

**BAZI MAYA TÜRLERİNDE TREHALOZ
VE
GLİKOJEN METABOLİZMASINA ETKİ
EDEN FAKTÖRLERİN ANALİZİ**

Hülya KARACA GENÇER
Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Ağustos 2012

**Bu tez alışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1001F03**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Hülya Karaca Gençler'in “Bazı Maya Türlerinde Trehaloz ve Glikojen Metabolizmasına Etki Eden Faktörlerin Analizi” başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi 20/07/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Üye (Tez Danışmanı): Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Üye (Tez II. Danışmanı): Prof. Dr. Sezai TÜRKEK

Üye: Prof. Dr. Hayrettin TÜRKEK

Üye: Prof. Dr. Yağmur TUNALI

Üye: Doç. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ

Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI MAYA TÜRLERİNDE TREHALOZ VE GLİKOJEN METABOLİZMASINA ETKİ EDEN FAKTÖRLERİN ANALİZİ

Hülya KARACA GENÇER

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

II. Danışman: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

2012, Syf, 139 syf

Trehaloz ve glikojen bakteri, maya, bitki ve böceklerin bulunduğu yaygın organizma gruplarında yer alan depo karbonhidratlarıdır. Bu glikoz depoları glikolitik akışın kontrolünde de düzenleyici olarak rol oynamaktadırlar. Aslında trehaloz ve glikojen çeşitli çevresel stres şartlarına cevapta, hücrel içeriği korumak amaçlı biriktirilmektedirler.

Bu çalışmada, *C. albicans*, *C. rugosa*, *M. fructicola*, *P. stipitis*, *Y. lipolytica*, *Z. bailii*, *Z. rouxii* ve *S.cerevisiae* gibi maya suşlarının trehaloz ve glikojen içerikleri besinsel stres, oksidatif stres, sıcak şok ve metal stresi gibi farklı stres koşulları altında incelenmiştir. Bu maya suşlarının stres koşullarına cevap olarak, trehaloz ve glikojen içerikleri ile ilgili benzerlikler ve farklılıklar belirlenmiştir. Özellikle sıcaklık stresinde mayalarda trehaloz ve glikojenin önemli derecede biriktiği gözlenmiştir. Tüm stres koşullarında *C. rugosa*'nın yüksek seviyede glikojen biriktirdiği bulunmuştur. *C. rugosa*, *C. albicans*, *S. cerevisiae*'nin *TPS1* ve *GSY1* gen anlatım profilleri RT-PZR yöntemi ile belirlenmiştir. Enzimatik yöntem ile belirlenen trehaloz ve glikojen birikimi, moleküler teknikle karşılaştırılmıştır. *C. albicans*'ın *GSY1* gen anlatımının kadmiyum stresinde stressiz koşula göre 78,13 kat fazla olduğu gösterilmiştir. Araştırmada kullanılan maya türlerinde pseudohifsel gelişim ile depo karbonhidratları olan trehaloz ve glikojen metabolizması arasında bir metabolik bağlantı olup olmadığı biyokimyasal yöntemle incelenmiştir. Pseudohifsel gelişim zaman aralıklı olarak mikroskopik yöntem ile izlenmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda vajenden izole edilen izolatlar *C. glabrata* olarak dizi analizi yöntemi ile belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Maya, stres, trehaloz, glikojen, RT-PZR, dizi analizi

ABSTRACT**PhD Thesis****ANALYSIS OF FACTORS AFFECTING METABOLISM OF
TREHALOSE AND GLYCOGEN METABOLISMS IN SOME YEAST
SPECIES****Hülya KARACA GENÇER****ANADOLU UNIVERSITY
Graduate School of Sciences
Biology Program****Supervisor: Prof. Dr. Merih KIVANÇ
Co-supervisor: Prof. Dr. Sezai TÜRKEKEL
2012, 139 pages**

Trehalose and glycogen are common carbohydrates in many organisms including bacteria, yeasts, plants and invertebrates. These glucose stores also have a regulatory role in the control of glycolytic flux. Infact, trehalose and glycogen accumulate in response to various environmental stress conditions to protect cellular components.

In this study, the trehalose and glycogen contents of *C. albicans*, *C. rugosa*, *M. fructicola*, *P. stipitis*, *Y. lipolytica*, *Z. bailii*, *Z. rouxii* and *S. cerevisiae* were investigated in response to different stress condition such as nutritional stress, oxidative stress, heat shock and metal stress. There were similarities and differences between these yeast species in response to stress conditions regarding their trehalose and glycogen contents. It is found that the heat shock results in a significant level of glycogen and trehalose accumulation in these yeasts. Moreover, high levels of glycogen accumulations were detected in *C. rugosa* in response to all stress conditions. It is determined expression of *TPS1* and *GSY1* in *C. rugosa*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* with RT-PZR. Accumulation of trehalose and glycogen, which was determined by enzymatic methods was compared with that determined by molecular techniques. *C. albicans* *GSY1* is induced (78,13) by cadmium stress according to stress-free condition. In this research, possible metabolic connections between pseudohyphal development and reserve carbohydrate metabolism are investigated by biochemical methods in yeasts used in this research. Pseudohyphal development was followed microscopically in different time intervals. In addition, we have also identified the species at yeast samples obtained from vagina as *C. glabrata* with sequencing analysis.

Keywords: Yeast, stress, trehalose, glycogen, RT-PCR, sequencing analysis

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın yürütülmesinde değerli desteği ile katkılarını sağlayan sayın danışmanım Prof. Dr. Merih KIVANÇ'a teşekkürlerimi sunarım.

Değerli bilgileri ve tecrübesi ile her zaman yanımda olduğunu hissettiren sayın danışmanım Prof. Dr. Sezai TÜRKEK'e oluşturduğu farkındalıktan dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Prof. Dr. Hayrettin Türk'e, Prof. Dr. Yağmur TUNALI'ya ve Doç Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ'ye görüş öneri ve katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Destekleri ve yardımları için Yard. Doç. Dr. Miriş DİKMEN'e ve Öğr. Görv. Zerrin CANTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım.

Zorunda olmadan yaptıkları için, emekleri, paylaşımları, dostlukları ve umutları için başta Nurçin KÜÇÜKOĞLU olmak üzere Araş. Görv. Açıyla KAPKAÇ, Emine DİNÇER, Erhan ASLAN ve Gürkan YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın kıymetini öğreten babam Recep KARACA'ya; manevi destekleri için annem Elif KARACA'ya ve gözlerindeki ışık için kardeşlerime sonsuz teşekkürler.

Ve ailem olduğu için, varlığı ile değer kattığı için eşim Aslan GENÇER'e teşekkürler...

Hülya KARACA GENÇER

Ağustos 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi

1.GİRİŞ	1
1.1.Mayaların Fizyolojisi ve Genetiği.....	3
1.1.1.Mayaların fizyolojisi.....	3
1.1.2.Çalışmada kullanılan maya türlerinin fizyolojisi ve kullanım alanları... 6	
1.1.2.S. cerevisiae'nın temel genetik özellikleri.....	10
1.2.Mayaların İzolasyonu ve İdentifikasyonu.....	11
1.2.1.Mayaların izolasyonu.....	11
1.2.2.Mayaların klasik yöntemlerle tanımlanması.....	13
1.2.3.Mayaların moleküler tekniklerle tanımlanması.....	14
1.3.Trehaloz ve Glikojenin Özellikleri ve Önemi.....	19
1.4.Trehaloz ve Glikojen Metabolizması.....	23
1.4.1.Trehaloz metabolizması.....	23
1.4.2.Glikojen metabolizması.....	26
1.5.Mayalarda Trehaloz ve Glikojenin Fonksiyonları.....	28
1.5.1.Depo karbonhidratı olarak kullanımları.....	28
1.5.2.Trehaloz ve glikojenin glikolitik yol ile ilişkisi.....	30
1.6.Farklı Stres Koşullarında Maya Metabolizması.....	31

1.7.Pseudohifsel Gelişim.....	35
2.MATERYAL	41
2.1.Materyal.....	41
2.1.1.Çalışmada kullanılan mayalar.....	41
2.1.2.Çalışmada kullanılan çözeltiler.....	41
2.1.3.Besiyerleri.....	44
2.2.Kullanılan Kitler.....	45
3.METOD	46
3.1.Arastırmada Kullanılan Maya Suşları ve Üretilmeleri.....	46
3.1.1.Araştırmada kullanılan izolatların saflaştırılması	46
3.1.2.Araştırmada kullanılan suşların üretilmeleri.....	46
3.2.Glikojen ve Trehaloz Ölçümleri.....	47
3.3.Zamana Bağlı Trehaloz ve Glikojen Miktarının Belirlenmesi	48
3.4.Karbonhidrat Açlığının Glikojen ve Trehaloz Birikimine Etkisinin Belirlenmesi	49
3.5.Azot Açlığının Glikojen ve Trehaloz Birikimine Etkisinin Belirlenmesi ..	49
3.6.Oksidatif Stresin Trehaloz ve Glikojen Birikimine Etkisinin Belirlenmesi.....	50
3.7.Sıcaklık Stresinin Trehaloz ve Glikojen Birikimine Etkisinin Belirlenmesi	50
3.8.Metal Stresinin Trehaloz ve Glikojen Birikimine Etkisinin Belirlenmesi .	51
3.9.Pseudohifsel Gelişimin Trehaloz ve Glikojen Biriminine Etkisinin Belirlenmesi	51
3.11.İzole Edilen Mayaların İdentifikasyonlarının Yapılması	52
3.12.İncelenecek Gen Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İle Amplifikasyonu.....	53
3.11.PZR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	54

3.12.Saflaştırılmış PZR Ürünlerinin Dizi Analizi	55
3.13.Gen Dizilerinin Analizi	56
3.14.Gerçek Zamanlı Polimerizasyon Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)	
İçin RNA İzolasyonu.....	56
3.15.cDNA Eldesi.....	57
3.16.RT PZR İçin Primer Tasarımı	58
3.17.RT-PZR ile TPS1 ve GSY 1 Gen Bölgelerinin Transkripsiyon	
Oranının Göreceli Belirlenmesi.....	59
4.BULGULAR	61
4.1.Zamana Bağlı Trehaloz ve Glikojen Miktarının Belirlenmesi	61
4.1.1.Zamana bağlı trehaloz miktarının belirlenmesi	61
4.1.2.Zamana bağlı glikojen miktarının belirlenmesi	62
4.2.Farklı Stress Koşullarına Maruz Bırakılan Mayaların Trehaloz ve	
Glikojen Metabolizması	63
4.2.1.Farklı karbon kaynaklarının trehaloz metabolizmasına etkisi	63
4.2.2.Farklı karbon kaynaklarının glikojen metabolizmasına etkisi.....	65
4.2.3.Farklı azot kaynaklarının trehaloz metabolizmasına etkisi.....	66
4.2.4.Farklı azot kaynaklarının glikojen metabolizmasına etkisi	67
4.2.5.Oksidatif stresin trehaloz metabolizmasına etkisi	68
4.2.6.Oksidatif stresin glikojen metabolizmasına etkisi	69
4.2.7.Farklı metal streslerinin trehaloz metabolizmasına etkisi.....	71
4.2.8.Farklı metal streslerinin glikojen metabolizmasına etkisi	72
4.2.9.Sıcaklık stresinin trehaloz metabolizmasına etkisi	74
4.2.10.Sıcaklık stresinin glikojen metabolizmasına etkisi.....	75
4.3.Mayaların Pseudohifsel Gelişimi	77
4.3.1.Pseudohifsel gelişimin uyarılması ve mikroskopik görüntüleri	77

4.3.1.Pseudohifsel gelişimin trehaloz metabolizmasına etkisi	81
4.3.2.Pseudohifsel gelişimin glikojen metabolizmasına etkisi	83
4.4.İzole Edilen Mayaların Moleküler Yöntemle Tanımlanması.....	85
4.4.1.DNA izolasyonu	85
4.4.2.İncelenecek gen Bölgesinin (ITS1-5.8SrDNA-ITS2) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile amplifikasyonu ve saflaştırılması.....	85
4.4.3.PZR ürünlerinin dizi analizi.....	86
4.5. <i>C. rugosa</i> , <i>C.albicans</i> ve <i>S. cerevisiae</i> ' ye ait TPS1 ve GSY1 Gen Bölgelerinin Real-Time PZR ile Analizi.....	87
4.5.1. <i>C. rugosa</i> , <i>C. albicans</i> ve <i>S. cerevisiae</i> ' ye ait TPS1 gen bölgelerinin Real-Time PZR ile analizi	87
4.5.1. <i>C. rugosa</i> , <i>C.albicans</i> ve <i>S. cerevisiae</i> ' ye ait GSY1 gen bölgelerinin Real-Time PZR ile analizi	89
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	92
KAYNAKLAR	116
EK1.<i>S. cerevisiae</i>' ya ait TPS1 ve GSY1 gen bölgeleri, erişim numaraları, primer setleri.....	128
EK2.<i>Candida albicans</i>, <i>Candida rugosa</i>' ya ait TPS1 ve GSY1 gen bölgelerinin <i>Candida albicans</i>,<i>Candida dubliensis</i>, <i>Candida tropicalis</i>' e ait TPS1 ve GSY1 gen bölgelerihizalanarak belirlenmesi, erişim numaraları, primer setleri.....	131
EK3.<i>S. cerevisiae</i>'ye ait ACT1 gen bölgesi, erişim numarası, primer seti...	137
EK4.<i>Candida rugosa</i> ve <i>Candida albicans</i>' ait ACT1 gen bölgesine ait primerlerin <i>C. albicans</i>, <i>C. dubliensis</i>, <i>C. tropicalis</i> kullanılarak belirlenmesi, ACT1 gen bölgeleri, erişim numaraları, primer dizileri.....	138

