirlendi (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Toplam invertaz aktivitesinin ölçümü



Toplam invertaz aktivitesinin belirlenebilmesi için hücreler SDS ve kloroformla permeabilize edildi. Yaban tip ve $\Delta hog1$ mutantında toplam invertaz aktivitesinde 2 kat artış görülürken $\Delta hot1$ mutantında 2 kat azalma görüldü.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnvertaz enzimi endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılmakta olup *SUC2* geni tarafından kodlanmaktadır. İnvertaz enzimi sukroz ve rafinozun hidrolizini gerçekleştirir. *SUC2* geninin transkripsiyonu glukoz baskılaması ile düzenlenir. Üreme ortamında glukoz konsantrasyonu yüksek olduğunda *SUC2* geni baskılanır. Üreme ortamında yüksek konsantrasyonlarda glukoz varlığında transkripsiyonu baskılayıcı faktörler olan Mig1p-Tup1p-Ssn6p kompleksi, Hxk2p-Med8p kompleksi ve Gcr1p kompleksleri *SUC2* promotoruna bağlanarak transkripsiyonun tümü ile baskılanmasını sağlamaktadırlar. Ayrıca *SUC2* geni transkripsiyonunun baskılanması (repres edilmesi) için promotor bölgesinde nükleozomların bulunmasının da gerekli olduğu gösterilmiştir (Bu ve Schmidt 1998, Wu ve Winston 1997).

Araştırmada hem yaban tip hem de asit stres metabolizmasında transkripsiyon faktörü olarak yer alan Hot1p, Msn2p, Haa1p, War1p mutant suşları ve ayrıca stres yanıtında yer alan protein kinazlar olan protein kinazlar olan Hog1p, Snf1p mutant suşları kullanılarak sitrik asit (E330), benzoik asit (E211) ve sorbik asitin (E202) *S. cerevisiae*'da invertaz aktivitesine ve *SUC2* geni transkripsiyonuna etkileri incelendi.

Sorbik asit, benzoik asit, asetik asit, sitrik 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. Bu zayıf asitler *S. cerevisiae* hücrelerinde asit stresi olarak tanımlanan metabolik yanıtı oluştururlar. Bu metabolik yanıtta transkripsiyon faktörleri olan Msn2p, Haa1p, War1p, Hog1p gibi transkripsiyon faktörleri yer almaktadır.

Msn2p genel stres yanıtında görev alarak birçok genin transkripsiyonunu kontrol etmektedir. Mayanın asetik asit ve propiyonik asite hızlı adaptasyonu için

transkripsiyon faktörü olan Haa1p gereklidir (Fernandes ve ark. 2005). Özellikle Haa1p doğrudan ya da dolaylı olarak, spesifik olarak, asetik asit ile indüklenen gen ifadesini yaklaşık olarak % 80 düzenler (Mira ve ark. 2010a,b,c, 2011).

Transkripsiyon faktörü olan War1p, Pdr12p nin stres koşullarında düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır (Kren ve ark. 2003). Asetik asit, benzoik asit direncinde önemli bir etkiye sahiptir.

HOG MAPK yolağı ise hiper ozmotik strete aktif hale gelerek maya hücrelerinde gliserol sentezini sağlayıp hücrelerin stresi tolere edebilmesi için gereklidir. Hiperozmotik stres, hücre zarındaki Sln1p ve Sho1p reseptörleri ile algılanıp sitoplazmadaki MAPKKK'lara aktarılır. Sonuçta Hog1p fosforlanarak nükleusa geçer ve ilgili transkripsiyon faktörlerine etki ederek, ozmotik strese yanıt olarak bazı genlerin transkripsiyonlarının aktive edilmesini sağlar (Mager ve Siderus 2002). MAPK HOG yolağı sitrik asit direncini düzenler (Lawrence ve ark. 2004). Hücrelerin sitrik asite maruz kalması sonucunda Hog1p fosforlanarak aktif hale gelir.

Araştırmada elde edilen sonuçlarda sorbik asit ve benzoik asitin invertaz aktivitesine önemli derecede etki etmediği, sitrik asitin ise invertaz aktivitesine yaklaşık olarak 10 kat etki ettiği belirlendi. *S. cerevisiae*'nin standart laboratuvar suşu olarak kullanılan BY4741 suşunda derepres şartlarda sorbik asit ve benzoik asit varlığında yaklaşık olarak aynı seviyede invertaz aktivitesi tayin edildi.

Sitrik asit triprotik organik asit olup 3 farklı pKa değeri vardır (pKa1:3.08, pKa2: 4.74, pKa3: 5.40). Bu üç farklı pKa değerinden pKa3'ün invertaz aktivitesine en fazla etki ettiği görüldü. pKa3'te farklı konsantrasyonlarda sitrik asit üreme ortamına eklenerek 300 mM sitrik asitin en etkin konsantrasyon olduğu görüldü ve çalışmalara pKa3 pH:5.40 300 mM sitrik asit ile devam edildi.

