

***SACCHAROMYCES CEREVISIAE*'DA
TRANSKRİPSİYON FAKTORÜ GCR1P FAZLA
SENTEZİNİN METABOLİK ETKİLERİ**

MEVLÜT ULAŞ



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

***SACCHAROMYCES CEREVISIAE*'DA TRANSKRİPSİYON FAKTORÜ GCR1P
FAZLA SENTEZİNİN METABOLİK ETKİLERİ**

Mevlüt ULAŞ

Prof. Dr. Sezai TÜRKEL
(Danışman)

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

**BURSA-2015
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ ONAYI

Mevlüt ULAŞ tarafından hazırlanan “*Saccharomyces cerevisiae*’da Transkripsiyon Faktörü Gcr1p Fazla Sentezinin Metabolik Etkileri” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile 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 İmza.
U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

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

Üye: Yrd.Doç.Dr. Tülay Turgut Genç İmza.
Ç.O.M.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali Osman DEMİR
Enstitü Müdürü

08 / 09 / 2015

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.

08 / 09 / 2015

Mevlüt ULAŞ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SACCHAROMYCES CEREVISIAE'DA TRANSKRİPSİYON FAKTORÜ GCR1P FAZLA SENTEZİNİN METABOLİK ETKİLERİ

Mevlüt ULAŞ

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Gliserol, trehaloz ve etanol *Saccharomyces cerevisiae* tarafından glikolitik yolağa bağlı olarak üretilen önemli endüstriyel metabolitlerdir. Glikolitik enzim kodlayan genlerin transkripsiyonunu aktive eden en önemli faktör de *GCR1* geni tarafından kodlanan transkripsiyon faktörüdür. *GCR1* geni delesyonlu maya suşlarında glikolitik enzimlerin seviyesi normal seviyenin %1-3'ü kadardır. *GCR1* mutant suşları glukoz içeren ortamda çok yavaş üreme gösterir. *GCR1* geni çok düşük seviyede transkribe edilmektedir. Gcr1p glukoz taşınımı için gerekli olan *HXT* genleri transkripsiyonun aktivasyonuna da yer alır. Bu araştırmada *GCR1* geni hücrede çok kopyalı olarak bulunan maya ekspresyon vektöründen *CUP1* promotörüne bağlı olarak ekspres edilmiştir. Araştırmada hem yaban tip ve hem de metabolik mutant *S. cerevisiae* suşları kullanılmıştır. *GCR1* geni fazla ekspresyonunun üreme hızı, glukoz tüketim hızı, ve depo karbonhidrat metabolizmasına etkileri incelenmiştir. Elde edilen araştırma sonuçları *GCR1* fazla sentezinin yaban tip maya suşunda üreme hızını arttırdığını göstermektedir. Gcr1p fazla sentezi maya suşlarının genetik yapısına bağlı olarak glukoz tüketim hızını, trehaloz, glikojen ve gliserol biyosentezinde de değişikliklere neden olmaktadır. Bununla birlikte, elde edilen sonuçlarımız Gcr1p fazla sentezinin etanol biyosentezine etkisi olmadığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *S. cerevisiae*, Glikoliz, Gliserol, Etanol, Trehaloz, Üreme hızı
Transkripsiyon, Metabolik Kontrol.

2015, XII + xx sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

THE METABOLIC AFFECTS OF OVEREXPRESSION OF GCR1P TRANSCRIPTION FACTOR IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Mevlüt ULAŞ

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

Supervisor: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Glycerol, trehalose and ethanol are important industrial metabolites produced from glycolytic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. The most important transcription factor that activates the transcription of the glycolytic enzyme encoding genes is GCR1. In *GCR1* deletion mutant yeasts, the levels of glycolytic enzymes decrease to 1-3% of the normal, wild type levels. *GCR1* mutant *Saccharomyces cerevisiae* strains grow very slow in the glucose medium. *GCR1* gene is transcribed at low levels. Gcr1p is also involved in the transcriptional activation of *HXT* genes that are involved in glucose transport. In this study, *GCR1* gene is expressed from *CUP1* promoter on the high copy yeast expression vector. Both the wild type and the metabolic mutant *S. cerevisiae* strains were used in the study. The effects of *GCR1* over-expression on the growth rate, glucose consumption and reserve carbohydrate metabolism was investigated. Results of this study indicates that *GCR1* over-expression increases the growth rate of the wild type yeast strain. Gcr1p over-production also alters the glucose consumption rate, biosynthesis of trehalose, glycogen, and glycerol, depending on the genetic structure of the yeast strains. Nonetheless, our results indicated that *GCR1* over-expression has no effect on the ethanol biosynthesis in yeast.

Keywords: *S. cerevisiae*, Glycolysis, Glycerol, Ethanol, Trehalose, Growth Rate, Transcription, Metabolic Control.

2015, XII + 39 pages

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarımın her aşamasında destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve akademik hayata umutla bakmamı sağlayan danıőmanım Sayın Prof.Dr. Sezai TÜRKEK'e, akademik hayatım boyunca maddi ve manevi anlamda benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ailemin her bir ferdine, dostum Naci ÖZ'e sonsuz teőekkürlerimi sunuyorum.

Mevlüt ULAŞ

08. 09. 2015

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>S.cerevisiae</i> 'nin Genetik Yapısı ve Biyolojik Özellikleri.....	2
2.2. <i>S.cerevisiae</i> 'nin Endüstriyel Önemi.....	6
2.3. <i>S.cerevisiae</i> 'da Glukoz Transportu ve Sinyal İletimi.....	7
2.4. <i>S.cerevisiae</i> 'da Gcr1p'nin Önemi.....	9
2.5. <i>S.cerevisiae</i> 'da Gliserol, Trehaloz ve Glikojen Metabolizması ve Önemi.....	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
3.1. Araştırmada Kullanılan <i>S. cerevisiae</i> Suşları ve Üretilmesi.....	13
3.2. YEp-CUP1-GCR1 Plazmitinin Yapısı ve Transformasyonu.....	14
3.3. YEp-CUP1-GCR1 Transformantlarının Farklı Koşullarda Üretilmesi.....	17
3.4. <i>S.cerevisiae</i> 'da Metabolitlerin Ölçümü.....	18
3.5. <i>S.cerevisiae</i> 'da Glukoz Tüketim Hızı ve İkilenme Sürelerinin Ölçümü.....	18
3.6. <i>S.cerevisiae</i> 'da Protein Miktarlarının Tayini.....	20
4. BULGULAR.....	21
4.1. <i>GCR1</i> 'in Gliserol Üretimine Etkileri.....	21
4.2. <i>GCR1</i> 'in Trehaloz ve Glikojen Biyosentezine Etkileri.....	22
4.3. <i>GCR1</i> 'in Etanol Biyosentezine Etkileri.....	24
4.4. <i>GCR1</i> 'in Glukoz Tüketim Hızına Etkileri.....	25
4.5. <i>GCR1</i> 'in <i>S.cerevisiae</i> 'da Protein Sentezine Etkileri.....	27
4.6. <i>GCR1</i> 'in Üreme Hızına Etkileri.....	28
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	30
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	31
EKLER.....	36
Ek 1: Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması.....	36
ÖZGEÇMİŞ.....	39

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
ADH1:	Alkol dehidrojenaz 1geni
ATH:	Asit trehalaz enzimi
ATP:	Adenosin tri fosfat
cAMP:	Halkasal Adenosin Mono Fosfat
BSA:	Sığır serum albumini
CLN:	Cyclin, hücre döngü proteinleri
CUP1:	Copper 1, metallothionin geni
DNA:	Deoksiribonükleik asit
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
GCR1:	Glycolysis Regulation 1 geni
Gcr1p:	Gcr1 proteini
GLC:	Glikojen
GOD-POD:	Glukoz oksidaz-peroksidaz enzimleri
GPD1:	Gliserol 3-fosfat dehidrojenaz geni
GPR:	G-protein bağlı reseptör
GLUT:	Karaciğer tipi glukoz transporteri
HIS:	Histidin
HXK:	Hekzokinaz
LB:	Luria Bertani sıvı besiyeri
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
nmol:	Nanomol
NAD:	Nikotin amid di-nükleotid
NTH:	Nötral trehalaz
OD:	Optical Density, optik yoğunluk
PEG:	Polyetilen glikol
pH:	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PKA:	Protein Kinaz A
RAP:	Represör Aktivatör Protein
RNA:	Ribonükleik asit
<i>S. cerevisiae</i> :	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC- Leu:	Lösin içermeyen sentetik tam üreme ortamı
SGD:	Saccharomyces Genome Database
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
SNF:	Sucrose non-fermenting
TE:	Tris-EDTA
TPS:	Trehaloz fosfat sentaz
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> mayası	2
Şekil 2.2. <i>S. cerevisiae</i> mayasının farklı mayalarla filogenetik ilişkisi.	3
Şekil 2.3. <i>S. cerevisiae</i> 'nin yaşam döngüsü	4
Şekil 2.4. <i>S. cerevisiae</i> 'da haploid ve diploid tomurcuklanma.	5
Şekil 2.5. Glikojen ve trehaloz metabolizmasının şematik gösterimi.	12
Şekil 3.1. YEp-CUP1-GCR1 plazmitinin yapısı	16
Şekil 4.1. Yabanıl tip ve mutant <i>S. cerevisiae</i> suşlarında glukoz tüketim hızlarının karşılaştırmalı analizi.	28
Şekil 4.2. Gcr1p fazla sentezinin yabanıl tip ve mutant <i>S. cerevisiae</i> suşlarında glukoz tüketim hızına etkisi.	29
Şekil 4.3. Araştırmada kullanılan yabanıl tip ve mutant <i>S. cerevisiae</i> suşlarında üreme değerleri	31
Şekil 4.4. Gcr1p fazla sentezinin yaban tip ve mutant <i>S. cerevisiae</i> suşlarında üreme değerlerine etkisi	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. <i>S. cerevisiae</i> 'nin taksonomik sınıflandırması	3
Çizelge 2.2. Trehaloz metabolizması genleri ve kodladıkları enzimler	11
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşları ve özellikleri	15
Çizelge 4.1. Normal (non-transformant) ve CUP1-GCR1 plazmiti ile transform edilen maya suşlarında gliserol konsantrasyonları	23
Çizelge 4.2. Normal (non-transformant) ve CUP1-GCR1 plazmiti ile transform edilen maya suşlarında trehaloz miktarları	24
Çizelge 4.3. Normal (non-transformant) ve CUP1-GCR1 plazmiti ile transform edilen maya suşlarında glikojen miktarları	25
Çizelge 4.4. Normal (non-transformant) ve CUP1-GCR1 plazmiti ile transform edilen maya suşlarında etanol konsantrasyonları	26
Çizelge 4.5. Gcr1p fazla sentezinin <i>S. cerevisiae</i> 'da toplam çözünebilir protein miktarına etkisi	30

1. GİRİŞ

Gcr1p *S. cerevisiae*'da birçok metabolik olayla ilgili genlerin transkripsiyonunu aktive eden ve sitoplazmik miktarı az olan bir transkripsiyon faktörüdür. Gcr1p özellikle glikolitik yolakta yer alan enzim genlerinin aktivasyonu için gereklidir. Glikolitik yolak ise bütün canlılarda korunmuş özellikleri olan ana metabolik yolaktır. Hücredeki birçok metabolit glikolitik yolak ara metabolitlerinden sentezlenir. Bu metabolitlerden bazıları gliserol, etanol ve trehaloz olup önemli ticari değerleri de vardır. Özellikle etanolün fermentasyon ile üretiminde *S. cerevisiae* tercih edilen bir organizmadır.

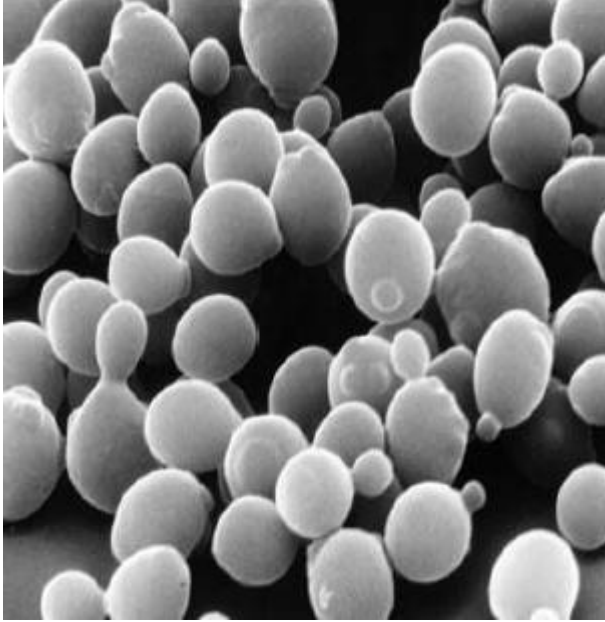
Gcr1p, başta glikolitik yolak enzimlerini kodlayan genler olmak üzere *S. cerevisiae*'da birçok genin transkripsiyonunu kontrol eder. Gcr1p sentezleyemeyen, $\Delta gcr1$ tipi bazı mutant *S. cerevisiae* suşlarında üreme hızında önemli düşüş görülür. *GCR1* geni delesyonunun da bazı *S. cerevisiae* suşlarında ise letal olduğu bilinmektedir. Ayrıca, *gcr1* mutantlarında glikolitik yolak enzimleri normal seviyenin % 1-3'ü kadar sentezlenir ve *gcr1* mutantları glukoz içeren ortamda çok çok yavaş bölünme gösterirler. Gcr1p'nin eksikliği birçok metabolik yolakda yavaşlamaya ve metabolit miktarlarında azalmaya yol açar. *GCR1* mRNA seviyesinin *S. cerevisiae*'da düşük miktarda olduğu da bilinmektedir.