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1.S. cerevisiae'ya ait rDNA bölgesi	16
1.2.Gerçek Zamanlı PCR' da SYBR Green teknîği.....	17
1.3.Gerçek Zamanlı PCR' da FRET tekniği	18
1.4.Gerçek Zamanlı PCR' da TaqMan tekniği	19
1.5.Trehalozun yapısı.....	20
1.6.Glikojenin yapısı.....	21
1.7. Trehalozun biyosentezi.....	24
1.8.Trehalozun yıkımı.....	25
1.9.Glikojenin biyosentezi.....	27
1.10.Glikojenin yıkımı	28
1.11.S. cerevisiae' nin farklı stress koşullarında transkripsiyon şeması	34
1. 12.S. cerevisiae' ye ait cAMP-PKA yolu.....	37
1.13.S. cerevisiae' ye ait MAPK yolu.....	39
4.1.Farklı maya türlerinde üreme sürecine bağlı olarak belirlenen trehaloz miktarları(µg glukoz / mg).....	61
4.2.Farklı maya türlerinde üreme sürecine bağlı olarak belirlenen glikojen miktarları (µg glukoz / mg).....	63
4.3.Farklı maya türlerinde alternatif karbon kaynağının trehaloz birikimine etkisi (µg glukoz / mg)	64
4.5.Farklı maya türlerinde alternatif karbon kaynağının glikojen birikimine etkisi (µg glukoz/mg)	65
4.6.Farklı maya türlerinde alternatif azot kaynağının trehaloz birikimine etkisi (µg glukoz / mg)	66
4.7.Farklı maya türlerinde alternatif azot kaynağının glikojen birikimine	

etkisi (μg glukoz / mg)	67
4.8.Farklı maya türlerinde oksidatif stresin trehaloz birikimine etkisi	
(μg glukoz / mg).....	69
4.9.Farklı maya türlerinde oksidatif stresin glikojen birikimine etkisi	
(μg glukoz / mg).....	70
4.10.Farklı maya türlerinde metal stresinin trehaloz birikimine etkisi	
(μg glukoz / mg).....	71
4.11.Farklı maya türlerinde metal stresinin glikojen birikimine etkisi	
(μg glukoz / mg).....	73
4.12.Farklı maya türlerinde sıcaklık stresinin trehaloz birikimine etkisi	
(μg glukoz / mg)	74
4.13.Farklı maya türlerinde sıcaklık stresinin glikojen birikimine etkisi	
(μg glukoz / mg)	75
4.14.Farklı maya suşlarında pseudohifsel farklılaşmanın uyarılması	77
4.14.Devamı Farklı maya suşlarında pseudohifsel farklılaşmanın uyarılması ...	78
4.14.Devamı. Farklı maya suşlarında pseudohifsel farklılaşmanın uyarılması	79
4.15.SLAD ve YPD besiyerlerinde geliştirilen mayaların zamana bağlı	
trehaloz birikimi	81
4.16.SLAD ve YPD besiyerlerinde geliştirilen mayaların zamana bağlı	
glikojen birikimi	82
4.17.İzolatlara ait genomik DNA	84
4.18.İzolatlara ait ITS1-5.8S rDNA-ITS2 gen bölgelerinin saflaştırılmış	
PZR ürünleri	85
4.19. <i>C. rugosa</i> 'ya ait farklı stres koşullarındaki TPS1 mRNA düzeyleri	
kat artışı ilişkisi	87
4.20. <i>C. albicans</i> 'a ait farklı stres koşullarındaki TPS1 mRNA düzeyleri	

kat artışı ilişkisi	88
4.21. <i>S. cerevisiae</i> 'ya ait farklı stres koşullarındaki TPS1 mRNA düzeyleri	
kat artışı ilişkisi	89
4.22. <i>C. rugosa</i> 'ya ait farklı stres koşullarındaki GSY1 mRNA düzeyleri	
kat artışı ilişkisi	90
4.23. <i>C. albicans</i> 'a ait farklı stres koşullarındaki GSY1 mRNA düzeyleri	
kat artışı ilişkisi	90
4.24. <i>S. cerevisiae</i> 'ya ait farklı stres koşullarındaki GSY1 mRNA düzeyleri	
kat artışı ilişkisi	91

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1.Mayaların İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri.....	13
1.2.Maya İdentifikasyonunda kullanılan ticari kitler	14
3.1.ITS1-ITS4 primerler	54
3.2.RT-PZR analizlerinde kullanılan primer dizileri	59
4.1.İncelenen izolatların dizi analizleri sonrası belirlenen en yakın NCBI gen bankası temsilcileri.....	86

1.GİRİŞ

Trehaloz ve glikojen bitki, böcek, bakteri ve mayalarda yaygın şekilde bulunan depo karbonhidratları olup çevresel koşullara bağlı olarak organizmanın kuru ağırlığının yaklaşık % 25'ini oluşturmaktadırlar (Parrou ve ark., 1997). Glikojen lineer zincirli glukoz birimlerinin α -(1-4) bağıyla bağlanmasıyla oluşan bir polisakkarittir. Trehaloz ise iki glukozun α -(1-1) bağıyla bağlanmasıyla oluşan bir disakkarittir (François ve ark., 1997).

Trehaloz ve glikojenin görevleri canlılar arasında farklılık göstermekte olup; trehaloz düşük yapıli organizmalarda gelişimin belli aşamalarında enerji kaynağı olarak rol oynarken Mikobakterilerde glikolipidlerin yapısında yapısal komponent olarak, aynı zamanda çeşitli böceklerin uçuşlarında enerji kaynağı olarak görev yapmaktadır. Yeniden canlanabilen yani tamamen kuruduktan sonra normal aktivitesine dönebilen bitki *Selaginella*'nın da kuru ağırlığında % 12.5 trehaloz ve % 1.5 sukroz içerdiği gözlenmiştir (Richards ve ark., 2002, Schiraldi ve ark., 2002). Bu karbonhidratlar açlık durumundaki hücrelerde, sporlanan hücrelerde, sporların çimlenmesinde, durağan fazdaki vejetatif hücrelerde, karbon ve enerji kısıtlamasında, mitotik hücreye geçişlerde, yaşam döngüsünde önemli karbon ve enerji rezervi olarak kullanılmaktadırlar (Lillie ve Pringle, 1980) .

Trehaloz seviyeleri zor koşullar altında hayatta kalabilen hücreler ile ilişkilendirildiğinde, bu etkilerin strese dayanıklılıkta önemli olduğu in vivo olarak gösterilmiştir (Singer ve Lindquist, 1998; Riberio ve ark., 1999). Başlangıçta sadece stok karbonhidratlar olarak bilinen trehaloz ve glikojenin daha sonra yapılan çalışmalarda yüksek seviyede hidroksil grubu içerdikleri için dehidratasyon, sıcak şok, osmotik stres, azot ve sülfür açlığı gibi stres koşullarında da biriktiği ve bu koşullara karşı organizmayı koruduğu gözlenmiştir. Böylece trehaloz ve glikojenin organizmada stok karbonhidrat olmaktan çok strese karşı koruyucu olarak rol oynadıkları ortaya konmuştur (Elbein ve ark., 2003). Bunun yanısıra mayalarda depo karbonhidratların birikimi ile glikolitik yol arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir (François ve ark., 2012).

Maya hücreleri, bir polisakkarit olan glikojeni ve bir disakkarit olan trehalozu sentezleyebilir ve hidroliz edebilirler. Maya hücrelerinin fizyolojik durumu, üreme aşamaları ve üreme ortamlarına göre trehaloz ve glikojenin hücredeki miktarları çok değişkenlik göstermektedir (Lillie ve Pringle, 1980). Her iki depo karbonhidratın biyosentezi ve yıkımı ile ilgili metabolik yollar *S. cerevisiae*'da oldukça iyi belirlenmiştir (François ve Parrou, 2000).

Ortam koşullarının üreme için olumsuz olması maya hücrelerinde alternatif farklılaşmalara neden olabilmektedir. Maya hücrelerinde görülen bu farklılaşmalar diploidler için pseudohifsel, haploidler için ise invaziv farklılaşma olarak adlandırılmakta ve genellikle azot açlığının neden olduğu birçok sinyal iletim yolunun etkisi ile ortaya çıkmaktadır (Gagiano ve ark., 2002). *S. cerevisiae*'da pseudohifsel farklılaşma iki farklı sinyal iletim yolunun birlikte çalışması ile oluşmaktadır. Bu yollar, siklik AMP'ye bağımlı protein kinaz yolu (cAMP-PKA) ve mitojen aktivasyonlu protein kinaz (MAPK) yoludur. Pseudohifsel üremenin kontrol mekanizmaları *S. cerevisiae* ve bazı maya türlerinde çok iyi bilinmektedir (Gagiano ve ark., 2002).

Bu çalışmada farklı endüstriyel alanlarda kullanılan *Candida albicans*, *Candida rugosa*, *Metschnikowia fructicola*, *Pichia stipitis*, *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces rouxii* ve *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının farklı stres koşulları altında trehaloz ve glikojen üretim potansiyellerinin enzimatik yöntem ile araştırılması amaçlanmıştır. Yapılan stres deneyleri sonucunda yüksek trehaloz ve glikojen birikimi gösteren *C. rugosa*'nın bu potansiyeli kontrol suşlar olarak *S. cerevisiae* ve *C. albicans* ile gerçek zamanlı polimerizasyon zincir reaksiyonları (RT-PZR) yöntemi kullanılarak mRNA seviyesinde belirlenmeye çalışılmıştır.

Azot açlığı stresinin farklı maya hücrelerinde alternatif farklılaşmaya (pseudohifsel gelişme) yol açıp açmadığı belirlenmeye çalışılmış ve bu maya suşlarında pseudohifsel gelişmenin trehaloz ve glikojen metabolizmasına etkisinin enzimatik yöntemle araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca vajenden izole edilen maya suşları genetik olarak tanımlanmaya çalışılmıştır.

1.1.Mayaların Fizyolojisi ve Genetiği

1.1.1.Mayaların fizyolojisi

Temel olarak bir hücreli mantarlar olarak tanımlanan mayalar, her ne kadar misel oluşturabiliyorlarsa da küflerden tek hücreli oluşları, bakterilerden ise hücrelerinin daha büyük olması ve oval, uzun, eliptik veya yuvarlak hücre şekilleri ile bölünme esnasındaki tomurcuklanmaları sayesinde ayrılırlar. Boyutları, türlere ve kültür koşullarına bağlı olarak 2-50µm arasında değişmektedir. Mayaların hücre duvarı, hücrelerin plazma membranını dıştan saran bir örtü olup hücre kuru ağırlığının % 15-30'unu oluşturmaktadır (Warren ve Hazen, 1995).

Büyük çoğunluğunu glukan ve mannan gibi polisakkaritlerin oluşturduğu hücre duvarının küçük bir yüzdesini ise kitin oluşturmaktadır. Hücre duvarının diğer komponentleri proteinler, lipidler ve inorganik fosfattır. Duvar yapısında majör komponent olan β -glukanlar hücre duvarının dayanıklılığını sağlarlar. Hücre duvarı β -1,3 glukan ve kitin tabası halinde olup bu tabakanın dış yüzeyine mannoproteinler yapışmıştır. Mannoproteinler hücre geçirgenliğinde önem taşımaktadır. Kitin N-asetilglukozamin'in bir polimeridir ve maya hücre duvarının yalnızca % 2-4 kadarını oluşturmaktadır. Kitin mayalarda genellikle tomurcuklanma izi çevresinde lokalize olmaktadır. *C. ablicans* gibi pseudohifsel gelişim gösteren bazı mayalarda hücre duvar muhtevasında kitin miktarı fazladır. Bazı maya türlerinde de kitin bulunmamaktadır (Walker, 1998; Yiğit ve Benli, 2005).

Mayalar, birbirinden ayrılmasını sağlayan eşeyli üreme biçimleri, yapıları, yaşam döngüleri ve bazı fizyolojik özelliklerine göre sınıflandırılmaktadırlar. Eşeyli üremesi saptanmayan mantarların tümü *Deuteromycota* (*Fungi imperfecti*) sınıfında incelenirken, eşeyli üremeleri saptanan mayalar ise *Ascomycota* ve *Basidiomycota* sınıflarında incelenirler. Mayaların subdivisyonları ise onların seksüel durumlarına bağlı olarak farklılık göstermekte olup daha düşük filogenetik kategoriler ise morfolojik, fizyolojik ve genetik karakteristiklere bağlı

olarak değişmektedir (Dixon ve Fromtling, 1995). Mayalarda eşeysiz (vejetatif) ve eşeyli olmak üzere iki farklı şekilde üreme görülmektedir. Tomurcuklanma mayalarda görülen en yaygın vejetatif üreme şeklidir. Tomurcuklanma olayında genel olarak, olayın başlangıç noktası ana hücrenin kritik büyüklüğe ulaşmasıdır ve bu durum DNA sentezinin tamamlanması zamanına denk gelmektedir. DNA replikasyonunu takiben turgor basıncının yarattığı gerilim ile ana hücre duvarının belli bir bölgesinde zayıflama meydana gelmekte ve bu bölgeye glukon, kitin sentaz gibi enzimler tarafından sentezlenen yeni hücre duvarı materyallerini içeren sitoplazmik materyal toplanmaktadır. Tomurcuklanmada, hücre duvarı sentez enzimleri, aktin bağımlı salgı bezleri ve plazma membranında yer alan spesifik bölünme reseptörleri anahtar rol oynamaktadır. Dairesel formda bulunan kitin, N-asetilglukozamin polimeri olup ana hücre ile tomurcuk arasında birleşme noktasında bulunmaktadır. Kitin halkaları, hücre bölünmesinden sonra karakteristik tomurcuklanma izi şeklinde görülmektedir. Yeni bir hücre meydana gelmeye başladığı zaman, oluşan tomurcuk ana hücreden tamamen ayrılana dek hücre yüzeyinde bir kalıntı şeklinde görülmektedir. Diğer bir deyişle tomurcuklanma olayında ana hücre duvarı çok fazla büyümemektedir. Ana hücre ve yavru hücre duvarları gelişim boyunca bitişik bulunmaktadır. Bu arada önce mitoz tamamlanır, ardından yeni hücrenin nükleus ve organelleri tomurcuk içerisine göç eder, daha sonra ana hücre ve yeni hücre arasında geçit (septum) oluşmak sureti ile sitokinez meydana gelir. Oluşan yavru hücreye blastokonidyum denir. Mayaların çoğunda, *Saccharomyces* türlerinde görüldüğü gibi, multilateral tomurcuklanma görülmektedir. Bu tomurcuklanma üremede tomurcukların ana hücre yüzeyinin üzerinde geniş bir alan işgal ettiği özel bir tip hücre bölünmesidir. *Hanseniaspora* türleri ise bipolar tomurcuklanma gösterirler ki bu tip tomurcuklanmada tomurcuklar ana hücrenin sadece kutup noktalarında oluşmaktadır (Walker, 1998; Mutlu ve ark., 1999).

Schizosaccharomyces sp. gibi mayalarda füzyon ile bölünme; memelilerdeki hücrelerin iki eşit parçaya ayrılması, kırılma olayının analogu olan hücrede septum oluşumuyla gerçekleşmektedir. Yeni oluşan eşit büyüklükteki yavru hücreler yaklaşık 8µm uzunluğunda olup uzunlamasına gelişmektedir. *S. pombe*'de hücrede septum oluşumu ve sitokinez olayı, hücrenin ekvatorial

düzleminde hücre duvarı değişiklikleri ve hücre iskeleti elementlerin (aktin fiberleri ve sitoplazmik mikrotübüller) yeniden düzenlenmeleri ile yakın ilişkilidir (Walker, 1998).

Flamentli gelişim çeşitli maya tiplerinde görülmekte olup, tomurcuklanma ve füzyon ile gerçekleşen vejetatif çoğalma tiplerinin alternatifi olarak değerlendirilmektedir (Mutlu ve ark., 1999). Filamentler gerçek (septa) hif ve pseudohif olmak üzere ikiye ayrılır. Çeşitli mayalar başlangıçta germ tüpünden köken alarak gerçek hifler oluşturmak sureti ile gelişim eğilimindeyken (örneğin *C. albicans*), diğerleri özellikle olumsuz koşullar altında pseudohif oluşturarak gelişim göstermektedirler (örneğin *S. cerevisiae*). Mayalarda hifsel ve pseudohifsel gelişim farklı metabolik yollar ile temsil edilmektedirler. Mayalarda gözlenen flamentasyon olayı, gelişim koşulları daha uygun hale geldiğinde tersinir özelliktedir. Bu nedenle mayalarda görülen flemantasyon olayının besinsel açıdan sıkıntılı ortamlara adaptasyonu temsil ettiği kabul edilmektedir (Walker, 1998).