Transkripsiyon faktörleri olan *hog1*, *msn2*, *haa1*, *war1* mutant suşları kullanılarak bu transkripsiyon faktörlerinin repres, derepres, derepres 300 mM sitrik asit şartlarında invertaz aktivitelere etkileri belirlendi. Derepres şartlarda yaban tip ve tüm mutantlarda invertaz aktivetilerinin aynı olduğu görüldü. Derepres 300 mM sitrik asit şartlarında $\Delta msn2$, $\Delta haa1$, $\Delta war1$ mutantlarında invertaz aktivitesinde önemli bir etki görülmezken, $\Delta hog1$ mutantında invertaz aktivitesinde yaklaşık üç kat azalma görüldü ve deneylere $\Delta hog1$ mutantıyla devam edildi. YEASTRACT veri tabanında yaptığımız analizde *SUC2* promotorunda asit stres yanıtı ile aktive edilen transkripsiyon faktörlerinden birisi olan Haa1p'nin normal şartlarda veya asit stresi şartlarında da *SUC2* transkripsiyonunda yer almaması kayda değer önemli bir sonuç olarak görülmektedir (www.yeasttract.com/findregulators.php?type=pot&genes=YIL162W, 2016). Bir transkripsiyon faktörünün ilgili promotorlarda bağlanma dizisinin olması o transkripsiyon faktörünün ilgili genin transkripsiyonel regülasyonunda mutlaka yer alması gerektiğini gösteren bir sonuçtur.

HOG sinyal iletim yolunun invertaz aktivitesine etkisini belirlemek amacıyla yaban tip ve $\Delta hog1$, $\Delta hot1$ delesyonlu mutantlarda repres, derepres, derepres 300 mM sitrik asit şartlarında invertaz aktivite belirlendi. Repres şartlarda glukoz baskılamasından dolayı beklenildiği şekilde hem yaban tip hemde mutant suşlarda invertaz aktivitesinin düşük olduğu görüldü. Derepres 300 mM sitrik asit şartlarında $\Delta hot1$ mutantlarında invertaz aktivitesinde azalma veya artış görülmezken yaban tip ve $\Delta hog1$ mutantında invertaz aktivitesinde yaklaşık 13 kat azalma görüldü. Bir çeşit protein kinaz olan Hog1p'nin hedef genler üzerine etkisini gösterdiği faktörlerden birisi de transkripsiyon faktörü Hot1p'dir. Hog1p tarafından fosforlanan Hot1p hedef genlerin promotorlarında spesifik olarak bağlandığı dizileri tanıyıp bağlanır ve ilgili genlerin transkripsiyonunu aktive eder (Gomar-Alba ve ark. 2015). Hot1p'nin *SUC2* geni promotor dizisi üzerinde bağlanma dizisi (5'-GGGACAAA-3') henüz YEASTRACT veri tabanında yer almamaktadır (www.yeasttract.com/findregulators.php?type=pot&genes=YIL162W, 2016). Hot1p'nin direkt olarak *SUC2* geni promotoruna bağlandığı da deneysel olarak gösterilmemiştir. Bu durumda HOG sinyal yolağının başlıca aktivatörü olan Hot1p'nin asit stresine yanıt olarak *SUC2* geni transkripsiyonunun kontrol edilmesinde yer

almaması da şaşırtıcı olmamalıdır. Hog1p'nin aktive ettiği önemli transkripsiyon faktörlerinden birisi Sko1p'dir ve bu transkripsiyon faktörünün *SUC2* geni transkripsiyonunun aktivasyonunda yer aldığı daha önce rapor edilmiştir (Proft ve Struhl 2002). Stres şartlarında Hog1p'nin Sko1p'yi fosforile ederek aktive ettiği ve bunun da ilgili promotorlara SAGA histon asetilaz ve SNF/SWI nükleozom remodeling kompleksini taşıyıp çok hızlı bir şekilde transkripsiyonel aktivasyona yol açtığı açıkça gösterilmiştir (Proft ve Struhl 2002). Bu bilgiye bağlı olarak araştırmada incelenen *SUC2* promoturunun sitrik asite bağlı olarak aktivasyonunda da Hog1p'nin Sko1p ve kromatin modifiye edici faktörler aracılığı ile gerçekleştiğini öne sürmek mümkündür. Proft ve Struhl (2002) tarafından yapılan incelemede stres ile aktive edilen Hog1p ve Sko1p'ye bağlı promotorlar olarak *GRE2* (İsoflavanoid reduktaz benzeri), *AHP1* (Alkyl HydroPeroxide reductase) ve *HAL1* (Halotolerans 1) incelenmiştir. *SUC2* geninin asit stresi şartlarında Hog1p'ye bağlı olarak aktive edildiği konusunda literatürde henüz bir çalışmaya rastlanmamıştır. *SUC2* geninin transkripsiyonel olarak aktivasyonu için kromatin modifiye edici faktörlerin gerekli olduğu da daha önceki araştırmalarda gösterilmiştir (Bu ve Schmidt 1998, Wu ve Winston 1997). SGD kayıtlarında yapılan incelemede Hog1p'nin çok sayıda kromatin modifiye edici faktörler ile etkileştiği de görülmektedir. $\Delta hog1$ mutantlarında *SUC2* geninde derepresyon tam olarak gerçekleşmektedir. Snf1p'nin Hog1p aktivitesi için gerekli olduğu görülmektedir. *SUC2* geni derepresyonu için Snf1p'nin tek başına yeterli olmadığını Hog1p'ninde gerekli olduğunu göstermektedir.