Tezin amacı Gcr1p transkripsiyon faktörünü fazla sentez ettirerek *S. cerevisiae*'da glukoz kullanımına bağlı olarak oluşan metabolit seviyelerindeki değişikliği ve glukoz tüketim hızını incelemektir. Ayrıca Gcr1p'nin hücre döngüsünü de kontrol ettiği bilindiğinden Gcr1p'nin fazla sentezinin üreme hızına etkileri de incelenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

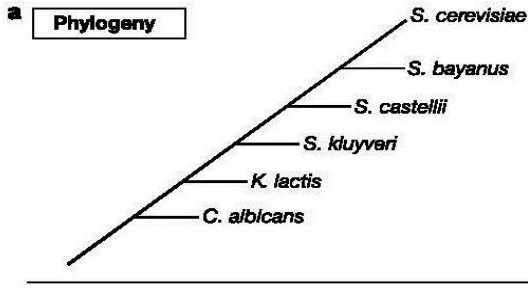
2.1. *S. cerevisiae*'nin Genetik Yapısı ve Biyolojik Özellikleri

Tek hücreli ökaryotik bir maya olan *Saccharomyces cerevisiae*, mantarlar alemi üyesi olan bir mikroorganizmadır (Feldman 2012). Mantarlar aleminin üyesi olmasına karşın, genetik özellikleri bakımından bitkilerden çok hayvanlar alemine daha yakındır.



Şekil 2.1: *S. cerevisiae* mayası (Alberts ve ark. 2007)

Engin bir okyanus olan canlılar dünyası içerisinde birbirleri arasında olan evrimsel bağlantılardan dolayı her bir organizmayı diğer organizmadan ayrı düşünmek imkansızdır. Bu nedenle, *S. cerevisiae*'nin diğer maya türleri ile olan evrimsel bağlantısı önem arz etmektedir. Şekil 2.1'de *S. cerevisiae*'nin farklı maya türleri ile olan filogenetik ilişkisi gösterilmektedir.



Şekil 2.2: *S. cerevisiae* mayasının farklı mayalarla filogenetik ilişkisi (Langkjaer ve ark. 2003).

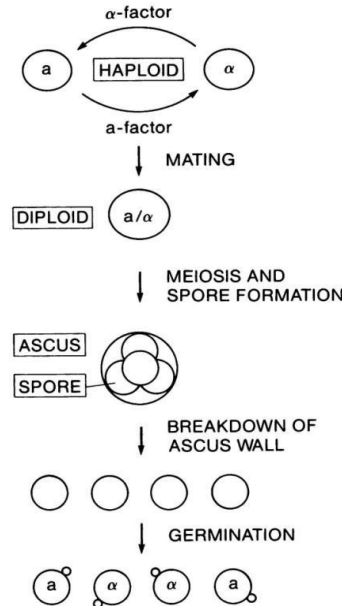
Çizelge 2.1: *S.cerevisiae* mayasının taksonomik sınıflandırması (Hansen,1883).

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

S. cerevisiae'de plazma membranı üzerinde bulunan hücre duvarı temel olarak β -1,3- ve β -1,6- glukanlardan oluşmaktadır (Karp, 2006). *S.cerevisiae* mayası, hücresel aktivitelerini gerçekleştirmek için basit bir ökaryot hücrenin sahip olması gereken membranlı temel organellere sahiptir; kloroplast içermeyen bu maya türü, ER, golgi, peroksizom, vakuol ve özellikle de oksijenli solunum yapmasına olanak sağlayan mitokondriye sahiptir. Bu organellerden vakuol daha gelişmiş canlılarda bulunan lizozomun analogu olup proteinlerin dönüşümünü sağlamakla birlikte bitkilerde yer alan

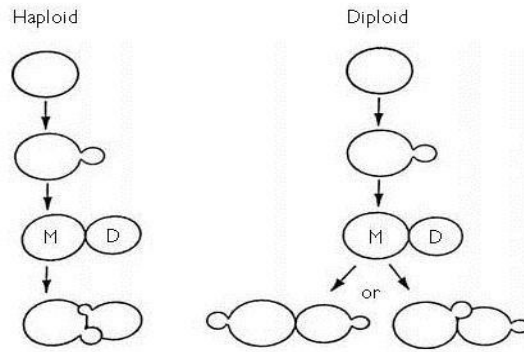
vakuoller gibi depo görevini de üstlenir (Karp, 2006). Ayrıca vakuol, pH ve osmotik düzenleme ile protein degradasyonu ve amino asit depolama işlemlerini de yerine getirir (Bryant ve Stevens, 1998).

S. cerevisiae, haploid ve diploid olmak üzere 2 farklı yaşam döngüsüne sahiptir. Haploid evrede mitoz bölünme ile çoğalırken, diploid evrede uygun şartlar oluştuğunda mayoz bölünme geçirebilmektedir. Diploid maya hücreleri de mitoz bölünme ile çoğalırlar fakat üreme ortamı koşulları yetersiz olduğunda mayoz bölünme geçirerek spor oluştururlar. Haploid sayıda kromozom içeren maya hücrelerinden biri 'a' feromonu, diğeri ise ' α ' feromonu salgılar ve iki farklı hücre birleşerek diploid bir hücre meydana getirirler. Spor oluşumunu sağlamak için hücrelerin üreme ortamında karbon ve azot kaynağının çok kısıtlı olması gerekir. Karbon kaynağı olarak glukoz yerine asetat bulunması diploid *S. cerevisiae* hücrelerinin hızlı bir şekilde spor oluşturmasını sağlar (Dickinson, 2004). Spor oluşumunu MATa/MATa, MAT α /MAT α diploidleri gerçekleştiremez (Dickinson, 2004). Diploid evrenin yaşanması, maya hücrelerine farklı genoma sahip bireylerin oluşumunu sağlayarak evrimsel açıdan avantaj sağlar. Diğer taraftan diploid ile haploid hücrelerin tomurcuklanmaları da farklılık gösterir.



Şekil 2.3: *S. cerevisiae*'nin yaşam döngüsü (Herskowitz, 1988)

Uygun üreme ortamı şartları sağlanırsa bir haploid maya hücresi 100 dakikada bir mitoz bölünme geçirerek çoğalır. *S. cerevisiae* üreme hızı maya suşuna ve ortam koşullarına oldukça bağlıdır. Hızlı çoğalma özelliği ve önceden bahsedilen diğer özellikleri de biraraya geldiğinde *S. cerevisiae* mayasını genetik, biyokimyasal, metabolik araştırmalar için uygun bir organizma olur.



Şekil 2.4: *S. cerevisiae*' de haploid ve diploid tomurcuklanma (Dickinson, 2004)

Saccharomyces cerevisiae genomu 16 kromozom içermekte olup yaklaşık olarak 13.392 kb büyüklüğüne sahiptir (Madigan, 2010). Tüm genomunun sekanslanmış olması çeşitli hücresel işlemler üzerinde çalışmaya büyük bir olanak sağlamaktadır. Değişen koşullar altında spesifik bir genin yanıtı kolaylıkla çalışılabilir (Alberts, 2007). *S.cerevisiae* uygun şartlar altında dış ortamdan DNA fragmentlerini hücre içine alıp kromozomlarına entegre edebilir. *S. cerevisiae*'da letal olmayan genlerin mutantlarının fenotipik ve metabolik etkilerini incelemek de kolaydır (Feldman 2012). *S. cerevisiae*'nın genetik modifikasyonları için klonlama vektörleri de çok çeşitlidir. İstenildiğinde klonlanacak genleri tek kopya ve çok kopyalı olarak ekpres etmek için kromozom dışı stabil vektörleri vardır. Bu klonlama vektörleri; YEp (Yeast Episomal Plasmid) çok kopyalı olarak bulunurken, YCP (Yeast Centromer Plasmid) tek kopya olarak bulunur. Ayrıca klonlanan genlerin kromozomal integrasyonu için tasarlanmış, replikasyon orijini içermeyen fakat seçilebilir marker gen içeren integrasyon vektörleri de vardır. Bu plazmitler de Yeast Integration plasmids (YIp) olarak bilinir. Çok büyük DNA parçalarını klonlamak için de yapay kromozomlar olarak adlandırılan, yapılarında

sentromer, replikasyon orijini ve telomer yapıları bulunan YAC (Yeast Artificial Chromosomes) vektörleri bulunur (Feldman 2012). *S. cerevisiae*'da heterolog olarak üretilen proteinlerde bazı post translasyonel modifikasyonlar da yapılmaktadır (Feldman 2012) *S.cerevisiae*'da protein kodlayan gen sayısı yaklaşık olarak 6.000'dir. Maya hücresinde proteinlerin üç boyutlu yapılarını saptamak kolay bir iş olmadığından proteinlerin sınıflandırılması ve fonksiyon analizi genellikle proteinler arasındaki homoloji kullanılarak yapılır (Lodish, 2004).

S. cerevisiae, biyolojik çalışmalarda model organizma olarak fazlasıyla tercih edilmektedir. Model organizma olarak seçilmesinin başlıca nedeni uygun şartlar altında laboratuvarında hızlı ve kolay üretilmesi, genetik yapısında değişiklik yapılmasının kolay olması, mutant izolasyonunun kolay olması, haploid ve diploid hücre tiplerinin olmasıdır (Feldman 2012). *S. cerevisiae* mayası bu özellikleri sayesinde; hücre döngüsü, protein salınımı, membran oluşumu, hücre iskeletinin işlevi, hücre farklılaşması, yaşlanma, genlerin fonksiyonu ve kromozom yapısı gibi birçok bilinmeyen aydınlatılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Lodish ve ark. 2004).

2.2. *S.cerevisiae*'nin Endüstriyel Önemi

S.cerevisiae başta gıda olmak üzere, çeşitli sektörlerde farklı amaçlar için yaygın kullanım alanına sahiptir. Başlıca nedenlerinden biri bu maya türünün patojenik özellik taşıması ve GRAS (Genellikle Güvenli Olarak Değerlendirilir) kategorisinde yer almasıdır. Ayrıca *S. cerevisiae* mayasının pH değişimlerini tolere edebilmesi ve 40 °C'ye kadar sıcaklıkta büyümesi, bu maya türünü endüstri için cazip kılmaktadır (Rudolf ve ark. 2009).

S.cerevisiae şarap, ekmek gibi ürünlerin üretiminde başlıca organizma olmasının yanı sıra, biyolojik açıdan model organizma olarak kullanımı onun ilaç endüstrisinde yeni ilaçların keşfinde; özellikle rekombinant protein üretiminde önem arz eden bir organizma haline getirmektedir (Porro ve ark. 2011). Aynı zamanda azalan fosil kaynaklarına alternatif olabilecek biyoyakıt üretimi ile enerji sektöründe, genetik olarak modifiye edilen mayaların biyoremediasyon işlemi ile bozulan ekolojik ortamın yeniden kazanımı ile çevre endüstrisinde ve diğer birçok sektörde önemli bir yere getirmektedir.

S. cereveisiae farmasötik alanda da hem üretim hem de araştırma amaçlı kullanılır. Biyofarmasötikler olarak bilinen peptid yapılı bileşikler, enzim, hormon veya aşı amaçlı antijenik bileşikler olarak *S. cerevisiae*'da üretilmektedir (Mattanovich ve ark. 2012). 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).

Tüm bu özellikleri dolayısıyla *S. cerevisiae* 21. yüzyılın en önemli deneysel organizması olarak da adlandırılmıştır (Botstein ve Fink 2011).

2.3. *S.cerevisiae*'da Glukoz Transportu ve Sinyal İletimi

Glukoz *S. cerevisiae* mayası için öncelikli tercih edilen karbon kaynağı olmakla birlikte, birçok farklı prosesin ve sinyal iletim yolağının başlamasına neden olan bir sinyal molekülü olarak da görev yapar. Maya hücresinin bulunduğu besiyeri ortamındaki karbon kaynağı olarak belirli miktarlarda glukoz bulunması bazı genlerin ekspresyonlarının aktive olmasına ya da baskılanmasına neden olur. Ortamda fazla glukoz bulunduğunda galaktoz, sukroz, etanol vb. gibi farklı karbon kaynaklarının kullanımı için gerekli olan genler baskılanır (Gancedo 1998) ve farklı enzim ve transporterlar inaktif konuma geçer (Gancedo 1997). Öte yandan glukozun çeşitli genlerin transkripsiyonunu indüklediği de daha önce rapor edilmiştir (Belinchon ve Gancedo 2007). Laktat ve gliserol gibi fermente edilemeyen karbon kaynaklarında kulture edilen *S.cerevisiae* kültürlerine glukoz eklendiğinde genlerin %30'luk kısmının anlatımında değişim olduğu belirtilmiştir (Wang ve ark. 2011). Mayanın kültür ortamına bu şekilde glukoz eklenmesi ile bazı metabolik olaylar yeniden programlanarak üreme hızı artar ve maya hücreleri fermentatif şekilde üremeye başlar (Feldman 2012).