Birçok maya seksüel üreme yetisine sahip olmakla birlikte, eşleşme tipleri adı verilen iki farklı hücre formuna sahiptirler. Zıt tiplerin eşleşmesi sonucu diploit hücre oluşur. *S. cerevisiae*'nın a ve α olarak adlandırılan iki çiftleşme tipi vardır. *S. cerevisiae*'nin kromozomlarının birinin üzerinde MAT lokusunda a veya α bulunabilir, bunlardan birinin bulunmasına bağlı olarak maya o eşleşme tipine sahip olmaktadır. a ve α genleri regülatör genler olup a ve α faktörü salgılamaktadır. İki tip çiftleşme faktörünün reseptörlere bağlı molekülleri, hücrelerin içine girmeksizin iki hücrenin birbirine doğru büyümesine ve başka hücrel değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak zıt tipteki iki hücre birbiri ile kaynaşmakta ve diploit zigot oluşmaktadır. Zigot mayozla haploit vejetatif forma dönüştürülerek yaşam döngüsünü tamamlamaktadır (Klar, 2010).

Karasal ve sucul ortamlar ile havadan izole edilebilen mayaların en yaygın habitatları bitkilerdir. Kemoorganotrofik olan mayalar, organik karbona ihtiyaç duymaktadırlar. Oldukça farklı olan karbon kaynakları şekerler, polyoller, organik asitler ve yağ asitleri, alifatik alkoller, hidrokarbonlar ve çeşitli heterosiklik ve polimerik bileşiklerdir. Hareketsiz olan mayalar taşınım için aerosollere,

hayvansal vektörlere ve insan aktivitesine gereksinim duymaktadırlar. Doğal habitatları dışında mayalar insan yapımı çevrelerde yaygın olarak bulunmaktadır. Örneğin *S. cerevisiae* şaraphanelerin yüzeyine kolonize olmuş olup, hastanelerde birçok fırsatçı *Candida sp.* bulunmaktadır. Mayalar besinsel çevreleri ile dinamik etkileşim halindedir. Birçok maya polimorfik olarak kabul edilmektedir ve ortamdaki besinlerden faydalanabilmek için şekil değişikliği yaparak filament oluşturabilmektedirler (Walker, 1998).

Mayalar genellikle 20-30 °C’de gelişmektedirler. Psikrofil mayalar 12-15 °C’de gelişirken termofilik *Kluyveromyces marxianus* türleri 52 °C’de gelişmektedir. Maksimum gelişme sıcaklıkları sadece türe bağlı olmayıp karbon kaynağı, oksijeni kullanım kapasitesi, su potansiyeli ve etanol varlığı gibi gelişme şartlarına da bağlıdır. Biyoteknolojide en çok kullanılan mayalar mezofiliktir (Deak ve Beuchat, 1996). Mayalar metabolizmaları için yüksek su konsantrasyonuna gereksinim duymaktadırlar. Su aktivitesi (a_w) suyun potansiyel enerjisi olarak tarif edilmekte ve çözünmüş maddelerden mayaların yararlanabildiği su olarak da bilinmektedir. *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida mogii*, *Metschnikowia bicuspidata* gibi bazı mayalar düşük su aktivitesi şartlarına uyum gösterme yeteneğinde olup bu mayalar osmotolerant olarak tanımlanmaktadırlar (Tokouka ve ark., 1985; Walker, 1998; Şenses ve Özbaş, 2004).

Mayalarla ilişkili diğer bir fiziksel gelişim gereksinimi pH’dır. Mayaların birçoğu pH 4.5-6.5 arasında iyi gelişmektedir. pH’nın mayalar üzerindeki fizyolojik etkileri hala tam olarak anlaşılamamıştır. Genel kanı, yaklaşık 6.5 olan sabit hücre içi pH’ya karşılık plazma membranının diğer tarafına geçmeye meyilli bir protonun varlığının maya için hayati önemi olduğudur. Çevre pH’sı mayaların ısı toleransı ve kimyasal bileşenlere karşı dayanıklılıkları gibi diğer fizyolojik davranışlarını önemli ölçüde etkilemektedir (Pitt ve Hocking, 1997).

1.1.2.Çalışmada kullanılan maya türlerinin fizyolojisi ve kullanım alanları

Candida albicans; doğada sık ratlanan ve vücudumuzda normal flora üyesi olarak yer alan, dimorfik, fırsatçı patojendir. *Deuteromycetes* sınıfı içerisinde yer

alıp vejetatif olarak üremektedir. Farklı çevresel koşullarda farklı morfolojik formlar sergilemekte olup genellikle oval veya dairesel bir forma sahiptirler. Tomurcuklanma ile ürediklerinde tomurcuklar birbirinden ayrılmadan uzayıp aralarında boğum bulunduran ve pseudohif adı verilen hücre zincirleri oluşturabilmektedir. Aynı zamanda oluşturabildikleri çimlenme borusu (germ tüp); *C. albicans*'ın tanımlanmasında kullanılan önemli kriterlerden biridir. *C. albicans* maya formundan hif formuna geçerken hücre duvarının kitin içeriğinde artış gözlenmektedir. *Candida* hücre membranı diğer ökaryot hücrelere benzer şekilde sterol içermektedir. Sterol içeriği ergosterol ve zimosterol olup ergosterol antifungal ilaçlar için önemli hedeftir. *C. albicans* model patojenik maya olup genellikle mukozal yüzeylerde gelişerek kandidiyazis adı verilen birçok enfeksiyonlara neden olmaktadır. *C. albicans* geniş virulans faktörlerine sahiptir. Bu faktörler konak direnç mekanizmalarına karşı koyabilmekte, yanıltabilmekte, ağır hasar verebilmekte veya bu mekanizmaları inaktive edebilmektedir. *C. albicans*'ın sahip olduğu virulans faktörleri sebep olduğu enfeksiyonun tipi, safhası, enfeksiyon bölgesi ve konak cevabının doğasına göre ekspres edilmektedir. Virulans faktörleri ile *C. albicans* sahip olduğu mikrobiyal flora ile rekabet ederek farklı konak bölgelerinde yaygın enfeksiyonlara neden olan ciddi bir patojen olarak ortaya çıkmaktadır (Molero ve ark., 1998; Abacı ve Haliki, 2004; Walker, 1998).

Candida rugosa; *Deutromycotina* sınıfı içerisinde yer almaktadır. Yuvarlak şekilli olup tomurcuklanma ile ürer ve pseudohif oluşturmaktadır. Doğada geniş yayılım göstermekle birlikte özellikle süt ürünlerinde bulunmaktadır. Daha önceleri kandidemiye sadece *C. albicans*'ın sebep olduğu düşünülmekte iken daha sonra yapılan çalışmalar sonucunda vakaların yaklaşık beşte birinde *C. rugosa* tanımlanmıştır. Özellikle yanıklarda enfeksiyona sebep olduğu bilinmektedir (Dib ve ark., 1996). *C. rugosa* ile ilgili yapılan çalışmalar çoğunlukla lipaz üretimi üzerinedir. *C. rugosa* tarafından üretilen lipaz endüstriyel olarak kullanılmaktadır. Yüksek hidroliz ve sentez aktiviteleri nedeni ile birçok süreçte tercih edilen bu mayanın, Japon şirketler tarafından *Ricinus communis*'dan yağ asiti üretmek üzere kullanımı 1985'e dayanmaktadır (Vakhlu, 2006).

Metschnikowia fructicola; *Ascomycotina* sınıfı içerisinde yer almaktadır. Hücreler küresel ve 3-7 x 4-8 µm boyutundadır. Multipolar tomurcuklanma göstermekte ve her hücreden 1-3 tomurcuk oluşmaktadır. Küresel kalın duvarlı klamidospore benzeri ‘pulcherrima’ hücreleri yaygındır. Pulcherrimin adı verilen pigmentleri Yeast Malt Agar besi ortamında ve % 5 NaCl konsantrasyonunda üretilmektedir. Pseudohif oluşumu görülmemektedir. Özellikle üzüm, çilek, kiraz ve havuç gibi birçok meyvede hasat sonrası gelişen fungal patojenlere karşı biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmakta olup bu konu ile ilgili yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Kurtzman ve Droby, 2001; Liu ve ark., 2011; Walker, 1998).

Yarrowia lipolitica; *Ascomycotina* sınıfında yer almaktadır. Maya formundan hif formuna geçebilen, dikkat çekici dimorfik bir mayadır. Pseudohifsel farklılaşma göstermektedir. *Y. lipolitica*’nın topraktan, tarımsal ve endüstriyel atıklardan, yağ ve protein içeren materyallerden izole edildiği bilinmektedir. Bu türün proteolitik ve lipolitik aktiviteye sahip olması nedeni ile peynirden de izole edildiği bilinmektedir. Peynirden izole edilmesinin diğer bir nedeni ise 5-10 °C aralığında da gelişme gösterebilmesidir. Taşıdığı bazı fizyolojik özelliklere bağlı olarak biyoteknolojik açıdan önemli bir mayadır. Proteaz ve lipaz aktivitesine sahip olup, hidrokarbonları kullanabilme yeteneğindedir. Farklı karbon kaynaklarından sitrik asit, izositrik asit, α-ketoglutarik asit ve pürivik asit gibi biyoteknolojik açıdan önemli karboksilik asitleri üretebildiği bilinmektedir. Heterolog proteinlerin ekspirasyonu için potansiyel konakçı olarak kullanılmaktadır (Barth ve Gaillardin, 1996; Flores ve ark., 2011).

Pichia stipitis; *Ascomycotina* sınıfında yer almaktadır. Dairesel veya oval şeklinde olan hücreler tomurcuklanarak üremektedir. Çürüyen tahtalardan ve tahtalarda yerleşik bulunan böcek larvalarından izole edilmektedir. Gelişme sıcaklıkları 25-37 °C arasında değişmektedir. Şeker ve ksilozu fermente etme yeteneğindedir. *Pichia stipitis* ksilozu ve geniş aralıktaki şekerleri oldukça kısa bir sürede yüksek etanol verimiyle ksilitol üretmeden etil alkole fermente

edebildiğinden dolayı endüstriyel uygulamalarda çok tercih edilmektedir. Aynı zamanda glukozu da metabolize etme yeteneği, *Pichia stipitis*'in lignoselülozik kaynaklı ortamların değerlendirilmesinde iyi bir seçenek olmasını sağlamaktadır. Bu özelliklerinden dolayı birçok biyoteknolojik çalışmada kullanılmaktadır (Agbogbo ve Coward-Kelly, 2008; Okur, 2007).

Zygosaccharomyces türleri, *Ascomycotina* sınıfında yer almaktadırlar. Kserotolerant mayalar olup yüksek tuz ve şeker konsantrasyonların da dahi gelişebilmektedirler. Gıda saklama yöntemlerine dayanıklı olmalarından dolayı gıda bozulmalarına sebep olmaktadır. *Zygosaccharomyces* türleri, tamamen oksijensiz ortamda gelişme yeteneğine sahiptirler. *Z. bailii* koruyuculara karşı dirençli olduğundan gazlı ve gazsız alkolsüz içecekler, meyve suları ve konsantrelerinin, reçeller ile şarapların bozulmasına neden olmaktadır. Bozulma ekşi tat, çökelti oluşumu ve yüksek basınç oluşumu şeklinde kendini göstermektedir. Glukoz, fruktoz ve sükrozun aynı ortamda bulunması durumunda öncelikle fruktozu kullandığı için fruktofilik bir maya olarak tanımlanmaktadır. Yüksek karbondioksit basıncı altında bile fermentasyon yapmaya devam edebilmektedir. Ozmofilik özelliğinden dolayı meyvelerde doğal olarak bulunmaktadır. *Z. rouxii* meyve konsantresi, reçel ve kuru meyve gibi düşük nemli veya paketli ürünlerde bozulmaya yol açabilmektedir. *Z. bailii* ile benzer olan özellikleri yanı sıra düşük kontaminasyon düzeyinde gelişebilmesi ve koruyuculara karşı gösterdiği yüksek direnç gibi farklı özellikleri de bulunmaktadır. Stres koşullarına oldukça dayanıklıdırlar (Rodrigues ve ark., 2003; Şenses ve Özbaş, 2004).

Saccharomyces cerevisiae; Kullanımı çok eski tarihlere dayanan *Saccharomyces cerevisiae* *Ascomycotina* sınıfı içerisinde yer almaktadır. Dairesel veya elipsoid şekilli, tomurcuklanma ile üreyen *S. cerevisiae* özellikle insan yapımı çevrelerde bulunmaktadır. Endüstride (bira, şarap, ekmek) yaygın olarak kullanılmaktadır. *S. cerevisiae* kısa hayat döngüsü, haploid veya diploid olarak bulunabilmesi, transformasyonunun kolay olması, üreme ortamının ucuz ve basit olması, patojenik veya toksik bir etkisinin olmaması, endüstriyel bir

mikroorganizma olması gibi nedenlerden dolayı ökaryotik moleküler genetik çalışmaları için uzun süredir iyi bir model sistem olarak kullanılmaktadır (Boone ve ark., 2007; Witt ve Flower, 2006; Sanz, 2007).

Saccharomyces cerevisiae ($\Delta reg1$); Yüksek glikojen birikiminin görüldüğü mutant *S. cerevisiae* suşudur. Proteinlerin fosforilasyonu ökaryotik hücrelerde post-transkripsiyonel mekanizma olarak bilinmektedir. Mayalarda yer alan protein fosfataz 1 düzenleyici alt ünite Reg1 ve katalitik alt ünite Glc7 içermekte ve bunlar *S. cerevisiae*'da glukoz baskılanmasında rol oynamaktadır. Glukoz ve fruktoz *S. cerevisiae* tarafından tercih edilen birincil karbonhidratlar olmakla birlikte üreme ortamında yüksek oranlarda glukoz bulunması birçok genin transkripsiyonunu baskılamaktadır. Bu baskılanan genler ise alternatif karbon kaynaklarının kullanımı için gerekli olan genler olup *Reg1* mutant hücrede glukoz baskılanması ortadan kalkmakta ve hücre yüksek oranda glikojen biriktirebilmektedir (Wilson ve ark., 2002).

Saccharomyces cerevisiae $\Sigma 1278b$; Pseudohifsel gelişmenin baskın olarak görüldüğü mutant suştur. Pseudohifsel gelişim hücrenin stres cevabının baskılanması ile ilişkili bir fenotiptir ve temel olarak belirli yol izlerinin aktivitesi ile düzenlenmektedir. $\Sigma 1278b$ suşunda bu yollardan Ras2 / cAMP (siklik-AMP) hiperaktiftir (Lo ve Dranginis, 1998).

1.1.2. *S. cerevisiae*'nin temel genetik özellikleri

Genom araştırmalarının dönüm noktalarından biri *S. cerevisiae*'nin tüm genom dizisinin belirlenmesidir. Bu projenin amacı yaygın olarak kullanılan laboratuvar suşu S288C'nin tüm nükleer genomunu dizilemek olup proje 1989'da başlamış ve 1996'da sonuçlanmıştır (Spingola ve ark., 1999; Garrels, 2002).