Zayıf asit stresinin *SUC2* genine etkilerini belirlemek amacıyla yaban tip ve $\Delta snf1$, $\Delta hog1$, $\Delta hot1$ mutantlarında repres, derepres ve derepres 300 mM sitrik asit ortamlarında β -galaktozidaz aktiviteleri belirlenerek *SUC2* geninden yapılan transkripsiyon seviyesi belirlendi. Repres şartlarda *SUC2* geni glukoz baskılaması altında olduğu için *SUC2* geni transkripsiyonun düşük seviyede olduğu görüldü. Derepres şartlarda ise *SUC2* geninden transkripsiyonun gerçekleştiği görüldü. Mig1p kompleksinin fosforlama olayını Snf1 protein kinaz kompleksi (Snf1p) gerçekleştirmektedir. *SUC2* geninin derepres olması ve dolayısıyla *SUC2* geninden transkripsiyonun yapılabilmesi için Snf1p gereklidir. Bu nedenle $\Delta snf1$ mutantında

derepres ve derepres 300 mM sitrik asit şartlarında *SUC2* geni transkripsiyonu oldukça düşük seviyede yapılmaktadır. Derepres 300 mM sitrik asit ortamında yaban tip ve *Δhot1* mutantında *SUC2* geni transkripsiyonunda 4-5 kat artış, *Δhog1* mutantında ise 3 kat azalış gözlemlendi. Bu sonuç *SUC2* geninden transkripsiyonun yapılabilmesi için Hog1 in gerekli olduğunu göstermektedir. Daha önceki çalışmalarda Hog1'in *SUC2* transkripsiyonu için gerekli olduğu gösterilmemiştir. *S. cerevisiae*'nin hem laboratuvar suşu (BY4741) hem de endüstriyel suşlarında (ekmek üretiminde kullanılan) ozmotik stresin etkileri incelenmiştir. Fakat ozmotik stresin *SUC2* geni transkripsiyonuna etkilerinin incelendiği çalışmada Hog1p'nin etkileri rapor edilmemiştir (Türkel 2000, Türkel ve Turgut 2002). Derepres şartlarda Snf1p'nin Sln1p, Sho1p veya doğrudan Hog1p'yi aktif hale getirip Sko1p başta olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörleri yardımıyla *SUC2* genini aktif hale getirdiği düşünülmektedir.

S. cerevisiae' da invertaz periplasmik alanda, sitoplazmada bulunabildiği gibi endoplazmik retikulum ve golgi organellerinde de bulunmaktadır. Elde edilen veriler periplasmik alanda bulunan sukrozun hidrolizinde görev alan aktif invertaz aktivitesini göstermektedir. Sitrik asit bulunan ortamda yaban tip ve bazı mutantlarda *SUC2* geni transkripsiyonu artıp invertaz enzim aktivitesinin azalması nedeniyle toplam invertaz aktivitesi belirlendi. Yaban tip ve *Δhog* mutantında toplam invertaz aktivitesinde artış görüldü. Bu sonuçta sitrik asitin *SUC2* geni tarafından sentezlenen invertaz enziminin sekresyonunu veya sentezlenen enzimin aktif hale dönüşmesini engellediğini veya enzimin endoplazmik retikulum ve golgi organlarında biriktiğini göstermektedir. *Δhot* mutantında ise toplam invertaz aktivitesinde azalma görüldü. Bu sonucun ise periplasmik alanda, sitoplazmada, endoplazmik retikulum ve golgi organlarında invertaz enziminin farklı seviyelerde bulunmasından dolayı görüldüğü düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- 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. Cel Biol.*, 14(6): 4135-4144.
- Alepuz, P.M., De Nadal, E., Zampeter, M., Ammerer, G., Posas, F. 2003.** Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA pol II. *EMBO J.*, 22(10): 2433-2442.
- 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(3): 720-732.
- Arneborg, N., Jespersen, L., Jakobsen, M. 2000.** Individual cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* exhibit different short-term intracellular pH responses to acetic acid. *Arch. Microbiol.*, 174(1-2): 125-128.
- Baker, H. 1991.** *GCR1* of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a DNA binding protein whose binding is abolished by mutations in the CTTCC sequence motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88: 9443-9447.
- Bauer, B.E., Wolfger, H., Kuchler, K. 1999.** Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1461(2): 217-236.
- Bu, Y., Schmidt, M.C. 1998.** Identification of cis-acting elements in the *SUC2* promoter of *Saccharomyces cerevisiae* required for activation of transcription. *Nucleic Acids Res.*, 26: 1002-1009.
- Carlson, M., Boststein, D. 1982.** Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell*, 28: 145-154.
- Carlson, M., Taussig, R., Kustu, S., Botstein, D. 1983.** The secreted form of invertase in *Saccharomyces cerevisiae* is synthesized from mRNA encoding a signal sequence. *Mol. Cel. Biol.*, 3: 439-447.
- Carlson, M., Celenza, J.L., Eng, F.J. 1985.** Evolution of the dispersed *SUC* gene family of *Saccharomyces* by rearrangements of chromosome telomeres. *Mol. Cel. Biol.*, 5: 2894-2902.
- Carlson, M. 1998.** Regulation of glucose utilization in yeast. *Curr. Opin. Genet. and Dev.*, 8: 560-564.
- 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.** *Saccharomyces* genome database: the genomiks resource of budding yeast. *Nucleic Acids Res.*, 40: 700-705.