S. cerevisiae'da glukozla bağlı sinyal iletiminde görev alan en önemli sinyal faktörleri hücre zarında bulunan ve ortamdaki farklı miktarlardaki glukozu algılayıp aktive yada inaktive olan sensorlerdir. Snf3p (Sucrose non-fermenting) ve Rgt2p (Restoration of

glucose transport) sensör çifti bunlardan ikisidir. Rgt2p kültür ortamında yüksek glukoz (%1'den daha fazla) olduğu zaman aktive olur. Snf3p ise düşük glukoz (%0.1) ile aktive olan membran glukoz sensörüdür (Özcan ve ark. 1998). Bu sensörler Rgt1p transkripsiyon faktörünü aktive ederek glukoz miktarlarına göre hedef genlerin regülasyonunu sağlar.

S. cerevisiae'da glukoz sinyal iletiminde diğer bir sensor sistemi cAMP'ye bağımlı olan Protein Kinaz-A (PKA) yolağıdır. Hücrezarında bulunan Gpr1p sinyal sensörü ile aktivasyonu gerçekleştirilir (Santangelo 2006). Yüksek glikoz miktarı varlığında bu sinyal sensörü sitoplazmada gerçekleştirilen cAMP sentezini aktive edip, sentezlenen cAMP PKA'yi aktive eder. Aktive olan PKA enzim, transkripsiyon faktörleri ve yapısal proteinlerin fosforlanarak glukoz sinyaline hücresel yanıt oluşturmasını sağlar (Santangelo 2006, Gancedo 1998, 2008).

S. cerevisiae'daki özellikle glukoz sinyaline bağılı birçok metabolik olay protein kinaz olan Snf1p ile kontrol edilir (Hardie, 2007). Düşük glukoz sinyali ile aktif konuma geçen Snf1p kompleksi yüksek glukoz sinyalinde inaktif olmaktadır. Aktif durumdaki Snf1p kompleksi repressor protein olan Mig1p'yi fosforlayarak inaktif konuma, Snf1p'nin inaktif olması durumunda ise Mig1p proteinini aktif konuma geçirir. Aktif olan Mig1p alternatif karbon kaynaklarının kullanımı ile ilgili enzim ve yapısal proteinlerin kodlandığı genlerin transkripsiyonunu baskılar ki bu olay *S.cerevisiae*'de glukoz baskılaması (Glucose repression) olarak adlandırılır (Ronne 1995, Gancedo 1998). Mig1p'nin inaktif olması durumunda yani düşük glukoz ve alternatif karbon kaynakları kullanıldığında ise bu genlerin transkripsiyonu gerçekleşir. Mayadaki bu durum da glukoz derepresyon olarak adlandırılmaktadır. *S.cerevisiae*'de birçok genin transkripsiyonu glukoz baskılaması ve derepresyonu ile kontrol edilir.

S.cerevisiae'de kolaylaştırılmış difüzyon mekanizması ile hücre içerisine alınan serbest glukozun transportu hücre membranında bulunan ve *HXT* genleri tarafından kodlanan heksos taşıyıcı proteinler (hexose transporters) aracılığı ile sağlanır. *HXT* genlerinin transkripsiyonu ise kültür ortamı koşulları ve aşamaları, glukoz konsantrasyonuna göre kontrol edilmektedir. Bununla birlikte insanda karaciğere glukoz girişini sağlayan membran proteinleri (GLUT) ile Hxt proteinleri arasında yüksek derecede homoloji olduğu rapor edilmiştir (Boles ve Hollenberg 1997).

2.4. *S.cerevisiae*'da Gcr1p'nin Önemi

S.cerevisiae'da glukoz kullanımında rol alan esas metabolik yol glikolitik iz yoludur. Glikolizde görev alan bazı enzimlerin aktiviteleri metabolit seviyelerine göre kontrol edilirken bu metabolik yolun asıl kontrolü yolakta rol alan enzim genlerinin transkripsiyonel kontrolü ile genetik seviyede sağlanır. Glikolitik yolaktaki enzim genlerinin transkripsiyonunu aktive eden en önemli transkripsiyon faktörünün Gcr1p (glycolysis regulatory protein-1) olduğu daha önce rapor edilmiştir (Lopez ve Baker, 2000). Yaban tip *S.cerevisiae* ile *GCR1* mutant suşu glikolitik enzim seviyeleri bakımından karşılaştırıldığında *GCR1* mutantlarının enzim seviyelerinde % 97-99 arasında bir düşüş olduğu belirlenmiştir (Clifton ve Fraenkel, 1981). DNA'ya bağlanan bir transkripsiyon faktörü olan Gcr1p glukoz içeren kültür ortamlarında oto regülasyon ile kendi transkripsiyonunu da belirli düzeyde aktive eder. Gcr1p bazı genlerin transkripsiyonel aktivasyonu için Rap1p ve Gcr2p ile birlikte bulunmaktadır (Sasaki ve ark. 2005, Sasaki ve Uemura 2005). Rap1p *S. cerevisiae*'da bol miktarda bulunan ve çok fonksiyonlu bir transkripsiyon faktörüdür. *RAP1* geni *S.cerevisiae* için esansiyel bir gen olup delesyonu letaldir. *GCR2* geni delesyonunda ise *S.cerevisiae* hücreleri normal fenotip gösterirler.

Gcr1p bazı siklin genlerinin (CLN) transkripsiyonunu da aktive ederek glukoz miktarlarına göre hücre döngüsünü de kontrol etmektedir (Willis ve ark. 2003). *S.cerevisiae*'da bölünme süresi (üreme hızı) özellikle G1 aşamasında kontrol edilir. G1 aşaması da G1 siklinleri tarafından protein sentez hızı (critical rate of protein synthesis) göre kontrol edilmektedir (Willis ve ark. 2003, Popolo ve ark. 1982). Yaban tip *S.cerevisiae* suslarının glukoz içeren ortamda üreme hızları ortalama 90-100 dakika iken, *GCR1* mutantlarının üreme hızlarının çok düşük olduğu yaklaşık 780 dakika olduğu belirlenmiştir (Lopez ve Baker 2000). Gcr1p'nin hücreye glukoz taşımını (glukoz transportu) için de gerekli olduğu gcr1 mutanı ve yaban tip *S. cerevisiae* suşları kullanılarak gösterilmiştir (Bisson 1999). Gcr1p'nin direkt olarak bazı *HXT* genleri transkripsiyonu kontrol ettiği de bilinmektedir (Türkel ve Bisson 1999). *GCR1*'in trehaloz ve glikojen metabolizması için de gerekli olduğu yaban tip ve gcr1 mutanı *S.*

cerevisiae suşlarının karşılaştırmalı analizi ile belirlenmiştir (Türkel 2002). *HXT1* ve *HXT7* genlerinin *S.cerevisiae*'da fazla ekspresyonu ile de hücreye glukoz girişinde artış olduğu saptanmıştır.

2. 5. *S.cerevisiae*'da Gliserol, Trehaloz ve Glikojen Metabolizması ve Önemi

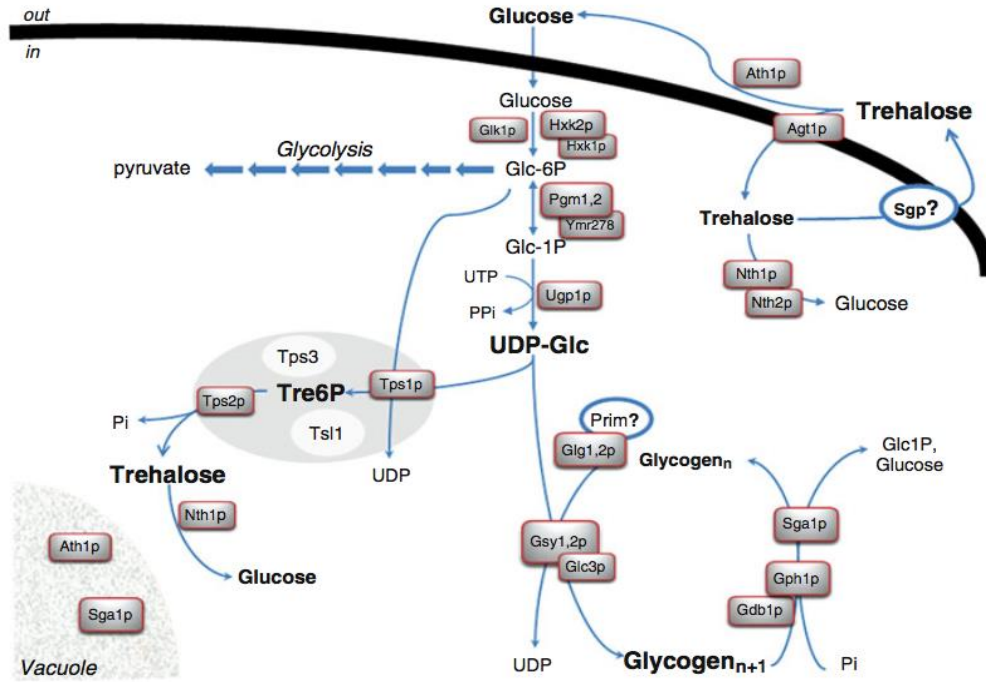
S.cerevisiae'da glukozun trehaloz ve glikojen olmak üzere iki farklı depo şekli mevcut olup değişen ortam şartlarına göre hücre içerisindeki glikojen ve trehaloz miktarları büyük değişkenlik gösterir. Trehaloz α (1,1) bağı ile bağlı iki glukoz molekülünden oluşan indirgenemeyen bir disakarittir. Maya, bakteri, bitki, böcek ve omurgasız hayvan hücrelerinde bulunup genellikle stres metaboliti olarak depo edilmektedir (François ve Parrou 2001). Trehaloz ve glikojen metabolizması kompleks düzenleyici sistemlerle kontrol edilir (Şekil 1.5). Trehaloz metabolizması trehaloz sentaz, nötral trehalazlar ve asit trehalaz olmak üzere 3 farklı enzim sistemi tarafından katalizlenir (Tablo 1.2) nötral trehalazlar (Nth1p ve Nth2) trehalozun yıkımında görev alıp *NTH* geni tarafından kodlanırlar. Asit trehalaz enzimi de trehaloz yıkımında görev alıp *ATH* geni tarafından kodlanır ve vakaouler trehalaz olup sürekli üretilir.

Trehaloz glukoz 6-fosfat ve UDP-glukozdan iki kademedede trehaloz sentaz enzim kompleksi tarafından sentezlenir. Trehaloz normal üreme koşullarında bazal miktarda sentezlenirken, açlık ve stres koşullarında, durağan fazda biyosentezi ve hücre içimiktarı çok artmaktadır (François ve Parrou 2001). Trehaloz biyosentez yolunda ara metabolit olan trehaloz 6-fosfat ise heksokinazların inhibitörüdür (Blazquez ve ark. 1993). Trehaloz sentaz enzim kompleksi Tps1p, Tps2p, Tsl1p ve Tps3p olmak üzere 4 farklı alt birimden oluşur. *TPS1* geni delesyonlu olan bazı maya suşları glukoz içeren ortamda üremez (Hohmann ve ark. 1993). *TPS1* geni delesyona uğrayan *S. cerevisiae* suşlarında trehaloz 6-fosfat inhibisyonu olmadığından hücreye çok fazla glukoz girişi olmaktadır. Alınan glukoz da hücre içinde ATP kullanılarak glukoz 6-fosfata dönüşür. Bu durumda hücrede ATP ve/veya fosfat azaldığından *S.cerevisiae* 'da glukoz toksisitesinin ortaya çıktığı öne sürülmüştür (Thevelein ve Hohmann 1995).

Çizelge 2.2: Trehaloz metabolizması genleri ve kodladıkları enzimler.

GEN	ÜRÜNÜ	FONKSİYONU
<i>TPS1</i>	Trehaloz-6-P sentaz	Trehaloz sentezi
<i>TPS2 (TPP)</i>	Trehaloz-6-P fosfotaz	Trehaloz-6-P defosforilasyonu
<i>TSL1 ve TPS3</i>	Düzenleyici alt birimler	TPS kompleksinin stabilitesi
<i>NTH1</i>	Nötral, sitosolik trehalaz	Trehaloz yıkımı
<i>ATH1</i>	Asidik, vakuolar trehalaz	Trehaloz yıkımı

Glikojen dallanmış bir yapıya sahip bir polisakkarit olup, glukoz moleküllerinin $\alpha(1,4)$ bağı ile lineer zincir, lineer zincire glukoz moleküllerinin $\alpha(1,6)$ bağı ile bağlanması sonucu bu dallanma yapısı oluşur. Trehaloz metabolizmasında olduğu gibi ağır stres şartlarına karşı tolerans gösterme özelliğine sahip bir depo polisakkaritidir. *S.cerevisiae*'da glikojen logaritmik fazın sonuna doğru sentezlenmeye başlar. Hücre içerisine alınan glukoz hekzokinaz ve glukokinazlar ile glukoz 6-fosfata dönüşür. Glukoz 6-P fosfoglukomutaz enziminin katalizlediği reaksiyonla glukoz 1-fosfata dönüşür. Glc 1-P molekülü UDP-glukoz pirofosforilaz enzimi (Ugp1p) aracılığıyla UDP-glukoza dönüştürülüp bu molekülden glikojen sentezi başlama, uzama ve dallanma olmak üzere 3 kademede gerçekleşir. Glikojen sentezinin metabolik olarak düzenlenmesi glukoz 6-fosfat tarafından glikojen sentazın allosterik kontrolü ve geri dönüşümlü olarak fosforilasyonu ile sağlandığı rapor edilmiştir. Diğer bir regülasyon da Pho85 proteini ile yapılmakta olup bu protein glikojen sentazı fosforlayıp inaktive eder. Glc7p, Gac1p ve Pig1p kompleksinin defosforilasyonu ile de aktif hale geldiği belirtilmiştir.