Nisan 1996'da sonuçlanan tüm genom analizinde belirtildiği üzere *S. cerevisiae* 200'den 2200 kilobaza kadar değişen büyüklüklerde 16 kromozom içermekte ve kromozomal DNA'nın toplam dizisi 12.052 kilobaz olarak bilinmektedir. Toplam 6.183 açık okuma çerçevesinden (ORF) yaklaşık olarak

877'sinin yaşam için zorunlu olduğu 3121'inin ise olmadığı bilinmektedir. Çok hücreli organizmaların genomu ile karşılaştırıldığında maya genomu oldukça sıkıştırılmıştır. Maya genlerinin ortalama büyüklüğü 1.45 kb veya 483 kodon olup kodon sayısı 40'dan 4910'a kadar değişmektedir. ORF'lerinin % 3.8'i intron içermektedir. Birçok ökaryotik genomun aksine maya genomu daha az intron içermekte olup intronlar genellikle 5' uçlarına lokalize olmuş durumdadır. Genlerinin yaklaşık olarak % 30'u karakterize edilmiş olup % 70'inin fonksiyonu bilinmemektedir. Ribozomal RNA genleri 12. kromozoma yerleşmiş olup yaklaşık olarak 100 tekrarlı ardışık transkripsiyon birimlerini oluşturmaktadır. Herbiri 25S, 5.8S ve 18S rRNA için dizi içermektedir. Birimlerin sayısı türler arasında oldukça fark gösterebilmektedir. *S. cerevisiae* 262 tRNA geni içermektedir ve bunlardan 80'i intronlara sahiptir. Kromozomlarında retrotranspozonlarda (Ty elementleri) bulundurmaktadır. Ty elementleri *S. cerevisiae*'nin farklı suşlarında dahi sayı ve pozisyon olarak farklılık göstermektedir. Maya mitokondriyal genomunun (mt genomu) sitokrom c oksidaz altüniteleri 1, 2, 3 (*cox1*, *cox2*, *cox3*) ATP sentez altbirimleri 6, 8, 9 (*atp6*, *atp8*, *atp9*); apositokrom b (*cytb*); ribozomal protein (*var1*); intron içeren birçok ORF'ler içerdiği bilinmektedir. Birçok *S. cerevisiae* türünde 2-µm dairesel plazmid bulunmakta olup plazmid sadece kendi replikasyonundan sorumludur (Otero ve ark., 2010; Sherman, 1991; Wodicka ve ark., 1997). Hemen hemen tüm *S. cerevisiae* suşları tüm nükleik asitin % 0.1'i kadar dsRNA virüsleri içermektedir. RNA virüsleri L-A, L-BC ve M olmak üzere üç aile içermektedir. M dsRNA toksin kodlamakta, L-A kılıf proteinlerini kodlamaktadır. *S. cerevisiae* aynı zamanda 20S dairesel tek zincirli RNA içermektedir. Bu RNA ise RNA bağımlı RNA polimerazı kodlamaktadır (Ball ve ark., 1984).

1.2.Mayaların İzolasyonu ve İdentifikasyonu

1.2.1.Mayaların izolasyonu

Maya izolasyonu için izolasyon yapılacak örneğin yoğunluğu ve fiziksel durumuna bağlı olarak farklı yöntemler kullanılmakta olup direkt ekim veya canlı

sayımı tercih edilen geleneksel yöntemlerdir. Direkt ekim yöntemi ile maya izolasyonu yapılacak olan örnek direk katı besiyeri üzerine konularak inkübasyona bırakılmaktadır. Dilusyon ekimi yönteminde ise çalışılacak örneği temsil etmek üzere en az 3 tekrarlı örnek alınmaktadır. İlk dilüsyon örneğin türüne bağlı olarak manuel veya blender ya da homojenizatör yardımı ile homojen hale getirilmektedir. Genellikle başlangıç dilüsyonu olarak örnek 10 kat seyreltilerek kullanılmaktadır. Homojen halde elde edilen örnekler 10 veya 5 katı dilüsyon ile bir seri halinde seyreltilerek kültür ortamına aktarılmaktadır. Genel amaçlı sayım için kullanılan besiyerine ekim yapmak üzere hazırlanan örnekler için steril peptonlu su (% 0.1) kullanılmaktadır. Genel yaklaşım ise maksimum geri kazanımı sağlayabilmek için, dilusyon sıvısı ve sayım yapılacak su aktivitesinin yaklaşık değerlere ayarlanması yönündedir (Deak ve Beuchat, 1996).

Yüzeye yayma (yayma plak) yöntemi tercih edilen bir ekim yöntemidir. Dökme plak yöntemi uygulandığında agar yüzeyinin altında kalan mayalar daha yavaş gelişirler ve daha hızlı gelişen kolonilerin altında kalabilirler. Bu nedenle yüzeye yayma plak tekniği daha fazla koloni gelişimine izin vermektedir (Deak ve Beuchat, 1996) .

Mayaların tespiti, sayımı ve identifikasyonu için çeşitli besiyerleri kullanılmaktadır. Genellikle kullanılan besiyerleri asidifiye besiyerleri (pH 3.5) olup antibiyotik eklenmiş besiyerleri de tercih edilmektedir (Çizelge 1). Kullanılan antibiyotikler; oksitetrasiklin, klortetrasiklin, kloromfenikol, gentamisin ve streptomisin olarak bildirilmiştir (Deak ve Beuchat, 1996).

Standart inkübasyon prosedürü 25 °C'de 3-5 gün olarak bildirilmiş olup farklı ihtiyaç gereksinimlerine göre süre ve sıcaklık değiştirilebilmektedir (Pitt ve Hocking, 1997).

Çizelge 1.1 Mayaların izolasyonunda kullanılan besiyerleri

Besiyerinin Adı	Kısa Adı
Oxytetracycline Glucose Yeast Extract Agar	OGYA
Rose Bengal Chlortetracycline Agar	RBCA
Dichloran Rose bengal chloramphenicol Agar	DRBCA
Oxytetracycline Gentamicin Glucose Yeast Extract Agar	OGGYA
Yeast extract glucose chloramphenicol agar	YGCA
Tryptone glucose yeast extract chloramphenicol agar	TGYC

1.2.2.Mayaların klasik yöntemlerle tanımlanması

Geleneksel identifikasyon prosedürleri vejetatif hücrelerin mikroskopik ve morfolojik özellikleri ve seksüel üremeleri ağırlıklı olmak üzere hücre duvar yapısı, septa ve sporlarının incelenmesini içermektedir. Geleneksel identifikasyon metodlarının zahmetli olması, uzun sürelerle ihtiyaç duyulması, hassas laboratuvar ölçümleri ve tecrübe gerektirmesi, bazı basitleştirilmiş teknikler ve ticari hızlı sistemlerin geliştirilmesine neden olmuştur. Özellikle tıbbi öneme sahip mayaların konvansiyonel yöntemlerle tanımlanması zaman alıcı ve yoğun çaba gerektirdiği için bu ticari testler tercih edilmektedir. Bu sistemlerde mayaların tür düzeyine kadar olan identifikasyonunda esas dayanak noktası, karbonhidrat asimilasyonu ve enzimatik reaksiyonlar temeline dayanan testleridir (Çizelge 2) (İnci ve ark., 2012).

Testler türbidimetrik ya da kolorimetrik test prensiplerine göre çalışmakta olup, 24-48 saatlik taze kültürler kullanılmaktadır. İnkübasyon 24-72 saat arasında 30 °C’de gerçekleştirilmektedir. Bu testler uygulanırken 37 °C’de üreme, misel ve artrospor oluşumu ve kapsül varlığı gibi ek testlerin yapılması da önerilmektedir. Sonuç olarak 5-10 arası numerik bir profil saptanmakta ve sonuçlar veri skalasında aranmaktadır (İnci ve ark., 2012).

Çizelge 1.2. Maya identifikasyonunda kullanılan ticari kitleler

Ticari sistem	Test Prensipleri	Tanımladığı Maya türü
Auxacolor	13 şeker + 3 enzimatik + siklohekzimid	33 maya
API-20CAUX	19 şeker asimilasyonu	43 maya
ID32C	24 şeker asimilasyonu + 5 organik asit + siklohekzimid ve eskülin	63 maya
API Candida	5 şeker asimilasyonu + 7 enzimatik reaksiyon	15 maya
Micronaut Candida	8 kromojenik substrat + 14 şeker asimilasyonu	34 maya
Rapid Yeast Plus (Innovative Diagnostic System)	5 şeker asimilasyonu + 13 enzimatik reaksiyon	43 maya
Fungichrom	7 şeker asimilasyonu + 8 enzimatik reaksiyon + Aktidion direnci	24 maya

1.2.3. Mayaların moleküler tekniklerle tanımlanması

Mayalar doğada yaygın olarak bulunan çeşitli gıdaların hem üretilmelerinde hem de bozulmalarında önemli role sahip olan mikroorganizmalar olup klinik öneme sahiptirler. Ticari olarak kullanılan ve çeşitli ürünlerin bozulmasına sebep olan mayaların tanımlanmaları ve türler arası farklılıkların ortaya konması iyi kalitede ürün elde etmek amacı ile önemli olduğu gibi klinik öneme sahip mayaların hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmaları, hastaların hızlı ve etkili bir şekilde tedavisi açısından önemlidir. Moleküler taksonomi alanında yapılan ilk çalışmaların ardından tanımlamada; ribozomal RNA (rRNA) veya tamamlayıcı molekülü olan ribozomal DNA (rDNA)'daki belirli bölgelerin hedeflendiği çeşitli tekniklerin geliştirildikleri ve günümüzde de sıklıkla kullanıldıkları bilinmektedir. Filogenetik çalışmalarda da kullanılan bu yöntemler; 26S rDNA, 18S rDNA veya 18rDNA'daki ara bölgelerin (ITS1 ve ITS2) tanımlanmasına yöneliktir. Günümüzde, DNA baz dizi analizi çalışmaları

sonucunda oldukça fazla sayıda veri bankasının oluşturulması ve PZR teknolojisinin geliştirilmesiyle, mayaların hızlı ve doğru bir şekilde tür ve suş düzeyinde tanımlanmaları mümkün olabilmektedir (Yalçın ve ark., 2010). Mayaların moleküler tanımlanmasında en yaygın olarak kullanılan yöntem kesim parçası uzunluk çeşitliliği: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) olup PZR ile çoğaltılmış DNA bölgelerinin restriksiyon enzimleri ile kesimi ilkesine dayanmaktadır. RFLP analizi suşların yakınlıklarını belirlemede oldukça avantajlı bir yöntem olmasının yanı sıra bu yöntemde çok sayıda kesim parçasının ortaya çıktığı durumlarda profillerin karşılaştırılmasında zorluk yaşanabilmektedir. RFLP’de başarı kesim endonükleazlarının (*AvaI*, *TaqI*, *HhaI*, *CfoI* vb.) seçimine bağlı olarak değişmektedir (Yalçın ve ark., 2010; Alcoba-Flórez ve ark., 2007).

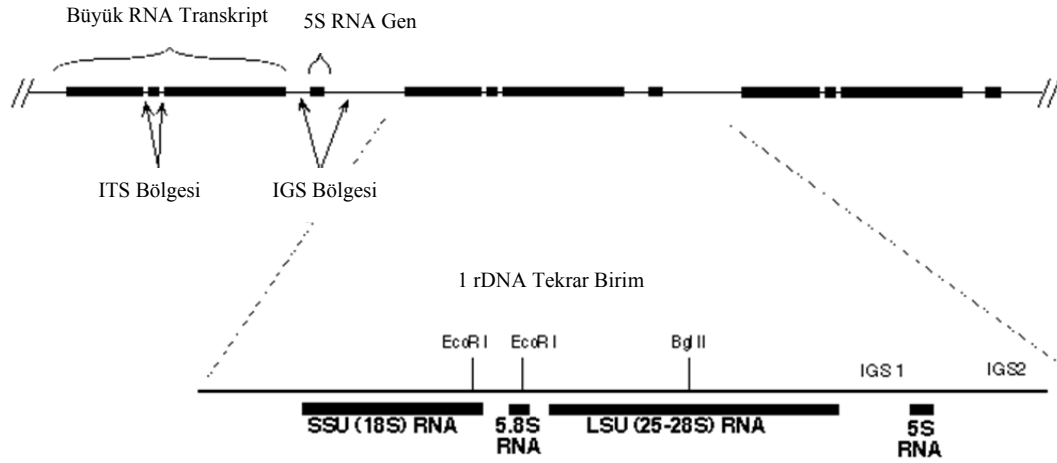
Mayaların tanımlanmasında kullanılan diğer bir moleküler teknik ise rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA; RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)’dır. Bu yöntemde rasgele primerler kullanılarak nükleotid dizi bilgisine sahip olmaksızın polimorfizmin belirlenmesi sağlanmaktadır. Primerlerin; GC/AT oranları % 50 veya % 50’nin üstünde yaklaşık 10 nükleotidlik ve dizilimi rasgele seçilmiş tek çeşit primer olması tercih edilmektedir. Kromozom üzerinde bağlanma yerlerinin sayısına, birbirine olan uzaklıklarına ve bant profilindeki farklılığa bağlı olarak türler arasındaki ayrım belirlenebilmektedir (Yalçın ve ark., 2010; Alcoba-Flórez ve ark., 2007).

Ribozomal DNA’daki ara bölgelerin (ITS, IGS) ve D1/D2 domainlerinin analizi mayaların tanımlanmasında kullanılabilen bir başka yöntemdir (Şekil 1.1). Organizmalar arasındaki evrimsel ilişkiyi ayırt edebilmek için rDNA bölgeleri kullanılan DNA dizileridir. Bütün organizmalarda bulunmaları ve düzenli işleyişleri sayesinde mayaların taksonomisi için de kullanılmaktadırlar. Ayrıca rDNA’ların birçok korunmuş bölüm içermesi tanımlama için gerekli primer seçimini kolaylaştırmaktadır. Ribozomal DNA bölgelerinin seçilme sebepleri arasında; çoklu tekrar sayısı, bazı bölgelerinin çok iyi korunmuş, bazı bölgelerinin ise aşırı değişken oluşu sayılabilir (Kurtzman, 1992).

Nükleer rDNA, ardışık tekrarlanan rDNA birimleri olarak organize olmuştur. Her birimde küçük rDNA geni bulunmaktadır. Bunlar 18S, 5.8S ve 26S

rDNA genleridir. Korunmuş diziler büyük alt birim (LSU) ve küçük alt birim (SSU) genlerinde yer alır. Alt birimler arasındaki ara (spacer) bölgeleri, transkripsiyonu yapılamayan bölgeler (internal transcribed spacer-ITS) ve genler arası bölge (intergenic spacer-IGS) olarak adlandırılır. Bunlar alt birim dizilerinden daha değişkendir ve tek bir cins içindeki türler arasındaki ya da tür içi popülasyonlar arasındaki çalışmalarda geniş oranda kullanılmaktadır. Mayalarda 18S rDNA bölgesi nispeten yavaş bir şekilde evrim geçirmekte ve uzak akraba organizmaların kıyaslanmasında kullanılmaktadır. Ancak kodlanmayan bölge (ITS ve IGS) daha hızlı evrim geçirmekte ve bir tür içindeki suşların ya da bir cins içindeki fungal türlerin karşılaştırılması için kullanılmaktadır (Şekil 1.1) (Gueho ve ark., 1990).