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(8): 1375-1386.

De La Cera, T., Herrero, P., Moreno-Herrero F., Chaves, R.S., Moreno, F. 2002. Mediator factor Med8p interacts with the hexokinase 2: Implication in the glucose signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.*, 319: 703714.

de Nobel, H., Lawrie, L., Brul, S., Kils, F., Davis, M., Alloush, H., Coote, P. 2001. Parallel and comparative analysis of the proteome and transcriptome of sorbic acid-stressed *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 18(15): 1413-1428.

De Vit, M.J., Wadle, J.A., Johnston, M. 1997. Regulated nuclear translocation of Mig1 glucose repressor. *Mol. Biol. Cell.*, 8: 1603-1618.

De Vit, M.J., Johnston, M. 1999. The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Biol.*, 9: 1231-1241.

Duina, A.A., Miller, M.E., Keeney, J.B. 2014. Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*, 197(1): 33-48.

Dymond, J.V., Richardson, S.M., Coombes, C.E., Babatz, T., Muller, H., Annaluru, N., Blake, W.J., Schwerzmann, J.W., Dai, J., Lindstrom, D.L., Booke, A.C., Gottschling, D.E., Chandrasegaran, S., Bader, J.S., Booke, J.D. 2011. Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design. *Nature*, 477(7365): 471-476.

Edmondson, D.G, Smith, M.M., Roth, S.Y. 1996. Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes and Dev.*, 10: 1247-1259.

Engels, B., Dahm, P., Jennewein, S. 2008. Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards Taxol (Paclitaxel) production. *Metabolic Engineering*, 10: 201-206.

Erasmus, D. J., Van Der Merwe, G. K., J van Vuuren, H.J. 2003. Genomewide expression analyses: Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Res.*, 3(4): 375-395.

Estruch, F. 2000. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev.*, 24(4): 469-486.

Fernandes, A.R., Mira, N.P., Vargas, R.C., Canelhas, I., Sà-Correial, I. 2005. *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to weak acids involves the transcription factor Haa1p and Haa1p-regulated genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 337: 95-103.

Fuchs, B.B., Mylonakis, E. 2009. Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. *Eukaryot. Cell*, 8(11): 1616-1625.

- Gagiano, M., Bauer, F.F., Pretorius, I.S. 2002.** The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 2: 433-470.
- Gancedo, J.M. 1998.** Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 334- 361.
- Gancedo, J.M., Flores, C.L., Gancedo., C. 2015.** The repressor Rgt1 and the cAMP-dependent protein kinases control the expression of the *SUC2* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1850: 1362-1367.
- Gasch, A.P., Werner-Washburne, M. 2002.** The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Funct. Integr. Genomics*, 2(4-5): 181-192.
- Giannattasio, S., Guaragnella, N., Corte-Real, M., Passarella, S., Marra, E. 2005.** Acid stress adaptation protects *Saccharomyces cerevisiae* from acetic acid-induced programmed cell death. *Gene*, 354: 93-98.
- 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.
- Goldstein, A., Lampen, J.O. 1975.** β -D-Fructofuranoside Fructohydrolase from yeast. *Methods Enzymol.*, 42: 504-511
- Gomar-Alba M., Amaral, C., Artacho, A., D'Auria, G., Pimentel, C., Rodrigues-Pousada, C., li del Olmo, M., 2015.** The C-terminal region of the Hot1 transcription factor binds GGGACAAA-related sequences in the promoter of its target genes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1849 (12): 1385-1397.
- Görner, W., Durchschlag, E., Martinez-Pastor, M.T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., Ruis, H., Schüller, C. 1998.** Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.*, 12(4): 586-597.
- Greetham, D., Takagi, H., Phister, T.P. 2014.** Presence of proline has a protective effect on weak acid stressed *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105: 641-652.
- Guthrie, C., Fink, G.R. 1991.** Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol.*, 194: 1-932.
- Hardie, D.G. 2007.** AMP-activated/Snf1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8: 774-785.
- Hatzixanthis, K., Mollapour, M., Seymour, I., Bauer, B.E., Krapf, G., Schüller, C., Kuchler, K., Piper, P.W. 2003.** Moderately lipophilic carboxylate compounds are the