Sekil 2. 5:Glikojen ve trehaloz metabolizmasının şematik gösterimi (Francois ve ark. 2012)

Glikojenin yıkımından ise *GPH1* ve *GDB1* genleri tarafından sentezlenen glikojen fosforilaz (*Gph1p*) ve glikojen debranching (*Gdb1p*) enzimleri sorumludur. *Gph1p* $\alpha(1,4)$ bağlarını kırarak glikojenin glukoz 1-fosfata, *Gdb1p* enzimi ise $\alpha(1,6)$ bağlarını hidroliz ederek glikojenin glukozu yıkılmasını sağlar.

Gliserol, *S.cerevisiae*'da sürekli olarak bazal miktarda sentezlenen dihidroksi aseton fosfattan başlanılarak sentezlenen bir metabolittir. Bu metabolik yoldaki ilk enzim olan gliserol 3-fosfat dehidrojenaz *GPD1* geni tarafından kodlanmaktadır. *Gpd1p* enzimi dihidroksi aseton fosfatın gliserol 3-fosfata dönüşümünü katalizler (Albertyn ve ark. 1994). Gliserol sentezi *S.cerevisiae*'da ozmotik stres altında daha fazla aktive edilir. Gliserol, *S. cerevisiae*'da ozmotik stres koşulları altında ozmo koruyucu olarak kullanılır. Yüksek miktarda tuz (1-1.4M NaCl), sorbitol (1M) veya sukroz (%10 veya daha yüksek oranda) varlığında gliserol biyosentezi aktive edilmekte ve hücre içerisinde gliserol birikmektedir (Posas ve ark. 2000, Hohmann 2002). Ozmotik stres koşullarında

gliserolun hücre dışına taşınımı da durdurulmaktadır (Hohman ve ark 1993). *S.cerevisiae*'da NAD^+ bağımlı gliserol 3-fosfat dehidrojenazın kodlandığı diğer gen ise *GPD2*'dir, fakat *GPD2* geni sadece anoksik (aneorobik) şartlarda aktive edilir ve gliserol biyosentezine katkıda bulunur (Ansell ve ark. 1997). Normal koşullarda ve ozmotik stres altında gliserol biyosentezi sadece *GPD1* geninden kodlanan NAD^+ bağımlı gliserol 3-fosfat dehidrojenaz tarafından gerçekleştirilmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3. 1. Araştırmada Kullanılan *S. cerevisiae* Suşları ve Üretilmesi

Yapılan tez çalışmasında kullanılan YST124 (yaban tip), YST311 ($\Delta tps1$), YST316 ($\Delta gpd1$), YST317 ($\Delta adh1$) ve YST318 ($\Delta adh2$) suşları Frankfurt Üniversitesi Mikrobiyoloji Enstitüsü'ndeki EUROSCARF *S.cerevisiae* koleksiyonundan temin edilip kullanıldı. *S.cerevisiae* YST124 suşu genomu tümüyle sekanslanmış olup bu araştırma için herhangi bir mutasyon içermeyen yaban tip standart sus olarak kullanıldı. Diğer suslar ise YST124 suşu ile izogenik sus olup bu sustan sırasıyla *TPS1*, *GPDI*, *ADH1* ve *ADH2* genlerinin delesyonu ile elde edilen mutant suslar olarak kullanıldı. *S. cerevisiae* $\Delta tps1$, $\Delta gpd1$, $\Delta adh1$ ve $\Delta adh2$ mutant suşları bu çalışmada toplu olarak metabolik mutant suşlar olarak adlandırılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan suslar ve genotipleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

S. cerevisia suşlarının tamamı 2 ml'lik YPD besiyeri içeren tüplerde canlı olarak EUROSCARF'tan temin edildi. Bu suslar YPD petrilere çizgi ekimler yapılarak çoğaltıldı. Uzun vadede kullanılmak üzere, bu petrilere steril çubuklar yardımıyla 1 ml %20 gliserol içeren tüplere aktarılarak stoklar hazırlanıp -70 °C'ye kaldırıldı. Kısa süreli kullanımlar için ise *S.cerevisiae* içeren bu YPD petrilere +4 °C'de buzdolabında muhafaza edildi. Transformant maya hücrelerini üretmek için seçici ortam olarak Sc-Leu + %2 glukoz (lösin içermeyen minimal sentetik üreme ortamı) üreme ortamı kullanıldı. Transformant olmayan *S. cerevisiae* suşlarını minimal ortamda üretebilmek için de Sc-Leu +%2 glukoz üreme ortamına son konsantrasyonu 30 mg/L olacak şekilde steril lösin ilave edildi. *GCR1* fazla sentezinin *S. cerevisiae* transformantlarında üremeye olumsuz etkisi belirlendi. Bundan dolayı YEp-CUP1-GCR1 transformantı mayaların üreme ortamına tezin tartışma bölümünde açıklanan nedenden dolayı bakır iyonları ilave edilmedi.

Tez çalışmasında kullanılan besiyerleri ve içerikleri Ek-1'de detaylı olarak verildi.

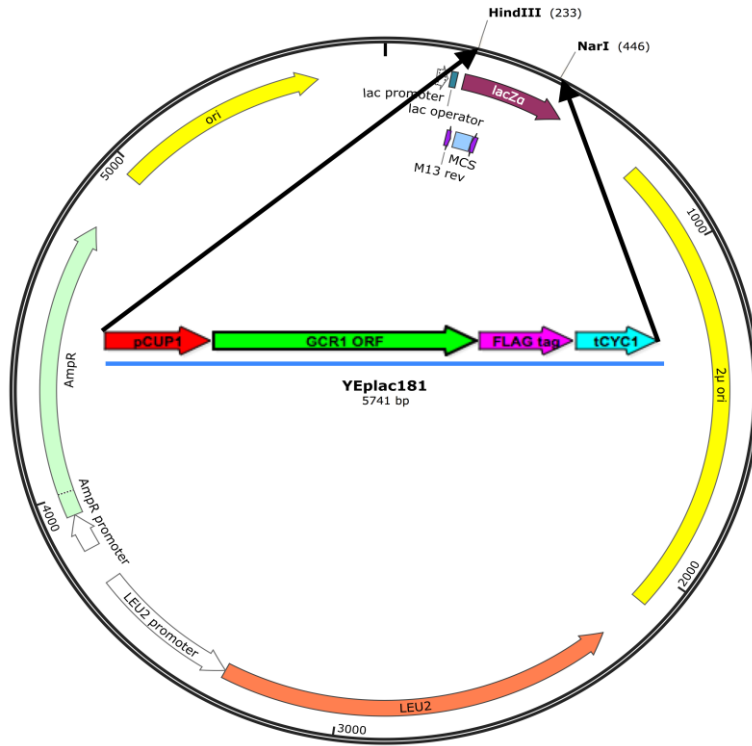
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan *S. cerevisiae* suşları ve özellikleri.

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)
Y03265	YST311	MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YBR126c::kanMX4 (Δ tps1 mutanı)
Y03718	YST316	MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YDL022w::kanMX4 (Δ gpd1 mutanı)
Y06236	YST317	MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YOL086c::kanMX4 (Δ adh1 mutanı)
Y00891	YST318	MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YMR303c::kanMX4 (Δ adh2 mutanı)

3. 2. YEp-CUP1-GCR1 Plazmitinin Yapısı ve Transformasyonu

Araştırmamızda kullanılan YEp-CUP1-GCR1 plazmiti daha önceki araştırmalarda hazırlanmıştır (Türkel ve Bisson 1999). Plazmid içerisinde bulunan 2532 bp'lik *GCR1* kodlama bölgesi tüm *GCR1* klonunu içeren pHB66 plazmidinden polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmıştır (Baker 1991). Kesilen bu fragment daha önceki çalışmalarda elde edilen ve BglII ve KpnI restriksiyon enzimleri ile kesilen ve 2 μ M LEU2 tabanlı pJD439 plazmidine ligasyonu yapılarak elde edilmiştir (Dohmen 1995). Bu plasmidden *GCR1* transkripsiyonu sürekli olarak aktif olan *CUP1* promotörü kontrolü altında gerçekleşir (Mascorro-Gallardo 1996, Hottiger 1995). Transkripsiyon faktörü Gcr1p'nin fazla üretimini yapan plazmid vektörü 2 μ M-LEU2 temelli bir mekik

tipi vektördür. Plazmid aynı zamanda *E. Coli*'de replikasyon ve seleksiyon için ColE1 replikasyon orijini ve Ampisilin direnç geni olan β -laktamaz (*bla*) geni, *S.cerevisiae*'da çoğaltım ve stabilite için ise 2 mikron replikasyon orijini ve seçici markör olarak da *LEU2* geni içerir (Türkel and Bisson 1999). *LEU2* markörü dolayısıyla bu plazmitin transforme edileceği *S.cerevisiae* suslari $\Delta leu2$ mutant suşları olmak zorundadır ve tez araştırmamızda kullanılacak olan suslar da $\Delta leu2$ mutasyonlu suslardır.



Şekil 3.1: YEplac181-GCR1 plazmitinin yapısı (SnapGene programı ile elde edildi)

Tez çalışmamızda kullandığımız bu plazmiti çoğaltmak için plazmitler öncelikle *E. Coli* DH5 α hücrelerine kalsiyum- magnezyum metodu ile transforme edildi (Ausubel ve ark. 1993). Ampisilin içeren LB petrilere ekilen *E. coli* hücrelerinden izole olanları seçilerek 5 ml'lik Ampisilinli LB sıvı besi yerlerine ekilerek 18 saat 37 °C'de yaklaşık olarak 150 dönüş/dakika hız ile çalkalamalı inkubatorde tekrar üretildi. Daha sonra elde edilen YEp-CUP1-GCR1 plazmidini içeren transformant *E. Coli* hücreleri ticari olarak satılan plazmid saflaştırma kiti kullanılarak üretici firma tarafından belirtildiği şekilde saflaştırılıp 100 μ l 1X TE solüsyonunda -20 °C'de muhafaza edildi.

Yaban tip ve mutant *S. cerevisiae* suslarına daha önce tanımlanan lityum asetat-poli etilen glikol (PEG) yöntemi kullanılarak pCUP1-GCR1 plazmidi transforme edildi (Rose ve ark. 1990). 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 vortexlendikten 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 μ l 0.1 M lityum asetat eklenerek hücreler ile tekrar bir süspansiyon oluşturuldu. Bu süspansiyondan 50 μ l 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 μ g denatüre edilmiş herring sperm DNA'sı, 4-5 μ g plazmid DNA'sı, 36 μ l 1 M lityum asetat, 240 μ l PEG ve 60 μ l 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 süspansiyonunda 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.

3. 3. YEp-CUP1-GCR1 Transformantlarının Farklı Koşullarda Üretilmesi

S. cerevisiae suşları rutin kullanımlar için %1 yeast extract, %2 pepton, %2 agar ve %2 glukoz içeren YPD petrilere 4 °C'de depo edildi. pCUP1-GCR1 plazmitini *S.cerevisiae* suşlarına transform etmek için maya suşları standart koşullarda 30 °C 140 dönüş/dakika çalkalamalı etüvde önce 5 ml YPD besiyerinde bir gece üretilerek ön kültürler elde edildi. Bu ön kültürler kullanılarak 25 ml taze YPD sıvı ortamına 1 ml maya kültürü aşılansak standart şartlarda 4 saat üretilerek logaritmik fazda *S.cerevisiae* kültürleri elde edildi.

S. cerevisiae'ya pCUP1-GCR1 plazmiti transformasyonu lityum asetat-polietilen glikol yöntemi ile yapıldı (Gietz ve Schiestl 1995). Transformant maya suşları lösin içermeyen sentetik tam besiyerinde (Sc-leu, Synthetic Complete minus Leucine) üretildi. pCUP1-GCR1 transformantı koloniler belirli büyüklüğe ulaştığında steril kurdan ile Sc-leu petrilere yayma ekimi ile pasajlandı ve 30 °C'de 3-4 gün inkube edilerek üremeleri sağlandı.

3. 4. *S.cerevisiae*'da Üreme Değerlerinin ve Glukoz Tüketim Hızlarının Tayini

Transformant *S.cerevisiae* suşları 5 ml Sc-leu %2 glukoz besiyerinde üretilerek gecelik ön kültürler hazırlandı. Bu ön kültürler kullanılarak ve ikişerli olarak 25 ml'lik taze Sc-leu %2 besiyerine başlangıç OD₆₀₀ değeri 0.2 olacak şekilde ekim yapıldı. Bu şekilde hazırlanan maya kültürleri standart şartlarda üreme ortamına alınarak 90 dakikada bir

100 µl örnek alındı ve OD₆₀₀ değerleri belirlendi. Alınan örneklerin OD₆₀₀ değerleri zamana karşı grafiğe aktarılarak üreme eğrileri hazırlandı.