26S rDNA' nın 5' bölgesine yerleşmiş olan D1/D2 domaini yaklaşık olarak 600 baz uzunluğunki bölge olup birçok mayanın tanımlanmasında kullanılmaktadır. D1/D2 domaini polimeraz zincir reaksiyonları ile NL-1 ve NL-4 primerleri kullanılarak çoğaltılır ve sekans analizi yöntemi ile belirlenerek veri tabanında analiz yapılarak tanımlamada kullanılmaktadır (Richard ve ark., 2008).

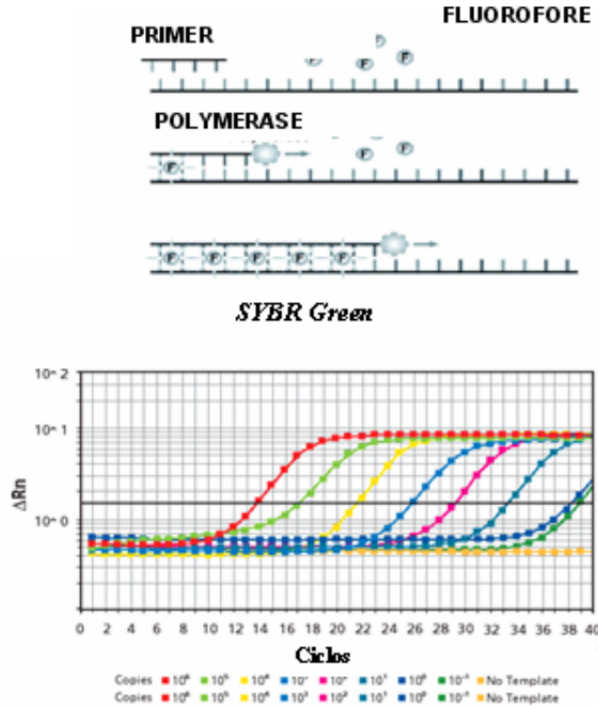


Şekil 1.1. *S. cerevisiae*' ya rDNA bölgesi (Richard ve ark., 2008)

Mayaların tanımlanmasında da kullanılan 'Gerçek Zamanlı Polimerizasyon Zincir Reaksiyonları (RT-PCR)' gerçek zamanda amplifikasyon reaksiyonlarının gözlemlendiği, çeşitli amaçlarla nükleik asitlerin kalitatif veya kantitatif olarak saptanabilmesi amacıyla kullanılabilen yöntemdir. RT-PZR ile standart PZR yöntemi arasındaki temel fark RT-PZR yönteminde optik okuma

sisteminin bulunmasıdır. Reaksiyon sırasında üretilen DNA miktarı ile orantılı olarak floresan ışımaya oluşmaktadır ve okumalar bu ışımalara bağlı olarak gerçekleşmektedir (Heid ve ark., 1996).

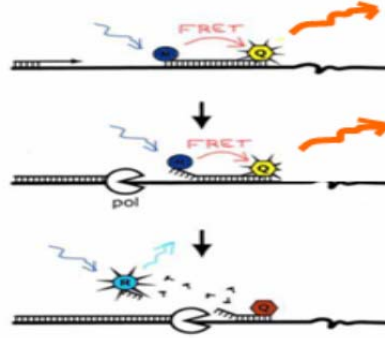
RT-PZR çalışmalarında kullanılan SYBR Green boyası çift zincirli DNA arasına girerek floresan ışımaya yapmaktadır. Işımanın hedef bölgeye ait olup olmadığı ise yapılan erime eğrisi (melting curve) analizleri ile anlaşılmaktadır. Reaksiyon sırasında çift sarmal DNA zincirleri birbirinden ayırmaya başlayınca SYBR Green boyası serbest kalarak floresan miktarı azalmaktadır (Alcoba-Florez ve ark., 2007; Bustin, 2002).



Şekil 1.2. Gerçek Zamanlı PZR’da SYBR Green tekniği (Alcoba-Florez ve ark., 2007)

Real-time PZR tekniklerinde template, primer, prob arası moleküler etkileşime bağlı floresan sinyaller oluşturan primer-prob sistemleri de kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) tekniğinde kullanılan proplardan birinin 3’ ucunda donör boya diğzerinin 5’ ucunda ise alıcı boya bulunmaktadır. Proplar özgül bölge üzerinde birbirine

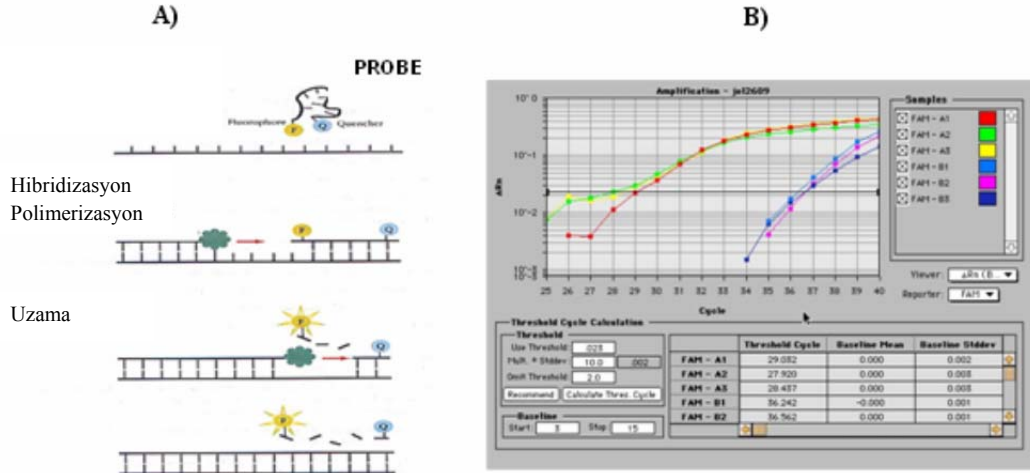
yakın yere bağlandığında işaretli uçlar yanyana gelmekte ve floresan ışıma oluşmaktadır (Alcoba-Florez ve ark., 2007; Bustin, 2002).



Şekil 1.3. Gerçek Zamanlı PZR’ da FRET tekniği (Alcoba-Florez ve ark., 2007)

Bir diğer prop sistemi hidroliz propları olarak adlandırılan ve 5’ ve 3’ uçlarında florokrom işaretli TaqMan proplarıdır. Prop hedef bölge üzerinde primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan bölgeye bağlanmaktadır. Primerler hedef nükleik asite bağlandıktan sonra primer uzaması başlamaktadır. Probun bulunduğu bölgeye gelindiğinde sentezin devam edebilmesi için TaqDNA polimeraz enzimi 5’-3’ ekzonükleaz aktivitesi ile probu 5’ ucundan itibaren yıkmakta böylece 5’P ucunda raportör florokrom işaretli probun bu ucu serbest kalmaktadır, probun 3’ ucundaki baskılayıcı florokromun 5’ ucu üzerindeki baskılayıcı etkisi kalktığından sinyal oluşumu gözlenmektedir. Her döngüde üretilen ürün arttıkça, floresan miktarında artma gözlenmektedir(Alcoba-Florez ve ark., 2007; Bustin, 2002).

“Molecular beacon” ve diğer konformasyonel proplar kullanılarak real-time PZR ile amplifikasyonun saptanmasında ise, DNA’ya bağlandıktan sonra meydana gelen yapısal değişiklik sonucunda ışıma oluşması esasına dayanmaktadır (Alcoba-Florez ve ark., 2007; Bustin, 2002).



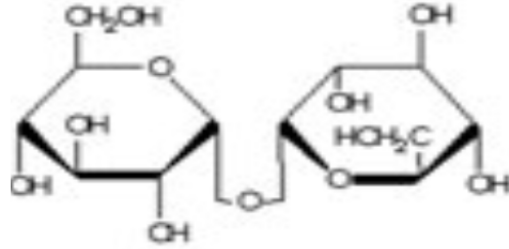
Şekil 1.4. Gerçek Zamanlı PZR’ da TaqMan tekniği (Alcoba-Florez ve ark., 2007)

Bu sistemde kullanılan probalar 5’ ve 3’ uçlarında raporör ve baskılayıcı florokrom bulundurması nedeni ile TaqMan tekniğini benzetmekle birlikte bir firketenin iki ucunu oluşturacak şekilde, bükülmüş bir yapıda dizayn edilmişlerdir. Raporör ve baskılayıcı moleküllerin komşuluğunda birbirine komplementer diziler bulunmaktadır. “Molecular beacon” yapısının komplementer olduğu hedef DNA’ya tam olarak bağlanabilmesi için, bu yapının doğrusal olarak açılması ve bu şekilde bağlanması gerekmektedir. Bu açılarak bağlanma sonucunda iki florokrom birbirinden uzaklaşmakta ve baskılayıcı etki ortadan kalktığı için ışıma oluşmaktadır (Alcoba-Florez ve ark., 2007, Bustin, 2002).

1.3. Trehaloz ve Glikojenin Özellikleri ve Önemi

Trehaloz bir disakkarit olup iki glukoz alt birimi olan α -D-glikopiranozid ve α -D-glikopiranozid’in α :1 $\rightarrow$ 1 bağı ile bağlanması sonucu oluşmaktadır (Şekil 1.5). Trehaloz ilk kez H.A.L. Wiggers (1832) tarafından hastalıklı çavdardan hazırlanan çözeltilerde tanımlanmıştır ve bu şekere “miykoz” adı verilmiştir. Aynı yıllarda Berthelot Ortadoğuda yapraklarda bitki paraziti insektin dış kutikula tabakası trehalamanadan salınan koza benzeri kabuk örnekleri elde etmiş ve

kabuklardan saflaştırdığı bu yeni şekere trehalamanadan türevlenen trehaloz ismini vermiştir (Richard ve ark., 2002; Argüelles, 2000; Jules ve ark., 2004).

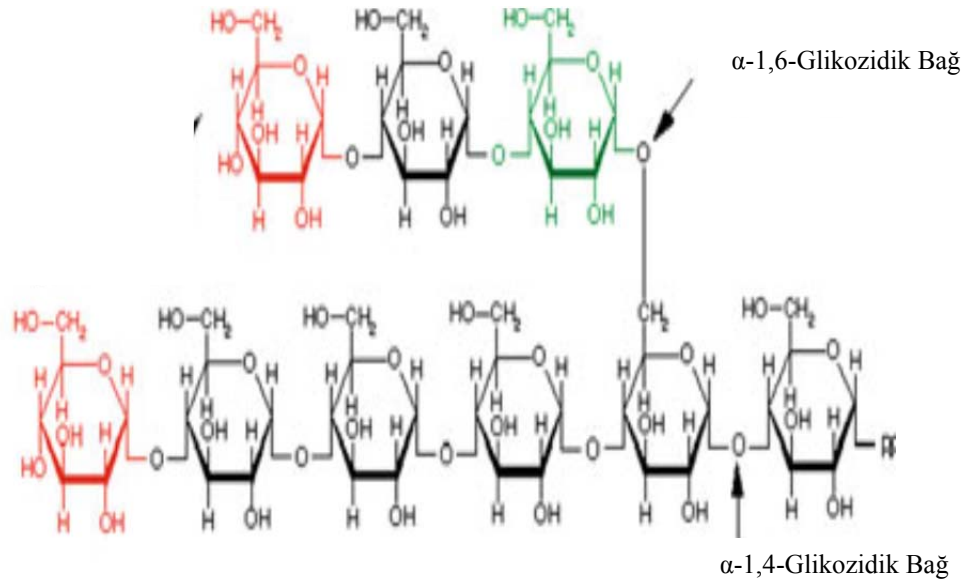


Şekil 1.5. Trehalozun yapısı

Trehalozu diğer şekerlerden farklı kılan ayrıcalıklı özellikleri; indirgenmeyen bir şeker olmasının dışında yüksek hidrofilik oluşu ve kimyasal stabilitesi, iç hidrojen bağ oluşumunun olmayışı gibi fiziksel özellikleridir. Bu özellikler trehalozun esas görevinin stres metaboliti olduğunu düşündürmektedir. Bu karbonhidrat prokaryotik organizmalarda dış karbon kaynağı olarak kullanılabildiği gibi fotosentetik bakteriler tarafından uyumlu çözünen madde olarak kullanılmaktadır. Vakuollerdeki iyonik dengeyi sağlamak için sitoplazmada biriken ve normal biyokimyasal reaksiyonları engellemeyen, reaksiyonlarda su ile yer değiştiren düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdendir (Yıldız ve ark., 2010) , Mikobakterilerin virulans suşlarında ise mikoloik asidlerin trehaloz gibi şekerlere bağlanarak sıvı besiyerinde ip veya demet şeklinde görülen kord faktör (6-6'-dimikolat-a-D-trehaloz) oluşturmaya sebep olmaktadır. (Uzun ve ark., 2000). Mayalarda ve filamentli funguslarda ise büyük miktarda trehaloz depo karbonhidratı olarak saklandığı gibi hücreyi strese karşı koruyucu faktör ve glikolitik akışı düzenleyici olarak da rol oynamaktadır. Hayvanlar içerisinde ilk olarak böceklerde bulunan theralozun ilk bulunduğu böcek *Musca domestica*'dır. Böceklerde kan şekeri olarak bilinen trehaloz hemolenfin en karakteristik karbonhidratıdır. Böceklerde hemolenf haricinde kaslardaki ve toraks yapısındaki

başlıca şekerdir, ayrıca uçuş esnasında tüketilmektedir. Bu karbonhidratın büyük oranı uçuş esnasında ilk 30 sn.'de kaslardan dönüştürülerek kullanılmakta uçuş devamında ise toraks kanından alınmaktadır (Becker ve ark., 1996; Pereira ve ark., 2004).

Glikojen 1700-22000 veya daha fazla lineer zincirli glukoz biriminin α -(1-4) bağıyla bağlanmasıyla oluşmaktadır. Dallanma ise α -(1-6) bağlarıyla meydana gelmektedir (Şekil 1.6). Glikojen gelişme için gerekli olmayıp, karbon ve enerji maddelerinin eksikliğinde yaşamını devam ettirebilmesi için organizmaya yardımcı olmaktadır. Glikojenin kullanımı; hücre aşırı enerji harcıyorsa, dışardan alınan karbon ve enerji kaynağı tükeniyorsa ve hücre yaşamsal faaliyetlerini tehdit eden çevre koşullarında bulunuyor ise gerçekleşmektedir. Glikojen birçok canlıda bu gereksinimleri yerine getirmektedir (François ve Parrou, 2000).



Şekil 1.6. Glikojenin yapısı

Yüksek organizasyonlu hayvanlarda olduğu gibi böceklerde de enerji deposu olarak kullanılan glikojen genellikle yağ doku ve uçuş kasları gibi metabolik ve fizyolojik aktiviteleri yüksek dokularda depolanmaktadır. Glikojen uçuş esnasında iki farklı depodan tüketilmekte olup; ilk olarak kaslardaki glikojen daha sonra yağlardaki tüketilmektedir. İnsanlar ve diğer omurgalılar glikojeni karaciğer ve kas hücrelerinde depolamaktadır. Enerji gereksinimi arttığında bu hücrelerdeki glikojenin hidrolizi ile glukoz açığa çıkmaktadır. Mayalarda glikojen sitoplazmada, hücre duvarında ve nükleoplazmada oluşmaktadır. Mayalardaki glikojen içeriği mayanın fizikokimyasal koşullarına bağlı olarak hücre kuru ağırlığının % 23'üne kadar ulaşabilmektedir (Walker, 1998; François ve Parrou, 2000).