selective inducers of the *Saccharomyces cerevisiae* Pdr12p ATP-binding cassette transporter. *Yeast*, 20 (7): 575-585.

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.

Hohmann, S. 2002. Osmotic stress signalling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66(2): 300-372.

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(9): 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.*, 181(15): 4644-4652.

Holyoak, C.D., Thompson, S., Ortiz Calderon C., Hatzixanthis, K., Bauer, B., Kuchler, K., Piper, P.W., Coote, P.J. 2000. Loss of Cmk1 Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase in yeast results in constitutive weak organic acid resistance, associated with a post-transcriptional activation of the Pdr12 ATP-binding cassette transporter. *Mol. Microbiol.*, 37(3): 595-605.

Hong, S.P., Carlson, M. 2007. Regulation of Snf1 protein kinase in response to environmental stress. *J. Biol. Chem.*, 282(23): 16838-16845.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, 153(1): 163-168.

Johnston, M. 1999. Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet.*, 15(1): 29-33.

Krebs, H.A., Wiggins, D., Stubbs, M., Sols, A., Bedoya, F. 1983. Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochem. J.*, 214(3): 657-663.

Kren, A., Mammun, Y.M., Bauer, B.E., Schüller, C., Wolfger, H., Hatzixanthis, K., Mollapour, M. 2003. War1p, a novel transcription factor controlling weak acid stress response in yeast. *Mol. Cell Biol.*, 23: 1775-1785.

Lambert, R.J., Stratford, M. 1999. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *J. Appl. Microbiol.*, 86(1): 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(8): 3307-3323.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farrand, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275

- Ludovico, P., Sosuso, M.S., Silva, M.T., Leao, C., Corte-Real, M. 2001.** *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiolgy*, 147: 2409-2415.
- Ludovico, P., Sansonetty, F., Silva, M.T., Côrte-Real, M. 2003.** Acetic acid induces a programmed cell death process in the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS yeast Res.*, 3(1): 91-96.
- Lutfiyya, L.L., Johnston, M. 1996.** Two Zinc-Finger-Containing repressors are responsible for glucose repression of *SUC2* expression. *Mol Cell. Biol.*, 16: 4790-4797.
- Madeo, F., Fröhlich, E., Fröhlich, K.U. 1997.** A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J. Cell Biol.*, 139(3): 757-767.
- Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S.J., Wolf, D.H., Fröclich, K.U. 1999.** Oxygen stress: a regulatör of apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.*, 145(4): 757-767.
- Madigan, M.T., Mertingo, J.M. 2010.** Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, çev. Prof. Dr. Cumhur Çökmüş, Palme Yayıncılık, Ankara, 2010.
- Mager, W.H., Siderius, M. 2002.** Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Res.*, 2: 251-257.
- Mattanovich, D., Branduardi, P., Dato, L., Sauer, M, Porro, D. 2012.** Recombinant protein production in yeast. *Methods Mol. Biol.*, 824: 329-358.
- McCartney, R.R., Schmidt, M.C. 2001.** Regulation of Snf1p kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J. Biol. Chem.*, 276: 36460-36466.
- Mewes, H.W., Alberman, K., Bähr, M., Frishman, D., Gleissner, A., Hani, J., Heumann, K., Kleine, K., Maierl, A., Oliver, S.G., Pfeiffer, F., Zollner, A. 1997.** Overview of the yeast genome. *Nature*, 387: 7-65.
- Mira, N.P, Palma, M., Guerreiro, J.F., Sà-Correia, I. 2010a.** Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for tolerance to acetic acid. *Microb. Cell Fact.*, 9: 1-13.
- Mira, N.P., Becker, J.D., Sà-Correia, I. 2010b.** Genomic expression program involving the Haa1p-regulon in *Saccharomyces cerevisiae* response to acetic acid. *OMICS*, 14(5): 587-601.
- Mira, N.P, Teixeira, M.C., Sà-Correia, I. 2010c.** Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: a genome wide view. *OMICS*, 14(5): 525-540.
- Mira, N.P., Henriques, S.F., Keller, G., Teixeira, M.C., Matos, R.G., Arraiano, C.M., Winge, D.RÇ, 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(16): 6896-6907.
- Mollapour, M., Piper, P.W. 2006.** Hog1p mitogen-activated protein kinase determines acetic acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 6(8): 1274-1280.