S. cerevisiae pCUP1-GCR1 transformantı ve non-transformant *S. cerevisiae* suşlarında glukoz tüketim hızlarını tayin etmek için araştırmada kullanılan maya suşları 15 ml Sc üreme ortamında logaritmik faza kadara üretildi. *S. cerevisiae* CUP1-GCR1 transformantı maya hücrelerinin üretiminde Sc-leu +%2 glukoz ortamı kullanıldı. Non-transformant maya suşları ise lösün amino asiti de içeren Sc üreme ortamında üretildi. Glukoz tüketim hızlarının maya hücrelerinin yoğunluk farkından kaynaklanmaması için üretilen maya hücrelerinden eşit miktarda hücre çöktürüldü. Bunu sağlamak için bu aşamada maya hücrelerinin OD₆₀₀ değerleri tayin edildi ve bütün maya suşlarından aynı miktarda maya hücresi alınarak çöktürüldü (OD₆₀₀: 15). Bu aşamada hücreler çöktürülerek 15 ml distile steril su ile yıkandı ve tekrar çöktürüldü. Maya hücreleri 15 ml Sc üreme ortamında süspanse edilerek son konsantrasyonu %1 olacak şekilde steril glukoz ilave edildi. Üreme ortamındaki glukoz konsantrasyonlarında azalmayı (glukoz tüketim hızı) tayin edebilmek için zaman aralıklı olarak 100 µl örnek alındı. Alınan maya örnekleri mikrofüjde santrifuj edilerek çöktürüldü ve sıvı fazdan 10 µl örnek alınarak 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. Glukoz konsantrasyonundaki değişim zaman aralıklı olarak grafiğe aktarıldı.

3. 5. *S.cerevisiae*'da Metabolitlerin Ölçümü

pCUP1-GCR1 transformantı ve non transformant olan *S.cerevisiae* suşlarında trehaloz miktarlarını tayin etmek için yukarıda açıklandığı şekilde on kültürler hazırlandı. Ön kültürlerden 25 ml'lik taze Sc-leu %2 glukoz ortamına başlangıçtaki hücre yoğunluğu OD₆₀₀: 0.2 olacak şekilde ikişerli olarak ekimler yapıldı. *S.cerevisiae* kültürleri standart koşullarda durağan faza kadar üretildi (24 saat, OD₆₀₀: 8-9).

Trehaloz ve glikojen miktarının belirlenmesinde trehalaz ve α -amiloglukosidaz yöntemi uygulandı (Parrou ve Francois 1997). Bu yöntemde göre, durağan fazda olan maya hücreleri çöktürüldü, 15 ml'lik soğuk steril saf su ile yıkandı ve tekrar çöktürülerek darası önceden belirlenen mikrofüj tüplerine aktararak maya hücrelerinin yaş ağırlıkları belirlendi. Yaş ağırlıkları tayin edilen maya örnekleri 0.25 ml Na_2CO_3 'de suspanse edildi ve 95 °C'de 2 saat kaynatıldı. Örneklerin soğumasından sonra örneklere 150 μl 1 M asetik asit ve 600 μl 0,2 M sodyum asetat eklenerek pH'larının 5.2 ve toplam hacimlerinin de 1 ml olması sağlandı. Daha sonra 500 μl 'lik iki kısma ayrılan örneklerden birine 3 mili unite trehalaz (Sigma, T8778) ilave edilip 37 °C'de 18 saat bekletildi. Diğer 500 μl 'lik kısmına da 100 μg alfa amiloglukosidaz (Sigma, A7420) eklenerek 55 °C'de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon periodları sonunda trehalzo ve glikojenin enzimatik hidrolizi ile açığa çıkan glukoz miktarları GOD-POD glukoz tayin kiti ve spektrofotometrik yöntem kullanılarak tayin edildi. Trehaloz ve glikojen miktarları μg glukoz/ mg yaş ağırlık olarak hesaplandı (Parrou ve Francois 1997).

Transformant ve non-transformant maya hücrelerinde sitoplazmik gliserol miktarı da hem normal koşullarda üretilen ve hem de ozmotik stres uygulanmış mayalarda belirlendi. Bunun için maya suşları 25 ml Sc üreme ortamında yukarıda açıklandığı şekilde üretildi. Üreme süreleri sonunda maya kültürlerinin OD_{600} değerleri belirlendi ve hücreler standart şartlarda santrifüjde çöktürüldü, yaş ağırlıkları da tayin edildi. Çöktürülen maya hücreleri 1 ml steril saf suda suspanse edildi ve 10 dakika süre ile 95 C'de kaynatıldı. Kaynatılan örnekler oda sıcaklığına kadar soğutulup mikrosantrifüjde 1 dakika 15000 rpm de santrifüj edilerek hücre parçalarının çökmesi sağlandı. Sıvı fazdan 100 μl örnek alınıp gliserol miktarları üretici firma tarafından açıklandığı şekilde gliserol tayin kiti (Megazyme K-GCROLGK) ile ölçüldü. Gliserol miktarları μg gliserol/ mg yaş ağırlık olarak verildi (Albertyn ve ark. 1994).

Araştırmada kullanılan maya hücrelerinde üretilen etanol miktarları da tayin edildi. Bunun için transformant ve non-transformant maya hücreleri standart şartlarda Sc üreme ortamında geç logaritmik aşamaya kadar (OD_{600} :3-4 aralığı) üretildi. Maya hücreleri tarafından üretilen etanol miktarının tayini için önce maya kültürlerinin OD_{600}

değerleri tayin edildi. Maya kültürleri ortamından 1ml örnek alındı ve oda sıcaklığına kadar (18 C) soğuması beklendi. Örnekler mikrosantrifüjde 15000 rpm de çöktürüldü ve sıvı fazdan 100 µl örnek alındı. Alınan üreme ortamı örneklerindeki etanol miktarı da etanol tayin kiti (Megazyme, K-ETOH) kullanılarak üretici firma tarafından açıklandığı şekilde spektrofotometrik yöntem ile tayin edildi. Etanol miktarları mmol etanol/ OD₆₀₀ hücre cinsinden verildi.

3. 6. *S.cerevisiae*'da Protein Miktarlarının Tayini

pCUP1-GCR1 transformantı ve non-transformant *S.cerevisiae* örneklerinin toplam protein konsantrasyonları Lowry metodu kullanılarak belirlendi (Lowry ve ark. 1951). Protein tayini için maya hücreleri 10 ml'lik Sc üreme ortamında logaritmik aşamaya kadar üretildi. OD600 değerleri belirlenen maya hücreleri çöktürülerek 10 ml distile suda yıkandı ve tekrar çöktürüldü. Daha sonra maya örnekleri mikrosantrifüj tüplerine aktarılarak yaş ağırlığı belirlendi. Çöktürülen maya örnekleri 500 µl 0.1 m Tris.HCl'de (pH:7) suspanse edildi. *S.cerevisiae* hücrelerinin permeabilizasyonu ve hücre lizatlarının hazırlanması için 50 µl 0.1 % SDS, 50 µl kloroform ilave edilerek hücre örnekleri vorteks ile en yüksek hızda 1 dakika vortekslendi. Bu şekilde hazırlanan *S.cerevisiae* lizatlarından 20 µl alınıp Lowry metodu ile protein konsantrasyonları belirlendi. Protein standardı için BSA kullanıldı. Protein konsantrasyonları mg yaş mayada /µg çözünür protein olarak verildi.

Araştırma süresince bütün deneyler ikişerli olarak yapıldı ve en az iki kez tekrarlandı. Sonuçlar bölümünde verilen değerler en az 4 ölçümün ortalamasıdır.

4. BULGULAR

4.1. *GCR1*'in Gliserol Üretimine Etkileri

Bölüm 2'de belirtildiği üzere gliserol *S.cerevisiae*'da bazal miktarda sentezlenen fakat ozmotik stres altında hücreyi ozmotik strese karşı koruma amacıyla sentezi artan bir metabolit olduğu bilinmektedir. CUP1-GCR1 plazmiti transforme edilen ve edilmeyen yaban tip ve mutant *S.cerevisiae* hücrelerinin bazal seviyede ürettiği gliserol miktarları ölçüldü. Gliserol biyosentezi sitoplazmik osmotik denge ve redoks dengesinin sağlanabilmesi için bazal seviyede sürekli olarak yapılmaktadır (Albertyn ve ark. 1994a, 1994b).

Genel olarak bakıldığı zaman, yaban tip *S.cerevisiae* ve *tps1*, *gpd1*, *adh1*, *adh2* delesyon mutantlarının transformant olmayan hücrelerinde en yüksek gliserol miktarının $\Delta adh1$ mutantında olduğu görüldü. CUP1-GCR1 plazmiti transformantlarda da gliserol konsantrasyonu tayin edildiğinde yaban tip *S. cerevisiae*'daki gliserol miktarında önemli bir değişim olmadığı görüldü (Çizelge 4.1). Yaban tip suşa benzer şekilde, $\Delta tps1$ mutant suşunun transformant ve non-transformantlarında da yaklaşık olarak aynı miktarlarda gliserol biyosentezi yapıldığı görüldü. Yaban tip maya suşundan farklı olarak, $\Delta adh1$ mutant suşunda gliserol miktarında önemli derecede artış olduğu tayin edildi. Transformant ve transformant olmayan maya hücreleri karşılaştırıldığında ise transformant olan maya hücrelerinin gliserol miktarı transformant olmayanlara göre daha düşük seviyede olduğu belirlendi. Gcr1p fazla sentezi yapılan $\Delta adh1$ mutantlarında ise gliserol sentezinin yaklaşık % 56 kadar azaldığı görüldü (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1:Normal (non-transformant) ve CUP1-GCR1 plazmiti ile transform edilen maya suşlarında gliserol konsantrasyonları.

<i>S. cerevisiae</i> suşu adı	Gliserol konsantrasyonları (µg/mg)*	
	Normal (non-transformant)	CUP1-GCR1 transformantı
YST124 (Yabanıl tip)	0.86±0.02	0.84±0.01
YST311 (Δ tps1)	1.51±0.19	1.17±0.21
YST316 (Δ gpd1)	0.88±0.07	0.51±0.01
YST317 (Δ adh1)	3.46±0.32	1.93±0.34
YST318 (Δ adh2)	1.12±0.19	0.98±0.12

*Gliserol konsantrasyonları mg yaş mayada µg gliserol olarak tayin edilmiştir.

4.2. GCR1'in Trehaloz ve Glikojen Biyosentezine Etkileri

Trehaloz biyosentezi TPS enzim aktivitesi sonucu olarak iki kademede gerçekleşir. Yaban tip ve bu araştırmada kullanılan metabolik mutant suşların trehaloz miktarlarında önemli farklılıklar olduğu görüldü. *TPS1* geni delesyonlu (Δ tps1) *S. cerevisiae* suşunda beklendiği şekilde ölçülebilir miktarda trehaloz sentezi olmadığı görüldü (Çizelge 4.2). Δ gpd1, Δ adh1 ve Δ adh2 mutantı *S. cerevisiae* suşlarında ise yaban tip suşa göre trehaloz miktarlarında yaklaşık 2-kat artış olduğu bulundu (Çizelge 4.2).

Gcr1p fazla sentezinin mutant suşlardaki trehaloz metabolizmasına farklı şekillerde etki ettiği görüldü. CUP1-GCR1 transformantı yaban tip suşta trehaloz miktarında % 63 kadar artış (3.8 µg'dan 6.2 µg'a) olduğu bulundu. Δ gpd1 ve Δ adh2 mutant suşlarında

Gcr1p fazla sentezinin trehaloz metabolizmasına herhangi bir etkisi olmadığı görüldü. Bu iki mutant suşta transformant ve non-transformantlarda trehaloz miktarlarının yaklaşık olarak aynı seviye olduğu bulundu. $\Delta adh1$ mutant suşunda ise Gcr1p fazla sentezi sonucu transformant hücrelerde trehaloz miktarında önemli azalma olduğu görüldü. Non transformant $\Delta adh1$ suşunda trehaloz miktarı 7.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ yaş maya olarak belirlenirken CUP1-GCR1 transformantı $\Delta adh1$ hücrelerde ise trehaloz miktarının yaklaşık %50 kadar azaldığı ve 3.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ yaş maya olarak bulunduğu tayin edildi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2:Normal (non-transformant) ve CUP1-GCR1 plazmiti ile transform edilen maya suşlarında trehaloz miktarları.

S. cerevisiae suşu adı	Trehaloz miktarları (mg/ μg)*	
	Normal (non-transformant)	CUP1-GCR1 transformantı
YST124 (Yabanıl tip)	3.8±0.2	6.2±0.3
YST311 ($\Delta tps1$)	0.0	0.0
YST316 ($\Delta gpd1$)	8.4±0.5	8.7±0.2
YST317 ($\Delta adh1$)	7.1±0.2	3.2±0.1
YST318 ($\Delta adh2$)	6.1±0.2	5.8±0.2

*Trehaloz konsantrasyonları mg yaş mayada μg glukoz eşdeğeri olarak tayin edilmiştir.