Doğal bir enerji kaynağı olan trehaloz hafif tatlılığı, dış dostu özelliği, düşük nem çekiciliği ve protein koruma özellikleri nedeni ile gıda ve ilaç teknolojisi için alternatif ürün olma özelliğini taşımaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde α -1-1 trehaloz lipozom sabitleyici, gıdalarda tatlandırıcı katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır. Diğer disakkaritlerden farklı olarak trehaloz amino asitlerle ve proteinlerle reaksiyona girmediğinden ürünün saklanma süresince kararmasını önlemektedir. Japonyada özellikle şekerli ürünler (sakız, çikolata), içecek, işlenmiş sebze ve meyvelerde fırıncılıkta, işlenmiş deniz gıdalarında ve dondurulmuş gıdalarda yaygın bir şekilde kullanılmakta olup sadece Japonya'da gıda ile ilgili tüketimi 10 milyon poundu bulmaktadır. 2000 yılında genellikle güvenli olarak tanımlanan "GRAS" olarak doğrulanan trehaloz 2001 yılında Avrupada yeni gıda veya gıda içeriği olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda nem tutma özelliğinden dolayı kozmetik ve bakım ürünlerinde; şampuan krem, dudak nemlendiricilerinde de kullanılmaktadır (Richard ve ark., 2002; Schiraldi ve ark., 2002).

Trehaloz protein dengelemesinden dolayı nemlendirici, koruyucu ajan, protein çökmesini (creutzfeldt jacop hastalığı etmeni) engelleyen şaperonlar gibi birçok uygulamaya da potansiyel teşkil etmektedir. Sinir dokusu ile ilgili hastalıklar; Alzheimer ve prion hastalıkları anormal protein birikimleri olarak bilinmektedir. Trehalozun bu hastalıklara sebep olan huntingtin ve amiloyidbeta

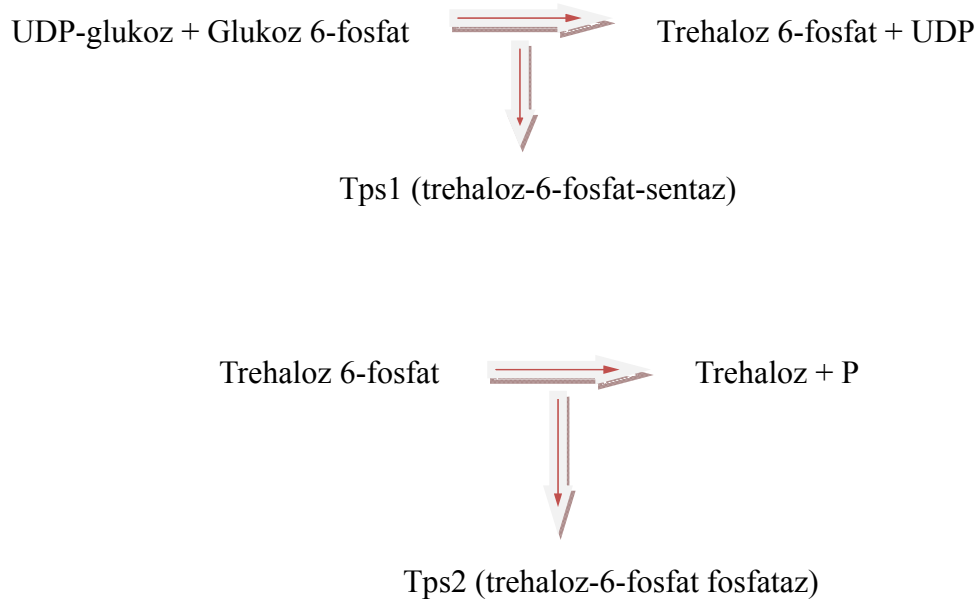
(A β) birikimlerini ve onlarla ilişkili toksisiteyi önlediği bilinmektedir. Yapılan çalışmada prionla enfekte olmuş hücrelere trehaloz ile muamele edilmiş ve prion hastalık etmeni PrP^{Sc} agregatlarının ve lokalizasyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Trehaloz etkisini PrP^{Sc} nin oksidatif zararlar indüklenmesini engelleyerek göstermekte ve böylece trehaloza olan terapötik ilgi artmaktadır (Beranger ve ark., 2008; Jain ve Roy, 2008). Monoklonal antikorlar ve enzimler gibi bioaktif proteinlerin dengesi, kuruma sürecinde trehalozla etkili bir şekilde sağlanmaktadır. İlaç olarak da kullanılan trehaloz, sığır embriyolarının ve dokuların daha etkili saklanması için önem taşımaktadır. Bu indirgenmeyen disakkaritin en önemli uygulaması oda sıcaklığında stoklanan aşılarda stabilizasyonunu sağlamak, enzimleri ve nemli hücreleri donma-kurumanın zararından korumaktır. Çocuk felci aşısı trehaloz varlığında 45 °C'de kurutulduğunda 4 °C kurutulmuş aşılara göre daha stabil kalabilmektedir (Richard ve ark., 2002; Schiraldi ve ark., 2002).

1.4.Trehaloz ve Glikojen Metabolizması

1.4.1.Trehaloz metabolizması

Trehaloz glukozun çözünabilir indirgenmeyen disakkaritidir. α -1-1 trehaloz, α -1- β -1 trehaloz ve β 1- β 1 trehaloz olmak üzere 3 izomeri bulunmaktadır. Bunlar arasında sadece alfa-alfa trehaloz biyolojik metaryallerde bulunmaktadır (El-Bashiti ve ark., 2005). Trehalozun hücre içi seviyesi enzimatik sentez ve yıkım olayları arasındaki denge ile kontrol altındadır. Trehalozun sentezi 4 gen tarafından kodlanan trehaloz sentaz kompleksi (TPS) tarafından; glukoz-6-fosfat (G6P) ve üridindifosfoglukoz (UDPG) dan iki basamaklı reaksiyonla oluşmaktadır. Sentez üridin-di-fosfo-glukozdan glukoz-6-fosfata glukozil birimlerinin aktarılması ile başlamaktadır (Cabib ve Leloir, 1958). Glukozil birimlerinin aktarımı trehaloz-fosfat sentaz (TPS1) enzimi ile katalizlenmektedir. Bu aktarım sonucunda trehaloz-6-fosfat + UDP oluşmaktadır (Şekil 7). Bu reaksiyon ilk kez mayalarda tanımlanmıştır. İkinci aşamada trehaloz-6-fosfat oluşuktan sonra fosfat grubu trehalozu oluşturmak üzere ayrılarak serbest

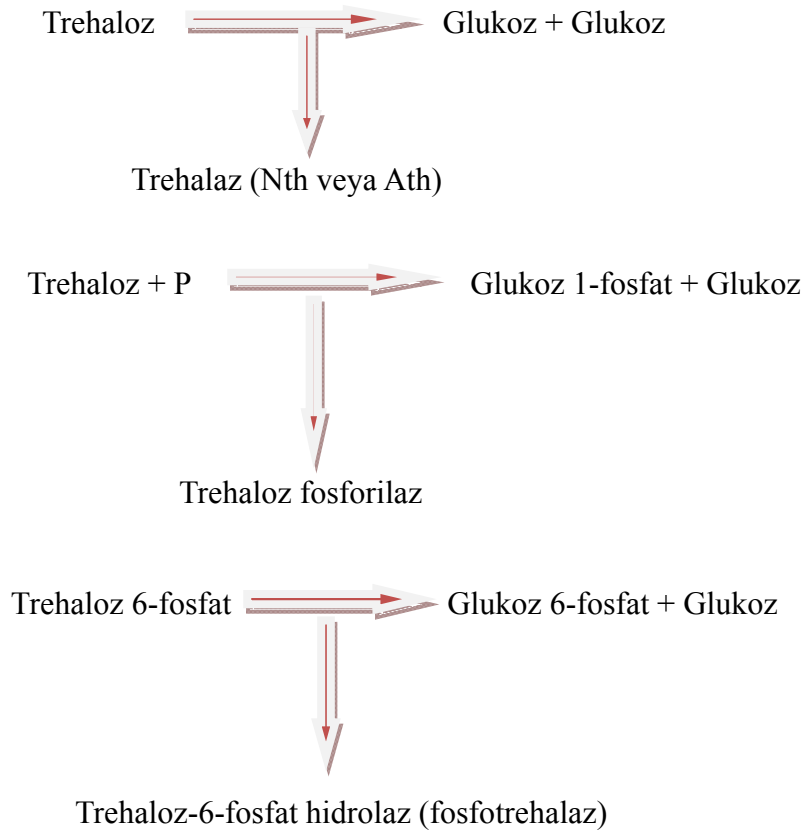
inorganik fosfat döngüsüne katılmaktadır (Cabib ve Leloir, 1958). Her iki basamak *TPS1*, *TPS2*, *TPS3*, *TSL1* genleri tarafından kodlanan altbirimlerden oluşan kompleksin enzimlerini içermektedir. T6P sentaz (Tps1) ve T6P fosfataz (Tps2) trehaloz sentezinin katalitik aktivitesini yönetirken Tps3 ve Tsl1 trehaloz sentaz kompleksinin bütünlüğü için önemli olup enzimatik aktiviteleri bulunmamakta ve tamamen düzenleyici rol oynamaktadırlar (Şekil 7). T6P sentaz reaksiyonu geri dönüşümsüzdür. T6P sentaz geni; *TPS1* glukoz ile baskılanmaktadır. Bunun aksine fosforillenmiş substrat G6P ve UDPG trehaloz üretimini indüklemektedir (Jules ve ark., 2004; Voit, 2003; Plourde-Owobi, 2000).



Şekil 1.7. Trehalozun biyosentezi

Trehalozu hidroliz eden enzim ilk olarak *Aspergillus niger*'de daha sonra *S. cerevisiae*'dan elde edilmiştir. Daha sonra trehalaz birçok organizmada belirlenmiştir (Kopp ve ark., 1993). Trehalozun glukozu hidrolizi ise üç enzim tarafından gerçekleştirilmektedir; bunlar *NTH1* tarafından kodlanan sitozolik veya nötral trehalaz, *ATH1* tarafından kodlanan vakuolar veya asidik trehalaz ve *NTH2* tarafından kodlanan putative trehalaz olarak bilinmektedir (Şekil 1.8). Maya

genomundaki *NTH2* ve ürünü Nth1p ile % 77 benzerlik göstermektedir. Fakat günümüze kadar trehalaz aktivitesi *NTH2* ile ilişkilendirilememiştir. Ath1p ve Nth1p hücrede farklı yerlerde bulunduğu gibi gelişim boyunca farklı aktiviteler sergilemektedir. Hangisinin ne derecede düzenlenmede sorumlu olduğu tam olarak bilinmemekle birlikte yapılan ekspirasyon deneyleri sonucunda orta dereceli sıcak şokta her ikisinin de güçlü ve eş zamanlı görev aldığı düşünülmektedir. Nötral trehalaz Nth1p trehalozun hücre içi hareketinden ve döngüsünden sorumludur (Jules ve ark., 2004; Voit, 2003; Plourde-Owobi, 2000; Nwaka ve ark., 1995). Sürekli aktif olan vakuolar trehalazın maksimum aktivite gösterdiği pH 4.5'dur. Fosforilasyondan sonra maksimum aktivite gösteren sitozolik trehalazın en iyi çalıştığı pH ise 7'dir. Trehalazın aşırı üretimi ise stres koşulları altında etkisiz trehaloz ve etkisiz protein koruması demek olup bu ölüme kadar gidebilmektedir (Kopp ve ark., 1993).

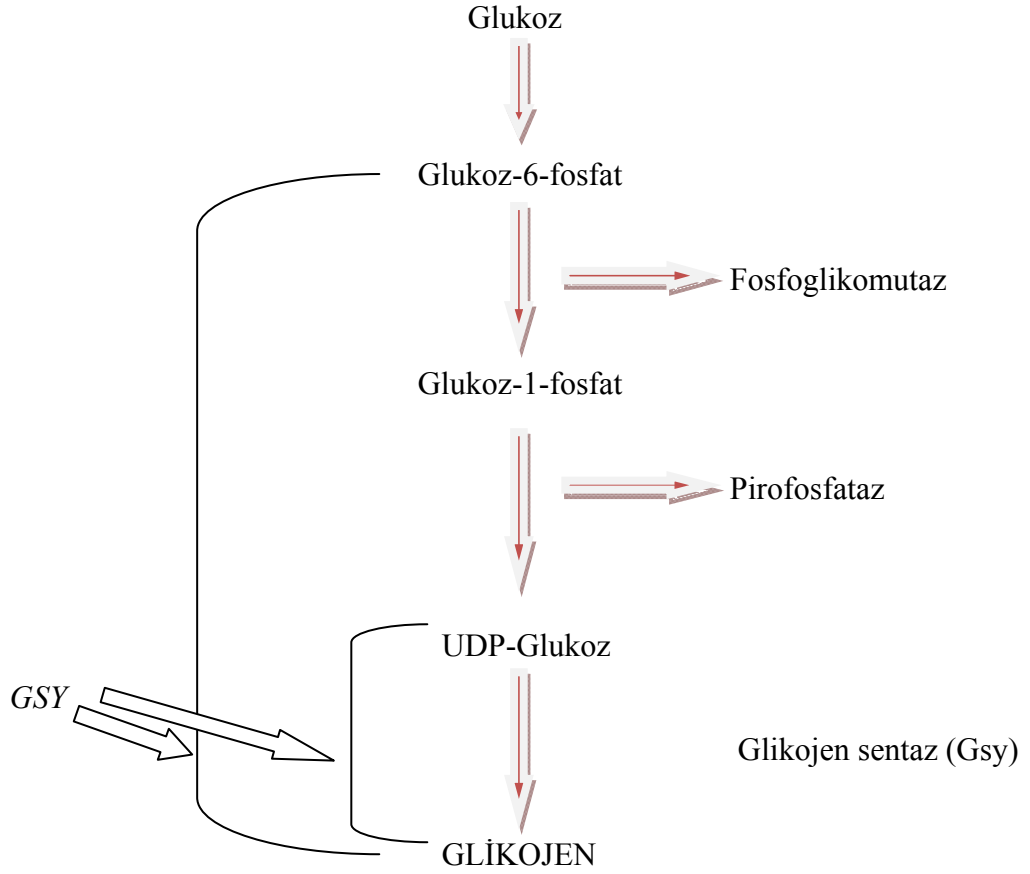


Şekil 1.8.Trehalozun yıkımı

1.4.2.Glikojen metabolizması

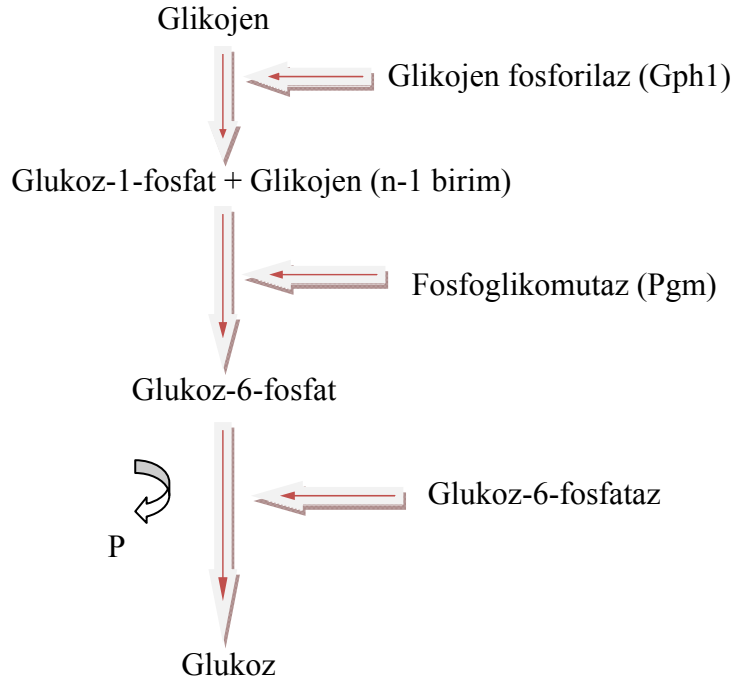
Trehaloz döngüsünün bir parçası olmamasına rağmen glikojenin oluşumunu ve yıkımını değerlendirmek kaçınılmazdır; çünkü glikojen UDPG'den oluşan karbonhidrat deposudur ve bu yüzden trehaloz üretimi ile direkt yarış halindedir denilebilir (Voit, 2003).