Mollapour, M., Piper, P.W. 2007. Hog1 mitogen-activated protein kinase phosphorylation targets the yeast Fps1 aquaglyceroporin for endocytosis, thereby rendering cells resistant to acetic acid. *Mol. Cell. Biol.*, 27(18): 6446-6456.

Mollapour, M., Shepherd, A., Piper, P.W. 2009. Presence of the Fps1p aquaglyceroporin channel is essential for Hog1p activation, but suppresses Slt2 (Mpk1p) activation, with acetic acid stress of yeast. *Microbiology*, 155: 3304-3311.

Moreno-Herrero, F., Herrero, P., Colchero, J., Baro, A.M., Moreno, F. 1999. Analysis by atomic force microscopy of Med8 binding to cis-acting regulatory elements of the *SUC2* and *HXK2* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 459: 427-432.

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.

Olson, M.V. 1991. Genome structure and organization in *Saccharomyces cerevisiae*: The molecular biology of the yeast *Saccharomyces* genome dynamics, protein synthesis and energetics, Ed: Pringle, J.R., Broach, J.R., Jones, E.W., pp: 1-39.

O'Rourke, S.M., Herskowitz, I., O'Shea, E.K. 2002. Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response. *Trends Genet.*, 18(8): 405-412.

Pampulha, M.E., Loureiro- Dias, M.C. 1990. Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34: 375-380.

Pampulha, M.E., Loureiro- Dias, M.C. 2000. Energetics of the effect of acetic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 184(1): 69-72.

Pearce, A.K., Crimmins, K., Groussac, E., Hewlins, M.J., Dickinson, J.R., Francois, J., Booth, I.R., Brown, A.J. 2001. Pyruvate kinase (Pyk1) levels influence both the rate and direction of carbon flux in yeast under fermentative conditions. *Microbiology*, 147: 391-401.

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(1): 12-24.

Piper, P.W., Mahé, Y., Thompson, S., Pandjaitan, R., Holyoak, C., Egner, R., Mühlbaver, M., Coote, P., Kuchler, K. 1998. The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *EMBO J.*, 17(15): 4257-4265.

Piper, P.W., Calderon, C.O., Hatzixanthis, K., Mollapour, M. 2001. Weak acid adaptation: the stress response that confers yeast with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology*, 147: 2635-2642.

Piper, P.W. 2011. Resistance of yeast to weak organic acid food preservatives. *Adv. Appl. Microbiol.*, 77: 97-113.

- Porro, D., Gasser, B., Fossati, T., Maurer, M., Branduardi, P., Sauer, M., Mattanovich, D. 2011.** Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts: when are these systems better than bacterial production systems?. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89: 939-948.
- Proft, M., Struhl, K. 2002.** Hog1 Kinase Converts the Sko1-Cyc8-Tup1 Repressor Complex into an Activator that Recruits SAGA and SWI/SNF in Response to Osmotic Stress. *Mol. Cell*, 9: 1307–1317.
- Rodrigues- Pousada, C., Menezes, R.A., Pimental, C. 2010.** The Yap family and its role in stress response. *Yeast.*, 27(5): 245-258.
- Rolland, F., Winderickx, J., Thevelein, J.M. 2001.** Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trens Biochem. Sci.*, 26: 310-317.
- Ronne, H. 1995.** Glucose repression in fungi. *Trends Genet.*, 11: 12-17.
- Rothe, C., Lehle, L. 1998.** Sorting of invertase signal peptide mutants in yeast dependent and independent on the signal-recognition particle. *Eur. J. Biochem.*, 252: 16-24.
- Rudolf, A., Karhumaa, K., Hagerdal. H.G. 2009.** Ethanol Production from Traditional and Emerging Raw Materials. In: Satyanarayana T & Kunze G editors. In: *Yeast Biotechnology: Diversity & Application*, Springer, pp: 489-515.
- Salmond, C.V., Kroll, R.G., Booth, I.R. 1984.** The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, 130(11): 2845-2850.
- Sarokin, L., Carlson, M. 1985.** Upstream region of the *SUC2* gene confers regulated expression to a heterologous gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 5: 2521-2526.
- Schüller, C., Mamnun, Y., Mollapour, M., Kraph, G., Schuster, M., Bauer, B., Piper, P.W, Kuchler, K. 2004.** Global phenotypic analysis and transcriptional profiling defines the weak acid stress response regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, 15: 706-720.
- Shima, J., Takagi, H. 2009.** Stress-tolerance of baker's-yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells: stress molecules and genes involved in stress tolerance. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 53: 155-164.
- 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, Ed: Bubulya, P., Intech, pp: 73-100.
- Stratford, M., Anslow, P.A. 1996.** Comparison of the inhibitory action of *Saccharomyces cerevisiae* of weak-acid preservatives, uncouplers, and medium-chain fatty acids. *FEMS Microbial Lett.*, 142(1): 53-58.
- Stratford, M., Anslow, P.A. 1998.** Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic 'weak acid preservative'. *Lett. Appl. Microbiol.*, 27(4): 203-206.