Glikojen de glikolitik metabolitlere bağı olarak sürekli sentezlenen bir depo karbonhidratıdır. Yaban tip ve metabolik mutant *S. cerevisiae* suşlarında Gcr1p fazla sentezinin glikojen biyosentezine etkileri de karşılaştırmalı olarak analiz edildi. Trehaloz biyosentezinde olduğu gibi, glikojen biyosentezinin de metabolik mutantlar arasında farklılıklar gösterdiği bulundu (çizelge 4.3). $\Delta adh1$ mutant suşunda yaban tip suşa göre glikojen miktarının 5-kat fazla olduğu, $\Delta tps1$, $\Delta gpd1$ ve $\Delta adh2$ mutantlarında da glikojen miktarlarının yaban tip suşa oranla 2-3 kat fazla olduğu tayin edildi (Çizelge 4.3). Gcr1p fazla sentezinin glikojen biyosentezi ve depolanmasında yaban tip ve $\Delta tps1$ mutant suşunda herhangi bir etkisi olmadığı görüldü. $\Delta gpd1$, $\Delta adh1$ ve $\Delta adh2$ mutantlarında ise Gcr1p fazla sentezi sonucu glikojen miktarlarında önemli azalmalar olduğu belirlendi (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3:Normal (non-transformant) ve CUP1-GCR1 plazmiti ile transform edilen maya suşlarında glikojen miktarları.

<i>S. cerevisiae</i> suşu adı	Glikojen miktarları ($\mu\text{g}/\text{mg}$)*	
	Normal (non-transformant)	CUP1-GCR1 transformantı
YST124 (Yabanıl tip)	2.2 \pm 0.1	2.7 \pm 0.2
YST311 ($\Delta tps1$)	4.7 \pm 0.3	4.6 \pm 0.3
YST316 ($\Delta gpd1$)	6.4 \pm 0.5	4.4 \pm 0.2
YST317 ($\Delta adh1$)	11.2\pm0.7	6.7\pm0.4
YST318 ($\Delta adh2$)	4.3\pm0.2	2.9\pm0.2

*Glikojen miktarları mg yaş mayada μg glukoz eşdeğeri olarak tayin edilmiştir.

4.3. GCR1'in Etanol Biyosentezine Etkileri

Etanol *S. cerevisiae*'da glikolitik yolak'da anaerobik şartlarda son ürün olarak sentezlenen önemli bir ticari üründür. Yaban tip ve metabolik mutant suşlarda etanol üretimine Gcr1p fazla üretimin etkileri karşılaştırmalı olarak analiz edildi (Çizelge 4.4). En yüksek etanol biyosentezinin non-transformant yaban tip *S. cerevisiae* suşunda olduğu görüldü. $\Delta tps1$, $\Delta adh2$ ve $\Delta gpd1$ mutant suşlarında yaban tip suşa oranla daha düşük seviyede etanol üretildiği tayin edildi. Beklendiği şekilde, etanol biyosentezi için gerekli olan Adh1p enzimi için delesyonlu olan $\Delta adh1$ mutant suşunda etanol sentezi olmadığı belirlendi (Çizelge 4.4). Yaban tip ve metabolik mutant suşlarda Gcr1p fazla sentezinin etanol üretiminde önemli derecede artışa neden olmadığı yapılan analizler sonucu belirlendi (Çizelge 4.4)

Çizelge 4.4. Normal (non-transformant) ve CUP1-GCR1 plazmiti ile transform edilen maya suşlarında etanol konsantrasyonları.

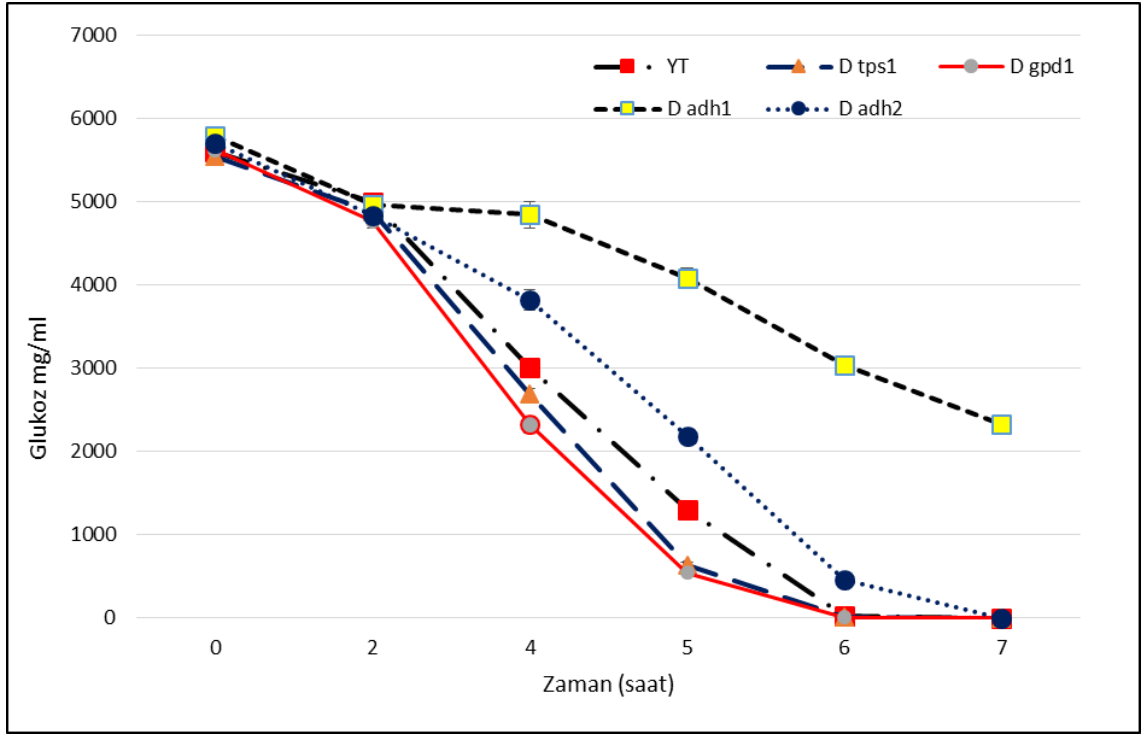
<i>S. cerevisiae</i> suşu adı	Etanol konsantrasyonları ($\mu\text{g/ml/OD}_{600}$)*	
	Normal (non-transformant)	CUP1-GCR1 transformantı
YST124 (Yabanıl tip)	399 \pm 1	328 \pm 24
YST311 ($\Delta tps1$)	253 \pm 2	282 \pm 9
YST316 ($\Delta gpd1$)	300 \pm 8	316 \pm 12
YST317 ($\Delta adh1$)	0.0	0.0
YST318 ($\Delta adh2$)	287 \pm 12	300 \pm 3

*Etanol konsantrasyonları $\mu\text{g/ml/OD}_{600}$ olarak verilmiştir.

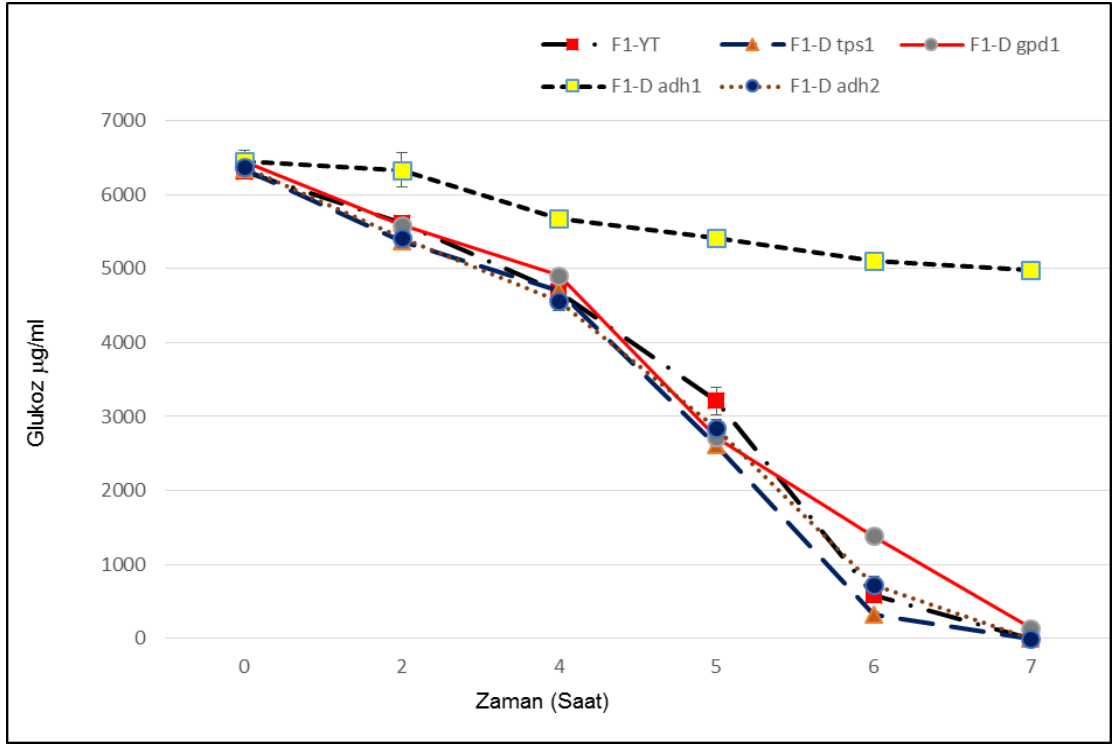
4.4. GCR1'in Glukoz Tüketim Hızına Etkileri

S. cerevisiae'da glukoz tüketim hızı ve glikolitik reaksiyonlar çok yönlü olarak (multi-layered) kontrol edilmektedir (Boles ve ark. 1996). *S. cerevisiae*'da metabolit sentezi ve üreme hızı da üreme ortamındaki kullanılabilir karbonhidrat kaynağına bağlıdır. Gcr1p'nin fazla sentezinin glukoz tüketimine etkisi olup olmadığı CUP1-GCR1 transformantı yaban tip ve metabolik mutant *S. cerevisiae* suşlarında non-transformant suşlar ile karşılaştırmalı olarak analiz edildi. Glukoz tüketim hızlarının her bir metabolik mutant suşta farklılıklar gösterdiği bulundu. En hızlı glukoz tüketiminin $\Delta gpd1$ mutant suşunda olduğu görüldü. $\Delta tps1$ mutant suşunda fonksiyonel TPS enzim kompleksi olmadığı için heksokinazlar üzerinde trehaloz-6 fosfatın inhibitör etkisi de yoktur. Bu nedenle beklendiği gibi $\Delta tps1$ mutant suşunda hızlı bir glukoz tüketimi olduğu görüldü (Şekil 4.1). Bununla birlikte, beklenmedik bir şekilde $\Delta adh1$ mutant suşunda ise glukoz tüketiminin çok yavaş olduğu bulundu.

Gcr1p fazla sentezinin glukoz tüketimine etkisi olup olmadığı da CUP1-GCR1 transformantı yaban tip ve metabolik mutant suşlarda karşılaştırmalı olarak analiz edildi. Beklenmedik şekilde, Gcr1p fazla sentezinin glukoz tüketiminde metabolik mutant suşlarda azalmaya neden olduğu görülmektedir (Şekil 4.2). Glukoz tüketiminde önemli azalmanın ise $\Delta adh1$ mutant suşunun CUP1-GCR1 transformantında olduğu görülmektedir (Şekil 4.2).



Şekil 4.1: Yabanıl tip ve mutant *S. cerevisiae* suşlarında glukoz tüketim hızlarının karşılaştırmalı analizi. YT: Yabanıl tip maya *S. cerevisiae* suşunu (YST124), D: ilgili geni delesyonlu mutant *S. cerevisiae* suşlarını göstermektedir.



Şekil 4.2: Gcr1p fazla sentezinin yabancıl tip ve mutant *S. cerevisiae* suşlarında glukoz tüketim hızına etkisi. YT: Yabancıl tip maya *S. cerevisiae* suşunu (YST124), D: ilgili geni delesyonlu mutant *S. cerevisiae* suşlarını göstermektedir.