Glikojenin sentezi başlangıç, uzama ve dallanma basamaklarından oluşmaktadır. Glikojen deposu tamamen tükenmemiş bir hücrede bulunan bir glikojen parçası glikojen sentezinde primer rol oynamaktadır. Glikojen parçasının yokluğunda ise glikojenin adlı özel bir protein glukoz birimlerinin alıcısı olarak rol oynamakta ve UDPG'den glikojen sentezi gerçekleşmektedir. Glukozil birimleri bu başlangıç proteininin trozin aminoasidine kovalent olarak bağlanmaktadır. UDP-glukozdan glikojenine ilk glukozun transferini “glikojen sentezini başlatma” enzimi sağlamakta ve kısa oligosakkarit primerleri oluşmaktadır. Bu primerler glikojen sentazın substratı olup glikojen sentaz bu primeri uzatmaktadır. UDP- glukozu glukoz verici grup olarak kullanarak alfa-1-4 glikozidik bağa glukoz kalanlarını eklemektedir. Glikojen sentaz *S. cerevisiae*' da *GSY1* ve *GSY2* genleri tarafından kodlanmaktadır (Şekil 1.9). Proteinler % 80 benzer olup memeli kaslarındaki ve sıçan karaciğerindeki glikojen sentaz ile % 50 benzerlik göstermektedir. Delesyon analizleri *GSY2*'nin baskın bir gen olduğunu ve *GSY2*'de meydana gelen delesyonla her iki enzim aktivitesinde indirgenme ve glikojen seviyesinde % 90 azalma olduğunu ortaya koymuştur. Glikojen sentaz ve glikojenin ile uzama başladıktan sonra lineer alfa (1,4)-glukozil zincirleri; amilo (1,4) (1,6) transglikosidaz (dallanma enzimi) ile dallanmaktadır. Dallanma glikojenin fonksiyonu için en az iki sebepten dolayı önem taşımaktadır. Birincisi dallanmanın artışı ile çözünürlük artmaktadır. İkinci olarak ise glikojenin sentez ve yıkımı alfa-1-4 bağlı zincirin indirgenmeyen ucundan olmaktadır. Var olan bu uçların sayısı ile dallanma artmakta ve böylece glikojenin yıkım ve sentez oranında da artış görülmektedir. Sonuç olarak çok büyük moleküler ağırlıklı glikojen molekülleri oluşmaktadır (Torija ve ark., 2005; Wilson ve ark., 2002; François ve Parrou, 2000)



Şekil 1.9. Glikojenin biyosentezi

Bir çok ökaryot hücrede olduğu gibi mayada da glikojen degradasyonu α -glikosidaz tarafından katalizlenen amilolizis reaksiyonları ile glikojen oluşumu; ya da ard arda gerçekleşen fosforolizis ve dallanmaların bozulması sonucu glukoz-1-P ve glukoz oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Şekil 1.10). Mayalarda glikojen fosforilaz glukoz-1-P'ı lineer α -(1,4)-glukozidik bağdan serbest bırakmaktadır. Glikojen fosforilaz ve debranching enzimleri *GPH1* ve *GDB1* tarafından kodlanmaktadır (François ve Parrou, 2000).



Şekil 1.10.Glikojenin yıkımı

1.5.Mayalarda Trehaloz ve Glikojenin Fonksiyonları

1.5.1.Depo karbonhidratı olarak kullanımları

Glukoz mayalar tarafından sadece katabolize edilmez aynı zamanda trehaloz ve glikojen gibi stok karbonhidratlarına dönüştürülmektedir. Maya hücrelerinin fizyolojik durumuna, çevresel şartlara ve üreme aşamasına bağlı olarak bu karbonhidratlar maya kuru ağırlığının % 15-20'inden fazla birikebilmektedir. Stok karbonhidrat terimini açıklamak gerekirse, dış enerji hücrenin gelişmesi ve biyosentezi için gerekli olan enerjiyi aştığında sentezlenen ve hücre canlılığı tehlikeye girdiğinde yıkılan maddelerdir. Trehaloz etanoldeki büyüme safhası sırasında oluştuğu için bu kavram tam olarak trehalozu karşılamamaktadır ve stressiz koşullarda daha fazla kullanılmaktadır, trehaloz açlık veya dinlenme halinde hücre canlılığına katkıda bulunmamakta ve sonuç olarak, trehalozun depo karbonhidratı olarak fonksiyonu şüpheli olarak görülmektedir. Besin yokluğunda ise hücresel aktiviteyi desteklemek, enerji ve

karbon sağlamak glikojenin en büyük fonksiyonudur (François ve Parrou, 2000; Argüelles, 2000).

Mayaların aynı fonksiyonda iki farklı stok karbonhidratı içermesi sebebi uzun süre merak konusu olmuş ve yapılan çalışmalar sonucunda trehalozun glikojenden daha hızlı yıkıldığı gözlenmiştir (Walker, 1998). Trehaloz besin maddelerinin bol olduğu durumlarda, ekspanansiyel fazda üretilmemektedir. Glikojen ise ekspanansiyel fazda üretilmektedir. Trehaloz sentezi, ekstraselüler glukozun olmadığı durağan fazda glikojenin metabolize edildiği süreçte gerçekleşmektedir. Durağan fazda sürekli inkübasyonda, hücreler ilk olarak glikojeni kullanmaktadır. Trehalozun yıkımı glikojen stokları tükendikten uzun zaman sonra ve hücre ölümünün başladığı zamana denk gelmektedir (Singer ve Lindquist, 1998). Trehalozun yıkımı bir kaç hafta sürmektedir. Trehalozun yavaş metabolize olması canlılık için oldukça önemli olup canlılık ve fermentasyon disakaritlerin tüketilmesinden sonra azalmaktadır. Aynı zamanda stok karbonhidratlarının yıkımı organizma tarafından hazır kullanılabilir enerji sağladığı gibi, diğer rakiplerine ekolojik üstünlük sağlamasına da sebep olmaktadır (François ve ark., 1997; Argüelles, 2000).

Trehaloz ve glikojen spor oluşumu sırasında oldukça fazla birikmekte ve sporların olgunlaşması ve çimlenmesi sırasında oldukça hızlı bir şekilde yıkıma uğratılmaktadır. (François ve Parrou, 2001; Elbein ve ark., 2003).

Trehaloz ve glikojen hücre döngüsünün G1 fazı boyunca birikmektedir ve S fazına girişte deplete olmaktadır. Bu durum trehaloz ve glikojenin düşük şeker kaynakları altında geçici süre ile şeker akışını arttırdığını ve bunu hücre bölünmesi döngüsünü tamamlamak için gerçekleştirdiğini düşündürmektedir. Glukoz depoları, büyüme oranı düşük olan hücre döngüsünde ilerlemek için gerekli olan enerji ve karbon kaynağı olarak görev yapmaktadır. Bununla birlikte, glikojen ve trehaloz sentezlenemeyen bir mutant düşük oranda da olsa bölünmeye ve büyümeye devam etmektedir (Sillje ve ark., 1999; Paalman ve ark., 2002).

1.5.2.Trehaloz ve glikojenin glikolitik yol ile ilişkisi

Mayalarda trehaloz metabolizmasının glikolitik yolu düzenleyici rolü olduğu bilinmektedir (Noubhani ve ark., 2009). Glukoliz ve trehaloz metabolizması arasındaki ilişki 3 şekilde tanımlanabilmektedir.

1. TPS'in glukoz taşınımı ve şeker kinaz aktivitesi ile ilişkisinden dolayı glukoz akışını sınırlayıcı aktivitesi vardır.

2. Trehaloz metabolizması; trehaloz sentezinde şeker fosfatlarının yönünü değiştirerek veya kullanarak glikolizisin aşırı akışını önlemekte ve bu yol inoorganik fosfat üretmektedir ki; bu da gliseraldehit 3-P dehidrogenaz aktivitesi için gereklidir.

3. Trehaloz-P glikolizde, şeker akışını heksokinaz aktivitesinin inhibisyonu ile sınırlamaktadır (Elbein ve ark., 2003).

Bu üç durum şu şekilde açıklanabilir; *tps1* mutantları galaktozda gelişebilirken glukozda gelişememektedir. Glukoz-6-fosfattan sonrası her iki şeker için benzer olduğundan mayaların glukozda gelişememelerinin sebebi transport basamağında, heksokinaz basamağında ya da glukozu duyarlı herhangi başka bir basamakta araştırılmıştır. Bu basamaklar ve trehaloz-6-fosfat sentaz eksikliği arasında bağlantı kurulmaya çalışıldığında, bu basamakların trehaloz veya T6P tarafından düzenlendiği düşünülmektedir. Trehaloz metabolizması ve glikoliz akışının kontrolü ile 2 farklı mekanizma önerilmektedir. Birinci modele göre; mayaya aşırı glukozun verilmesi ile, glukoz hücre içine girmekte ve çok hızlı bir şekilde fosforilasyon gerçekleşmektedir ve aşırı glukoz-6 fosfatlar ise daha sonra gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz reaksiyonlarında gerekli olan serbest fosfatları geri kazanmak üzere trehaloz sentezine kanalize olmaktadır. Bu durum *tps1* mutantlarında bir darboğaz oluşturmaktadır; çünkü mutantlarda artan ATP harcaması görülmekte ve harcanan ATP miktarı glikolizde elde edilen ATP miktarını aşmaktadır yani *tps1* mutantlarının metabolik özellikleri, glikolitik ara ürünlerin oldukça fazla birikmesi hücre içi fosfatın azalması ve bir kaç dakika sonra şeker eklenmesi ile ATP' nin tükenmesidir. Fosfat geri kazanım modeli *tps*

mutantlarında hücre içi serbest fosfatların düşmesi ile desteklenmektedir (Thevelein ve Hohman, 1995; François ve Parrou, 2000; Gancedo ve Flores, 2003).

İkinci alternatif hipotez ise trehaloz metabolizması glukoz akışını trehaloz-6-fosfat ile heksokinaz aktivitesini inhibe ederek gerçekleştirmektedir. Maya heksokinazları submilimolar konsantrasyonda trehaloz-6-fosfat konsantrasyonu ile inhibe edilmektedir; fakat bu ilgi net olarak anlaşılmamaktadır. T6P, trehaloz sentezleyen protein kompleksi içinde kanallı olarak heksokinazı inhibe edecek konsantrasyonda sitoplazmaya ulaşmaktadır. *tps1* mutantlarında bu inhibisyonun kaybı glukozda eksik gelişime sebep olmaktadır. T6P burada feed-back inhibitörü olarak rol oynamaktadır. Gerçekte şimdiye kadar T6P sadece maya heksokinazının fizyolojik inhibitörü olarak bilinirken, glikolizin düzgün işleyişi içinde gerekli olduğu görülmektedir (François ve Parrou, 2000; Gancedo ve Flores, 2003; Blazquez ve ark., 1993).

1.6.Farklı Stres Koşullarında Maya Metabolizması

Mayalar biyosferde meydana gelen sürekli ve beklenmedik fizyolojik ve biyolojik karışıklıklarla hızlı ve etkili bir yolla baş etmek zorundadır. Bu alışılmadık çevresel şartlar fizyolojik, davranışsal ve bilişsel değişikliklere yol açmakta ve bu durum stres olarak tanımlanmaktadır (Gonzalez-Parraga, 2008). Hücreler bu dış uyarıcılara duyarlı mekanizma geliştirmekte olup bu uyarıları uygun hücresel cevaba dönüştürmektedirler. Bu cevapların birçoğu, gen anlatımı, hücre yüzeyine veya sitoplazmaya yerleşmiş olan sinyal transdüksiyon yolu, nükleusdaki transkripsiyon faktörlerini aktive etmektedir. Stres cevabı çokça değişen çevrelerde mikroorganizmalar için oldukça önemlidir. Ancak bir çok yol için stres sinyallerinin nasıl algılandığı ve bu sinyallerin bu yoldaki bir sonraki bileşikle nasıl iletişim kurduğu tam olarak anlaşılmamaktadır. Bir kez çevresel değişim algılandığında sinyalin nükleusa iletilmesi gerekmektedir. Çok sayıda protein kinaz bu süreçte rol oynamaktadır. Bazı yollarda protein kinazlar, *MAP kinaz kaskad* ile organize olmaktadır. Sonuç olarak her bir yol bir ya da birden

fazla transkripsiyon faktörünü aktive etmektedir. Bu transkripsiyon faktörleride karakteristik gen setlerinin anlatımını düzenlemektedir. Bazı yollarda örneğin genel stres cevaplarında, transkripsiyon faktörleri stresle karşılaştıktan sonra nükleusta birikmektedir. Diğerlerinde ise, nükleositoplazmik translokasyon erkenden oluşmaktadır ve transkripsiyon faktörleri nükleusta aktif hale gelmektedir. Aktif olan transkripsiyon faktörleri, stresle düzenlenen genlerin promotor bölgelerinde yer alan *cis* elementine bağlanarak onların transkripsiyonunu indüklemektedir. Farklı streslere karşı % 10 ila % 14 arası gen indüklenmektedir. İndüklenen genler, karbonhidrat metabolizması, reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu, protein katlanması ve degradasyonu, vakuolar ve mitokondriyal fonksiyon, otofaji ve metabolit transport gibi süreçler de yer alan genlerdir (Chen ve ark., 2003).