- Taussig, R., Carlson, M. 1983.** Nucleotide sequence of the yeast *SUC2* gene for invertase. *Nucleic Acids Res.*, 11(6): 1943-1954.
- Türkel, S. 2000.** Effects of various physiological stresses on transcription of the *SUC2* gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Turk. J. Biol.*, 24: 233-240.
- Türkel, S., Turgut, T. 2002.** Analysis of the effects of hyperosmotic stress on the derepression of invertase activities and the growth of different baker's yeast strains. *Turk. J. Biol.*, 26: 155-161.
- Türkel, S., Turgut, T., Lopez, M., Uemura, H., Baker, H.V. 2003.** Mutations in *GCR1* affect *SUC2* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics.*, 268: 825-831.
- Uemura, H., Jigami, Y. 1995.** Mutations in *GCR1*, a transcriptional activator of *Saccharomyces cerevisiae* glycolytic genes, function as suppressors of *gcr2* mutations. *Genetics*, 139, 511-521.
- Wang Y., Chen S., Yu O. 2011.** Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91: 949-956.
- Warth, A.D. 1991.** Mechanism of action of benzoic acid on *Zygosaccharomyces bailii*: effects on glycolytic metabolite levels, energy production and intracellular pH. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(12): 3410-3414.
- Watson A.D., Edmondson, D.G., Bone, J.R., Mukai, Y., Yu, Y., Du, W., Stillman, D.J., Roth, S.Y. 2000.** Ssn6-Tup1 interacts with class I histone deacetylases required for repression. *Genes and Dev.*, 14: 2737-2744.
- Winzler, E.A, Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Betino, R., Booke, 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: 901-906.
- Wu, L., Winston, F. 1997.** Evidence that Snf-Swi controls chromatin structure over both the TATA and UAS regions of the *SUC2* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, 25(21): 4230-4234.
- Wu, J., Trumbly, R.J. 1998.** Multiple regulatory proteins mediate repression and activation by interaction with the yeast Mig1 binding site. *Yeast*, 14: 985-1000.
- Yale, J., Bonhert, H.J. 2001.** Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *J. Biol. Chem.*, 276: 15996-16007.

Zhang, J.G., Liu, X.Y., He, X.P., Guo, X.N., Lu, Y., Zhang, B.R. 2011. Improvement of acetic acid tolerance and fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* by disruption of the *FPS1* aquaglyceroporin gene. *Biotechnol. Lett.*, 33(2): 277-284.

Web Ortamından Elde Edilen Kaynaklar

[http://www.yeastgenome.org/locus/S000001424/overview-\(10.07.2016\)](http://www.yeastgenome.org/locus/S000001424/overview-(10.07.2016))

[http://www.yeasttract.com/findregulators.php?type=pot&genes=YIL162W-\(10.07.2016\)](http://www.yeasttract.com/findregulators.php?type=pot&genes=YIL162W-(10.07.2016)).

[http://www.yeasttract.com/view.php?existing=locus&orfname=YIL162W-\(10.07.2016\)](http://www.yeasttract.com/view.php?existing=locus&orfname=YIL162W-(10.07.2016)).



EKLER

Ek 1: Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması

1: YPD (Yeast Ekstrakt, Pepton, Dekstroz)

YPD besiyeri *S. cerevisiae* için tam, seçici olmayan üreme ortamı olarak kullanıldı. YPD besi yeri hazırlamak için Yeast ekstrakt: 10 g/L, Pepton: 20 g/L alınıp distile suda çözüldü ve otoklavda 121°C'de 25 dakika steril edildi. YPD petrilerini hazırlamak için sıvı besiyerine 20 g/L olacak şekilde agar agar eklendi. Üreme ortamında karbonhidrat kaynağı olarak kullanılan glukoz %20'lik stok çözelti halinde hazırlandı ve 121°C'de 25 dakika otoklavda steril edildi. Kullanımdan hemen önce üreme ortamına son konsantrasyonu %2 olacak şekilde ilave edildi.