4.5. GCR1'in *S.cerevisiae*'da Protein Sentezine Etkileri

Gcr1p transkripsiyon faktörünün protein sentez hızını etkilediği Bölüm 2'de belirtilmiştir. Protein miktar tayini için non-transformant ve transformant *S.cerevisiae* hücrelerinin logaritmik fazda protein miktarları ölçüldü. Sonuçlara bakıldığında yabancıl tip ve metabolik mutant *S. cerevisiae* suşlarında çözümlü sitoplazmik protein konsantrasyonlarında önemli farklılıklar olmadığı tayin edildi (Çizelge 4.5). Gcr1p fazla sentezinin de hem yabancıl tip ve hem de metabolik mutant suşlarda protein miktarlarında değişime neden olmadığı görüldü (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5: Gcr1p fazla sentezinin *S. cerevisiae*'da toplam çözümlü protein miktarına etkisi

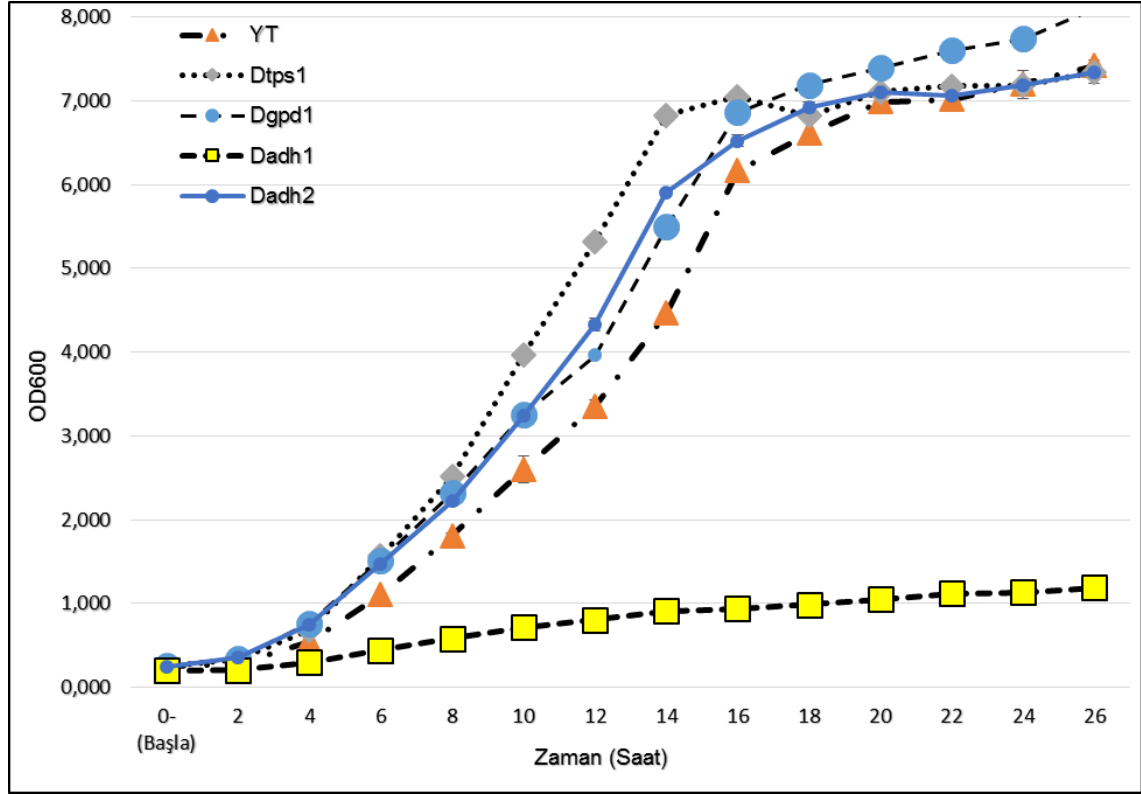
<i>S. cerevisiae</i> suşu adı	Protein Konsantrasyonları (µg/mg)*	
	Normal (non-transformant)	CUP1-GCR1 transformantı
YST124 (Yabanıl tip)	33	37
YST311 (Δ tps1)	35	35
YST316 (Δ gpd1)	42	40
YST317 (Δ adh1)	34	35
YST318 (Δ adh2)	38	39

*Protein Konsantrasyonları mg yaş mayada µg toplam çözümlü protein olarak verilmiştir.

4.6. *GCR1*'in *S.cerevisiae*'da Üreme Hızına Etkileri

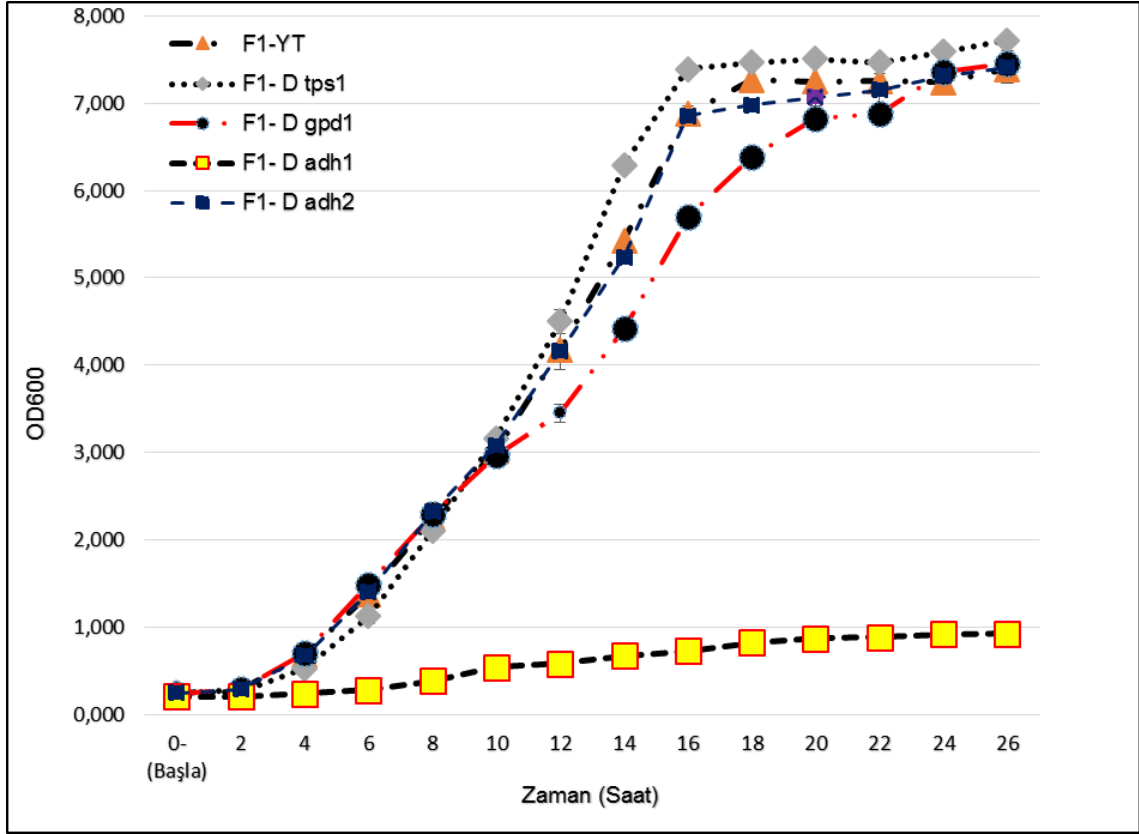
Gcr1p'nin CLN genleri transkripsiyonuna etki ederek hücre döngüsünü de kontrol ettiği bilinmektedir (Willis ve ark. 2003). İnkilenme sürelerinin tespiti için yaban tip ve metabolik mutant *S.cerevisiae* suşları ile Gcr1p fazla sentezini sağlayan plazmitin transforme edildiği suşların belirli aralıklarla OD₆₀₀ değerleri ölçüldü. Metabolik mutant suşların yaban tip suşa göre üreme hızlarında da farklılıklar olduğu görüldü (Şekil 4.3). Elde edilen sonuçlar en hızlı üremenin Δ tps1 mutant suşunda en yavaş üremenin ise Δ adh1 suşunda olduğunu göstermektedir (Şekil 4.3). Δ tps1 mutant suşunun hızlı üreme sonucu bütün suşlara göre daha kısa sürede durağan faza ulaştığı da açıkça

görülmektedir. $\Delta adh2$ ve $\Delta gpd1$ mutant suşlarının da üreme hızlarının yaban tip suşa göre daha fazla olduğu da görülmektedir.



Şekil 4.3: Araştırmada kullanılan yabanıl tip ve mutant *S. cerevisiae* suşlarında üreme değerleri. YT: Yabanıl tip *S. cerevisiae* suşunu (YST124), D: ilgili genleri delesyonlu olan mutant *S. cerevisiae* suşlarını göstermektedir.

Gcr1p fazla sentezinin yaban tip ve metabolik mutant suşlarda üreme hızına etkileri de CUP1-GCR1 transformantlarında tayin edildi (Şekil 4.4). Gcr1p fazla sentezinin non-transformant suşlar ile karşılaştırıldığında metabolik mutant suşlarda önemli artışa neden olmadığı, bazı metabolik mutantların üreme hızında yavaşlamaya neden olduğu görüldü (Şekil 4.3, 4-4).



Şekil 4.4: Gcr1p fazla sentezinin yaban tip ve mutant *S. cerevisiae* suşlarında üreme değerlerine etkisi (YT: Yabanıl tip *S. cerevisiae* suşunu (YST124), D: ilgili genleri delesyonlu olan mutant *S. cerevisiae* suşlarını göstermektedir).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Önemli bir endüstriyel mikroorganizma olan *S. cerevisiae*'da biyomas verimi ve endüstriyel metabolitler olan etanol ve gliserolun üretimi glikolitik yola bağlıdır. Glukozun hücre içine taşınması ve etkili kullanımı hem üreme hızını ve hem de metabolit üretimini etkiler. Bu araştırmada *S. cerevisiae*'da kısıtlı miktarda transkribe edildiği bilinen çok fonksiyonlu transkripsiyon faktörü Gcr1p'nin fazla üretiminin *S. cerevisiae*'da metabolik etkileri incelendi. Glikolitik yolakda yer alan enzim genlerinin transkripsiyonel aktivatörü olan Gcr1p fosfoprotein olup *S. cerevisiae*'da düşük miktarda transkribe edilir (Baker 1986). Gcr1p sentezini arttırmak için promotor bölgesi bazal seviyede de aktif olan ve metal iyonları ile de daha fazla aktive edilen *CUP1* promotoru ile değiştirilmiştir. Promotoru değiştirilen *GCR1* geninin kromozoma integresyonu ile genomik ekspresyon yerine çok kopyalı plazmit (YEp) üzerine klonlanarak *S. cerevisiae*'ya transform edilerek ekspresyonu sağlanmıştır (Hottiger vd., 1995; Türkel ve Bisson, 1999). Üreme ortamına 100 µM bakır iyonlarının ilave edilmesinin *CUP1-GCR1* transformantı mayalarda önemli inhibitör etkisi gözlemlendiğinden araştırmalarımızda üreme ortamına fazladan bakır iyonları ilave edilmemiştir. Bununla ilgili sonuçlar tez araştırması kapsamında dışı tutulmuştur.

GCR1 ve bazı transkripsiyon faktörlerinin hücre içinde çok fazla sentezi ve birikiminin bütün genlerde transkripsiyonu engelleyebildiği daha önce de rapor edilmiştir. Squelching olarak adlandırılan bu genetik durumda fazla sentez edilen transkripsiyon faktörleri spesifik olmayan şekilde genel transkripsiyon faktörleri (TBP ve diğer TFIID alt birimleri, RNA Pol-II, vd) ile etkileşerek global olarak transkripsiyona engel olmaktadır (Gill ve Ptashne, 1988; Wright ve ark., 1991). Araştırmamızda *S. cerevisiae* hücrelerini üretmek için kullanılan sentetik tam besiyerinde de (Sc-leu) önemli miktarda Cu(II) iyonu bulunduğu Sc besiyeri içeriğinden görülmüştür. Besi yerinde normal olarak bulunan bakır iyonlarına ek olarak *CUP1* promoturunu aktive edici diğer metal iyonları olan Fe(II), Zn(II) ve Mn(II) metal iyonları da bulunmaktadır. Bu nedenle *CUP1-GCR1* transformantlarının üreme ortamına fazladan bakır iyonları

ilave edilmemiştir. CUP1-GCR1 transformantı maya hücrelerinde transkribe edilen *GCR1* mRNA seviyesinin de qPCR ile non-transformant suşlar ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmesi gerekmektedir. mRNA seviyelerinin tayinine ek olarak, *GCR1* genine eklenen FLAG epitopunu kullanıp hücre içinde Gcr1 protein seviyesi de western blot ile tayin edilecektir. CUP1-GCR1 transformantlarındaki *GCR1* mRNA'sının ve Gcr1 protein seviyelerinin tayini sonuçlarımızın daha doğru yorumlanmasını sağlayacaktır.

S. cerevisiae'da glikolitik yolak enzim genlerinin ekspresyonu sadece Gcr1p'ye bağlı değildir. Glikolitik genlerin bazıları transkripsiyonel bazıları da translasyonel ve post translasyonel seviyede kontrol edilmektedir. *S. cerevisiae* hücrelerinin üreme koşulları kadar hücre içi glikolitik enzim ve çeşitli metabolit seviyeleri de glikolizin işleyişine etki eden faktörlerdir. Bu nedenle glikolizin işleyişi multi-layered kontrol olarak kabul edilmektedir (Boles vd., 1996). Araştırmamızda Gcr1p fazla sentezinin üreme hızı ve bazı metabolitlerin üretimine önemli derecede etki etmemesinin bir nedeni glikolitik yolaktaki çoklu kontrol mekanizması olabilir. Araştırmamızda proje kapsamına uygun olarak Gcr1p fazla sentezleyen yaban tip ve metabolik mutant suşlarda sadece trehaloz, glikojen, gliserol ve etanol miktarları tayin edilmiştir. Gcr1p fazla sentezinin metabolizmaya etkilerinin daha ayrıntılı olarak açıklanabilmesi için transformant ve non-transformant *S. cerevisiae* suşlarında metabolom analizi ile özellikle glikolitik metabolit seviyelerinin de incelenmesi gerekmektedir. Analiz edilmesi gereken diğer bir hücre bileşenleri ise toplam RNA ve toplam lipid miktarlarıdır. Hücrede bütün RNA sentezi pentoz fosfat yan yoluna bağlı olarak sentezlenen riboz miktarı ile ilişkilidir. Benzer şekilde hücrede toplam lipid miktarının da tayin edilmesi ile Gcr1p fazla sentezinin metabolik etkileri daha kapsamlı incelenebilir.

S. cerevisiae'da glukoz tüketimini arttırıp daha fazla biomas ve daha fazla etanol elde edebilmek için glikolitik yolakta kısıtlayıcı olarak bulunduğu var sayılan enzimler klonlanarak fazla üretilmiştir (Hauf vd., 2000; Smits vd., 2000). Fakat belirli glikolitik enzimlerin fazla üretiminin etanol üretimine önemli bir etkisi olmadığı görülmüştür (Teusink vd., 2000; Busti vd., 2010; Shroder vd., 2013).