2: Sentetik tam-urasil üreme ortamı (Sc-Ura)

Sc-ura *S. cerevisiae* transformantları için seçici besiyeri olarak kullanıldı. 1.7 g/L YNB, 5 g/L amonyum sülfat distile suda çözüldü ve 121°C'de 25 dakika süreyle olarak otoklavda sterilize edildi. Sc-ura katı besiyeri için son konsantrasyon 20 g/L olacak şekilde agar agar eklenerek 121°C'de 25 dakika süreyle otoklavlandı. Aminoasit kaynağı olarak filtre sterilizasyon yöntemiyle sterilize edilmiş urasil içermeyen aminoasit karışımı (Sc-ura, Sigma Y-1501) son konsantrasyon 1.92 gram/litre olacak şekilde kullanımdan hemen önce üreme ortamına ilave edildi.

3: Lityum Asetat

Lityum asetat *S. cerevisiae*'da Suc2-LacZ plazmiti transformasyonu için kullanıldı. Steril saf suda 1 M stok olarak hazırlandı, 0.45 µm por çaplı membran disk filtre ile steril edildi.

4: %50 Polietilen Glikol (PEG)

S. cerevisiae transformasyonu için kullanıldı. Katı Polietilen Glikol (Ma. 3500) distile suda %50'lik stok çözelti olarak hazırlandı, otoklavda steril edildi.

5: Lizis tampon çözeltisi

Bu tampon çözelti *S. cerevisiae* transformantlarını süspanse etmek için kullanıldı. 100 mM Tris.HCl (pH: 8), 1 mM DTT (1,4-Dithio-DL-threitol), %20 Gliserol ve 4 mM PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride) çözeltisi steril distile su ile hazırlandı ve +4°C'de saklandı.

6: Z tampon çözeltisi (Z Buffer)

β -galaktozidaz enzimatik aktivitesi boyunca tampon çözelti olarak kullanıldı. 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 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve 50 mM β -Merkepto etanol çözeltisi steril distile su ile hazırlandı ve +4°C'de saklandı.

7: Lowry Çözeltisi

Hücre lizatlarındaki protein konsantrasyonunu belirlemek için kullanıldı.

- Lowry A çözeltisi: 20g Na_2CO_3 ve 4g NaOH toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü.

- Lowry B1 çözeltisi: 1 gram CuSO_4 toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile suda çözüldü.

- Lowry B2 çözeltisi. 2 gram Sodyum potasyum tartarat toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile suda çözüldü.

Lowry C her deneyde taze olarak stok çözeltilerden hazırlandı: 24.5 ml Lowry A, 250 μl Lowry B1, 250 μl Lowry B2 karıştırıldı ve hemen kullanıldı.

Ek 2: β - Galaktozidaz aktivitesinin hesaplanması

S.cerevisiae transformantlarının transkripsiyonları sonucu LacZ füzyonlarından sentezlenen β -galaktozidaz enzimlerinin aktiviteleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

B-gal ünitesi;

$[OD_{420} \times 1.7] / [0.0045 \times \text{Protein Konsantrasyonu} \times \text{Reaksiyondaki Lizat Hacmi} \times \text{Zaman}]$

OD_{420} : Sarı rengin absorbanası

1.7: Sarı rengin bulunduğu tüpün hacmi (980 μ l Z buffer, 200 μ l ONPG, 500 μ l $NaCO_3$)

0.0045:ONPG'nin molar absorpsiyon katsayısı

Protein konsantrasyonu: mg/ml

Lizat hacmi: Değişken (ml)

Zaman: Sarı rengin oluştuğu zaman (dk)

β -galaktozidaz aktivitesi hesaplanmasında yukarıdaki formül excel tablosuna dönüştürülerek kullanılmıştır. Aktivite dakikada 1 mg protein tarafından hidroliz edilen nmol ONPG (nmol ONPG/dk/ mg protein) cinsinden verilmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Aylin KAHRAMAN
Doğum Yeri ve Tarihi : Bursa, 23.10.1991
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lise : Bursa Suleyman Celebi Lisesi/ 2009
Lisans : Uludag Üniversitesi/ 2014
Yüksek Lisans : Uludag Üniversitesi/ 2016
İletişim (e-posta) : aylin__kahraman@hotmail.com
Yayınları :

1- Aylin Kahraman, Sinem Angın, Sezai Türkel. 2015. Molecular and Biochemical Analysis of the Effects of some Food Additives on the Expression of Trehalose and Glycerol Metabolism Genes in *S.cerevisiae*. IV Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi. Afyonkarahisar, 21-24 Ağustos, 2015. (Poster).

2- Aylin Kahraman, and Sezai Türkel. 2015. The Effects of Weak Organic Acid stress on the *SUC2* Gene Exspression and Invertase activity in *S.cerevisiae*. 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi. Konya, 18-19 Aralık, 2015. (Poster).

3- Sezai Türkel, and Aylin Kahraman. 2016. Genetic and Biochemical Analysis of the Effects Weak Organic Acid Stress on the *SUC2* gene Exspression and Invertase Activity in *Saccharomyces cerevisiae*. (Yayına hazırlanıyor).