Trehaloz ve glikojen *S. cerevisiae*'da fizyolojik streslere daha dayanıklı maya üretimi için önem taşıyan iki metabolittir (François ve Parrou, 2001; Parrou vd., 1997). Trehaloz biyosentez yolağı ara metaboliti olan trehaloz 6-fosfat da heksokinaz'a etki ederek *S. cerevisiae*'da glukoz girişini kontrol eder (Blazquez vd., 1993; Thevelein ve Hohmann, 1995). Araştırmamızda elde edilen sonuçlar Gcr1p fazla sentezinin yaban tip suşta trehaloz miktarında önemli miktarda artışa yol açtığı görülürken, glikojen sentezinin transformant ve non transformant suşlarda aynı olduğu görülmüştür. Bu sonuç Gcr1p fazla sentezinin yaban tip suşta trehaloz biyosentezini arttırabildiğini göstermektedir. Trehaloz ve glikojen metabolizmasının $\Delta adh1$ mutant suşunda ise oldukça farklı kontrol edildiğı görülmüştür. Non-transformant $\Delta adh1$ *S. cerevisiae* suşunda trehaloz ve glikojen miktarları yaban tip suştan daha fazladır. Fakat bu mutant suşta Gcr1p fazla sentezinin hem glikojen ve hem de trehaloz miktarında önemli azalmaya yol açtığı görülmektedir. Bu da $\Delta adh1$ mutantında Gcr1p fazla sentezi ile glikolitik yolakda metabolit sentezinin değıştiğı, alınan glukozun trehaloz ve glikojen yerine diğere metabolik yolaklarda kullanıldığını öne sürmektedir. Gcr1p fazla sentezinin gliserol biyosentezine etkileri de yaban tip ve metabolik mutant suşlar arasında farklılıklar göstermektedir. Gcr1p fazla sentezi ile yaban tip *S. cerevisiae* suşunda gliserol biyosentezinde herahngi bir artış görülmemiştir. Metabolik mutant suşlarda ise Gcr1p fazla sentezi ile gliserol miktarında artış olduğu görülmektedir. Bu sonuç Gcr1p'nin gliserol biyosentezi ile ilgili genlerin transkripsiyonlarına direkt veya dolaylı olarak etki ettiğini göstermektedir.

S. cerevisiae'da ikilenme süresi (üreme hızı) glukoz tüketimi ile de ilgilidir. Araştırmamızda Gcr1p fazla sentezinin ikilenme sadece yaban tip suşta bir miktar kısalmaya yol açtığı görülmüştür. Araştırmada kullanılan metabolik mutant suşların normal şartlarda dahi üreme hızlarının ve glukoz tüketim hızlarının birbirine göre farklılık göstermesi sonuçlarımızı da etkilemektedir. Bu nedenle Gcr1p fazla sentezinin etkisini arttırabilmek için ikili ($\Delta tps1$, $\Delta gpd1$ gibi) veya üçlü metabolik mutant ($\Delta tps1$, $\Delta gpd1$, $\Delta adh1$) suşların da kullanılması gereklidir.

KAYNAKLAR

Alberts, B.A., Johnson J., Lewis M., Raff K., Walter R.P. 2007. Molecular Biology of The Cell 5th edition. Nex York Garland Sciences

Albertyn, J., Hohman, 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. *Molecular and Cellular Biology*, 14: 4135-4144.

Ansell. R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J.M., Adler, L. 1997. The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J.*, 16:2179-2187.

Ausubel, F.M., Glazebrook, J. Greenberg, M., Mindrinos, and G.-L. Yu. 1993. Analysis of the Arabidopsis defense response to *Pseudomonas* pathogens. In: Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, Vol. 2 (E.W. Nester and D.P.S. Verma, eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 383-404.

Baker, H.V. 1986. Glycolytic gene expression in *Sacharomyces cerevisiae*: Nucleotide sequence of GCR1, null mutants, and evidence for expression. *Molecular and Cellular Biology*, 11: 3774-3784.

Belinchon, M.M., Gancedo, J.M. 2007. Glucose controls multiple processes in *Saccharomyces cerevisiae* through diverse combinations of signalling pathways. *FEMS Yeast Research*, 7: 808-818.

Bisson, L.F. 1999. Stuck and Sluggish Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1):107-119.

Blazquez, M.A., Lagunas, R., Gancedo, C., Gancedo, J.M. 1993. Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Letter*, 329(1-2): 51-54.

- Boles, E., Hollenberg, C.P. 1997.** The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1: 85-111.
- Botstein, D., Fink, G.R. 2011.** Yeast: an experimental organism for 21st century biology. *Genetics*, 189(3):695-704.
- Bryant, N., Stevens, T. 1998.** Vacuole Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Protein Transport Pathways to Yeast Vacuole. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(1): 230-247.
- Clifton, D., Fraenkel, D.G. 1981.** The *gcr* (glycolysis regulation) mutation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 256(24):13074-13078
- Dickinson, J.R. 2004.** Life Cycle and Morphogenesis. İç: Dickinson JR & Schweizer editors. İç: The Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. New York: CRC Press: 2004, sf. 1-19
- Dohmen, R.J., Stappen, R., McGrath, J.P., Forrova, H., Kolarov, J., Goffeau, A., Varshavsky, A. 1995.** An essential yeast gene encoding a homolog of ubiquitin-activating enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 270(30):18099-109
- 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.
- Francois, J., Parrou, J.L. 2001.** Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.*, 25(1):125-145
- Feldmann, H. 2012.** Yeast, Molecular and Cell Biology, Second Editin, Wiley-VCH Verlag & Co. Weinheim, Germany.
- Gancedo, J.M., Gancedo, C. 1997.** Gluconeogenesis and catabolite inactivation. Yeast Sugar Metabolism (ZimmermannFK & EntianK-D, eds), pp. 359–377. Technomic Publishing Co, Lancaster-Basel.
- Gancedo, J.M. 1998.** Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 62: 334–361.

- Gancedo, J.M. 2008.** The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32: 673-704.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., Woods R.A. 1995.** Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11: 355–360
- Gill, G., Ptashne M. 1988.** Negative effect of the transcriptional activator GAL4. *Nature*, 334 (6184): 721-724.
- Hansen, 1883.** Integrated Taxonomic Information System (ITIS), *Saccharomyces cerevisiae* species name.
- Hardie, D.G. 2007.** AMP-activated/SNF1 protein kinase: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 8: 774-785.
- Herskowitz, I., 1988.** Life Cycle of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Reviews*, 52: 536-553.
- Hohmann, S., Neves, M.J., de Koning, W., Alijo, R., Ramos, J., Thevelein, J.M. 1993.** The growth and signalling defects of the *ggs1* (*fdp1/byp1*) deletion mutant on glucose are suppressed by a deletion of the gene encoding hexokinase PII. *Curr Genet.*, 23(4):281-289.
- Hottiger, T., Kuhla, J., Pohlig, G., Furst,P., Spielmen, A., Garn, M., Haemmerli, S., Heim, J. 1995.** 2- μ m vectors containing the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene as a selectable marker: excellent stability in complex media, and high-level expression of a recombinant protein from a CUP1-promoter-controlled expression cassette in cis. *Yeast* 11(1):1-14.
- Karp, G. 2006.** Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments 6th, John Wiley & Sons Inc. USA.
- Langkjaer, R.B., Cliften, P.F, Johnston, M., Piskur, J. 2003.** Yeast genome duplication was followed by asynchronous differentiation of duplicated genes. *Nature*, 421: 848- 852.

- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., S., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnel, J. 2004.** Molecular Cell Biology, 5th edition, W. H. Freeman & Company, USA
- Lopez, M.C., Baker, H.V. 2000.** Understanding the growth phenotype of the yeast *gcr1* mutant in terms of global genomic expression patterns. *J Bacteriol.*, 182(17):4970-8
- 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
- Madigan, M.T., Mertingo, J.M. 2010.** Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, çev. Prof. Dr. Cumhuri Çökmüş, Palme Yayıncılık, Ankara, 2010.
- Mascorro-Gallardo, JO, Covarrubias, A.A., Gaxiola, R. 1996.** Construction of a CUP1 promoter-based vector to modulate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 172(1):169-170.
- Mattanovich, D., Branduardi, P., Dato, L., Sauer, M, Porro, D. 2012.** Recombinant protein production in yeast. *Methods in Molecular Biology*, 824: 329-358.
- Özcan, S., Dover, J., Johnston, M. 1998.** Glucose sensing and signaling by two Glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 17: 2566-2573.
- Parrou, J.L., Francois, J. 1997.** A simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells. *Anal Biochem.*, 248: 186–188.
- 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?. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89: 939-948.
- Ronne, H. 1995.** Glucose repression in fungi. *Trends in Genetics*, 11: 12-17.
- 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, sf. 489-515.
- Santangelo, G.M. 2006.** Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70: 253-282.

- Sasaki, H., Kishimoto, T., Mizuno, T., Shinzato, T., Uemura, H. 2005.** Expression of GCR1, the transcriptional activator of glycolytic enzyme genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, is positively autoregulated by Gcr1p. *Yeast*, 22(4):305-19
- Sasaki, H., Uemura, H. 2005.** Influence of low glycolytic activities in *gcr1* and *gcr2* mutants on the expression of other metabolic pathway genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 22:111-27
- Thevelein, J.M., Hohmann, S. 1995.** Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem. Sci.*, 20: 3–10.
- Türkel, S., Bisson. L.F. 1999.** Transcription of the HXT4 gene is regulated by Gcr1p and Gcr2p in the yeast *S. cerevisiae*. *Yeast*, 15(11):1045-1057
- Türkel, S. 2002.** The GCR1 Gene Function Is Essential for Glycogen and Trehalose Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiologica*, 47: 663-666.
- Wang, Y., Pierce, M., Schneper, L., Güldal, C.G., Zhang, X., Tavazoie, S., Broach, J.R. 2004.** Ras and Gpa2 mediate one branch of a redundant glucose signaling pathway in yeast. *Plos Biology*, 2: E128.
- Wang Y., Chen S., Yu O. 2011.** Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91: 949-956.
- Willis, K.A., Barbara K.E., Menon B.B., Moffat J., Andrews B., Santangelo G.M. 2003.** The global transcriptional activator of *Sacharomyces cerevisiae*, Gcr1p, mediates the response to glucose by stimulating protein synthesis and CLN-dependent cell cycle progression, *Genetics*, 165: 1017-1029.
- Wright, A.P., Mc Ewan I.J., Dahlman-Wright K., Gustafsson J.A. 1991.** High level expression of the major transactivation domain of the human glucocorticoid receptor in yeast cells inhibits endogenous gene expression and cell growth. *Molecular Endocrinology*, 5: 1366-1372.

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: LB (Luria-Bertani sıvı besiyeri)

10 g/L Bacto tripton, 5 g/L Yeast Ekstrakt, 10 g/L NaCl toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlandı. 121°C'de 25 dakika otoklavda sterilize edildi. LB petrileri hazırlamak için LB sıvı besiyerine 15 gram/litre agar agar eklendi ve daha sonra 121°C'de 25 dakika otoklavda steril edildi. Ampisilin filtrede steril edildikten sonra son konsantrasyonu 100 mg/litre olacak şekilde kullanımdan önce taze olarak üreme ortamına eklendi.

3: Sentetik tam-lösin üreme ortamı (Sc-Leu)

Sc-leu *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-leu katı besiyeri için son konsantrasyon 30 g/L olacak şekilde agar agar eklenerek 121°C'de 25 dakika süreyle otoklavlandı. Aminoasit kaynağı olarak filtre sterilizasyon yöntemiyle sterilize edilmiş lösin içermeyen aminoasit karışımı (Sc-leu, Sigma Y1376) son konsantrasyon 1.6 gram/litre olacak şekilde kullanımdan hemen önce üreme ortamına ilave edildi.

4: Lowry Çözeltisi

Hücre lizatlarındaki protein konsantrasyonunu belirlemek için kullanıldı.

- Lowry A çözeltisi: 20g Na₂CO₃ ve 4g NaOH toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü.

- Lowry B1 çözeltisi: 1 gram CuSO₄ 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.

5: Lityum Asetat

Lityum asetat *S. cerevisiae*'da CUP1-GCR1 plazmiti transformasyonu için kullanıldı. Steril saf suda 1 M stok olarak hazırlandı, 0.45 µm por çaplı membran disk filtre ile steril edildi.

6: %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.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mevlut ULAS
Doğum Yeri ve Tarihi : Silvan, 11.09.1989
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lise : Bursa Celebi Mehmet Lisesi/ 2006
Lisans : Istanbul Teknik Üniversitesi/ 2013
Yüksek Lisans : Uludag Üniversitesi/ 2015
İletişim (e-posta) : ulasmevlt@gmail.com
Yayınları :

1- Mevlüt Ulaş, and Sezai Türkel. 2014. Glycolysis regulatory factor Gcr2p involves in the regulation of TPS1 and NTH1 genes in the yeast *S. cerevisiae*. III. International Congress of the Molecular Biology Association. İzmir, 10-12 Eylül, 2014. (Poster).

2- Sezai Türkel, Mevlüt Ulaş. 2015. *S. cerevisiae*'da Gcr1p'nin fazla sentezinin üreme hızı ve endüstriyel metabolitlerin üretimine etkilerinin genetik ve biyokimyasal analizi. IV Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi. Afyonkarahisar, 21-24 Ağustos, 2015. (Poster).