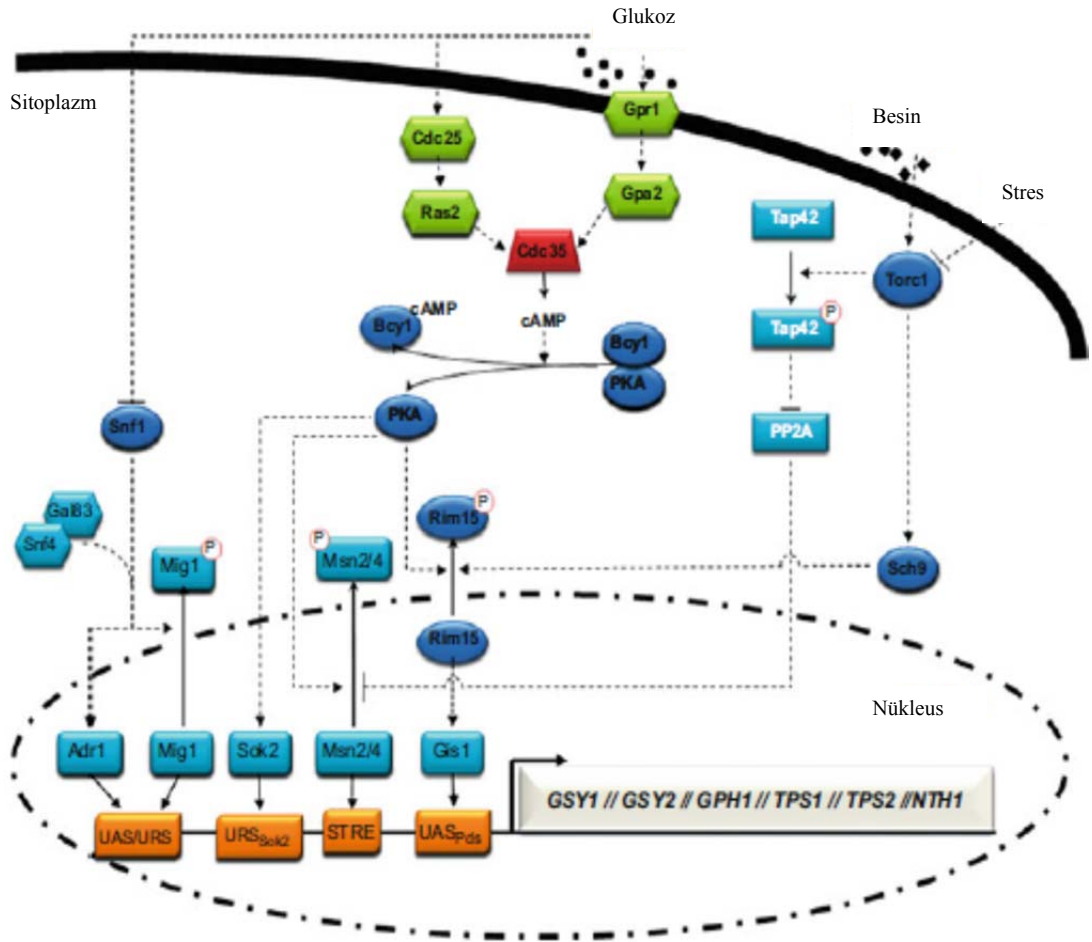
Bu süreçler arasında çarpıcı olanı stok karbonhidratları glikojen ve trehalozdaki değişimdir. Glikojen metabolizması mayadan memelilere oldukça korunmuştur. Bu korunma protein dizilerini ve enzimlerin katalitik mekanizmalarını ve enzim aktivitelerini içermektedir. Glikojen sentezi *GLG1* ve *GLG2* tarafından kodlanan başlangıç proteini ile başlamaktadır. Bu genler UDP-glukozdan α -(1,4) glukozil primerlerinin oluşumunu katalizlemektedir. Bu primerler glikojen sentaz ile uzamaktadır. Glikojen sentazın *GSY1* ve *GSY2* tarafından kodlanan iki izomeri bulunmaktadır. Glikojenin dallanma enzimi ise *GLC3* tarafından kodlanmaktadır. Gac1p ise defosforilasyon ile glikojen sentazı aktive eden protein-fosfataz kompleksinin bileşenidir. Glikojen fosforilaz ise *GPH1* tarafından kodlanmaktadır (Parrou ve ark., 1997).

Ekspansiyal gelişim aşamasında, glukoz ve fruktoz gibi hızlı fermente edilebilen şeker varlığında trehaloz, glikojen seviyesi ve stres direnci oldukça düşüktür. Glukoz tükendiğinde ve etanolde gelişim sırasında glikolitik akış ve genel protein sentez seviyesi azalırken glikojen, trehaloz ve stres proteinleri seviyesi artmaktadır. Aynı zamanda bunların miktarı glukoz içeren fakat azot, fosfat ve sülfat gibi temel besinler açısından zayıf bir ortamda da artmaktadır. Aynı durum sıcak şok, oksidatif stres için de geçerlidir (Winderickx ve ark., 1996; Sunnaborg ve ark., 2001; Mahmud ve ark., 2009; Parrou ve ark., 1999).

Stresle indüklenen birçok gende olduğu gibi trehaloz ve glikojen metabolizmasında yer alan genlerinin promotor bölgelerinde STRE (stres cevap elementleri) bulunmaktadır (Şekil 1.11). *S.cerevisiae* sıcak şok faktör geni *HSF1* bulundurmaktadır. *HSF* genleri normal koşullar altında düşük aktif formda transkribe edilerek stoklanmaktadır. Hsf1p'nin DNA bağlanma aktivitesi sıcak şok öncesinde HSE (sıcak şok elementi)'ye bağlanmak için yeterlidir. Sıcak şoktan sonra bu bağlanma artmaktadır. Mayalarda uyarıcılar sıcak şok cevaplarını tetiklemekte ve böylece trehaloz birikmesine sebep olmaktadır. Sıcak şok süresince *S. cerevisiae*'ya ait trehaloz-6- fosfat sentaz kompleksinin en az 2 alt ünitesi aktif olarak sentezlenmektedir. Trehaloz aminoasit, şeker ve polyollerinde dahil olduğu herhangi uyumlu bir çözücünden daha iyi bir protein dengeleyici olarak bilinmektedir. Trehalozun diğer bir özelliği zaten denatüre olmuş proteinlerin yığın oluşturmalarını önlemektir. Sıcak şok son bulduktan sonra trehaloz hızlı bir şekilde degrade olmaktadır. Eğer ortamda hala trehaloz yüksek miktarda bulunursa, bu durum proteinlerin tekrar katlanma sürecini engellemekte ve protein yeniden eski doğal halini kazanamamaktadır (Elbein ve ark., 2003; Gasch ve ark., 2000; Argüelles, 2000; Dashnau ve ark., 2007). Trehaloz sitozolde proteinleri katlamaktan ve bunun yanı sıra endoplazmik retikulum lümenindeki sıcaktan zarar görmüş proteinlerin konformasyonel onarımından da sorumludur (François ve Parrou, 2000).

Reaktif oksijen türleri (hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri ve süperoksit anyonları) (ROS) normal metabolik süreç tarafından oluşturulduğu gibi hidrojen peroksit ve ağır metallerle maruz kalındığında da oluşturulmaktadır. Lipidler, proteinler ve nükleik asitlerdeki zararı indüklemektedir. ROS'a cevap birçok genin indüklenmesini içermektedir ki bunlardan bazıları antioksidan fonksiyonludur. Oksidatif strese cavapta iki transkripsiyon faktörü Yap1p ve Skn7p oldukça önemlidir. Yap1p'nin düzenlenmesi ile ilgili bilgi Skn7p'ye göre oldukça fazladır. Normal koşullar altında Yap1p sitoplazmada sınırlıdır ve oksidatif strese cevap için nükleusta toplanmaktadır. Yap1p, üç korunmuş sistein kalanları ile C-terminal bölgesi içermektedir. Bu sistein kalanları Yap1p'nin sitoplazmada korunması için gerekmektedir. Nükleusta Yap1p, Ap-1 cevap elementine (ARE) bağlanmakta ve ARE birçok sayıda antioksidan savunma

geninin promotor bölgesinde bulunmaktadır. *yap1* ve *skn7* mutantları ile yapılan çalışmalar her ikisinin de oksidatif strese duyarlı olduğunu yalnız Yap1p'nin kadmiyum direncinde önemli olduğu gözlenmiştir. Aynı şekilde oksidatif stress ve ağır metal streslerine maruz kalan mayalarda trehaloz ve glikojen sentezlenlerinin uyarıldığı yapılan çalışmalarla gözlenmiştir (Gasch ve ark., 2000; Dashnau ve ark., 2007).



Şekil 1.11. *S. cerevisiae*'nin farklı stress koşullarında transkripsiyon şeması (François ve ark., 2012)

1.7.Pseudohifsel Gelişim

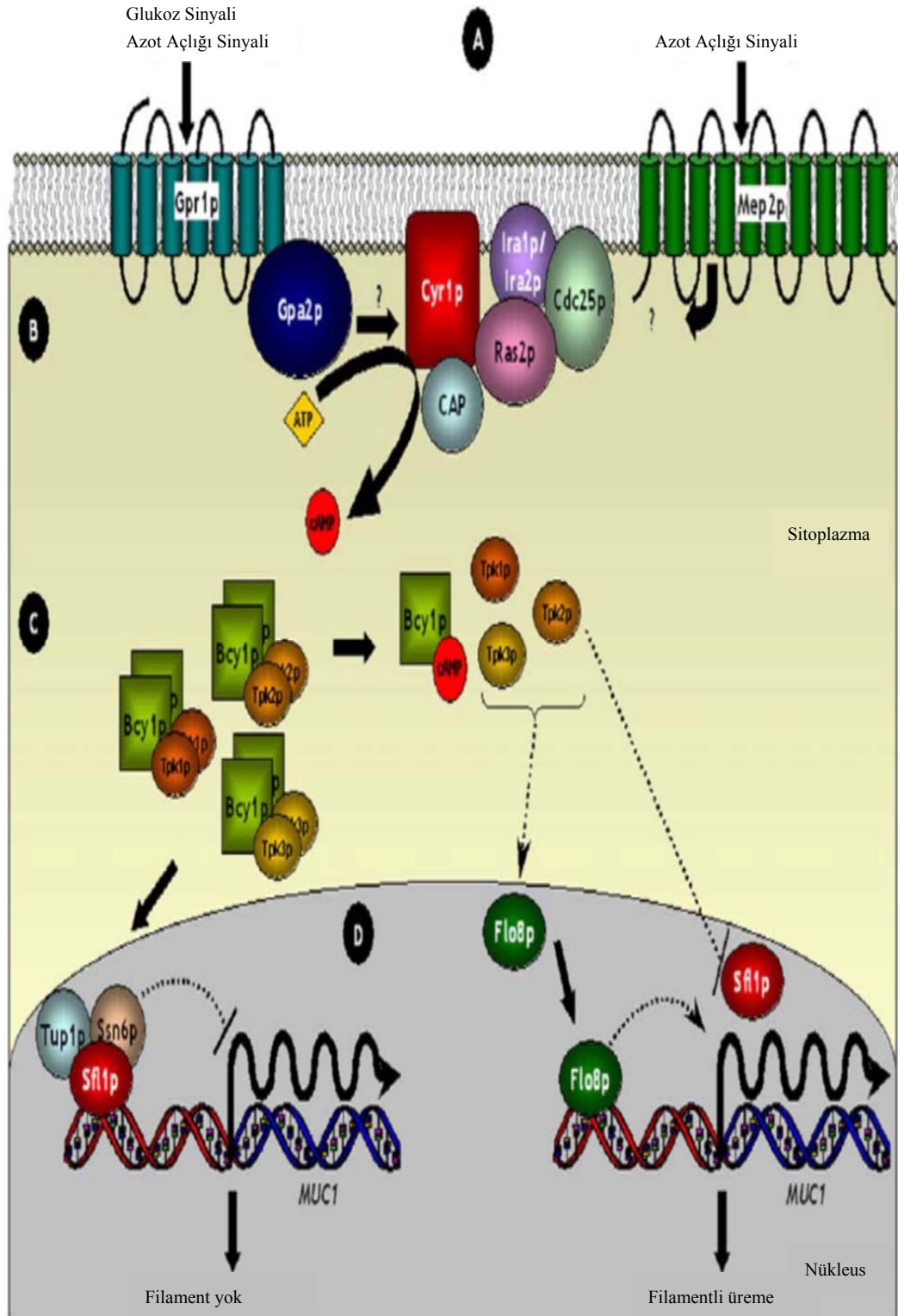
Mayalar çevrelerinde meydana gelen farklılıklara karşı bir takım değişim mekanizmaları geliştirmiştir ve bu değişim hücrenin fizyolojisinde, morfolojisinde ve adezyonunda gözlenmektedir. Besin maddelerindeki kritik azalmalar maya hücreleri gelişimini durdurarak spor oluşumunu sağlamakta ve böylece hücre çevresel stresi tolere etmeye çalışmaktadır. Alternatif yol ise hücrenin filamentli gelişimi tercih etmesidir. Filamentli gelişim önemli bir adaptasyon cevabı olarak kabul edilmektedir ve fonksiyon olarak hücre hareketliliğine benzer, açlık durumunda hücrenin besini araştırmasına olanak sağlar. Bu dimorfik değişim patojenik mayalarda hücre-hücre etkileşimini artırıp mayanın konakçısına daha kuvvetli tutunmasını sağlamaktadır. Bu şekildeki dimorfizm önemli bir virulans faktör olarak görülmekte olup *C. albicans*'da tesbit edilmiştir (Gagiano ve ark., 2002).

Maya hücrelerinde dimorfik gelişim daha önceleri de bilinmesine rağmen 1992'de Gimeno ve arkadaşlarının pseudohif oluşumunun azot açlığında oluştuğunu ve bu durumun filamentli gelişime olanak sağladığını belirlemesine kadar önemli bir durum olarak kabul edilmemekteydi (Gancedo, 2001). Pseudohifsel gelişim boyunca hücre uzamakta eş zamanlı olarak tomurcuklar oluşturmaktadır, tomurcuklar hücreden ayrılmadığından ve hücre zincir şeklinde dallanarak uzamaktadır. Bazı *S. cerevisiae* haploid suşlarda bu değişiklik katı besiyerinde kolonilerin altına doğru uzama şeklinde gözlenmekte ve invaziv gelişim olarak adlandırılmaktadır. Diploidlerde ise bu uzama biraz daha yüzeyseldir ve ikisi genel olarak pseudohifsel gelişim olarak isimlendirilmektedir. Bu morfogenetik değişim iki farklı sinyal yolunun iletişimini gerektirmektedir. Bu yollar cAMP bağımlı yol ve MAP kinaz (mitojen aktivasyonlu kinaz) yoludur. Bu değişimde merkez element GTP-bağılı protein Ras2'dir. Ras2 proteini *S. cerevisiae*'de filamentli üremeyi düzenleyen ilk anahtar proteindir. *MUC1* geninin anlatımını kontrol ederek filamentli üremeyi düzenlemektedir (Gancedo, 2001; Pan ve ark., 2000).

S. cerevisiae'da filamentasyonun kontrol edildiği yollardan biri cAMP yoludur. cAMP adenilat siklaz (Cyr1) tarafından oluşturulmakta ve cAMP-bağımlı protein kinaz A (PKA)'yı aktive etmektedir. Aktive olan Ras2, Cyr1 ile etkileşime geçmekte ve cAMP'ın hücre içi konsantrasyonu artmakta ve protein kinazları aktive etmektedir. PKA'nın aktifleşmesi ile karbonhidrat depoları kaybolmakta ve sporulasyon engellenmektedir. PKA'nın katalitik alt birimleri Tpk1, Tpk2 ve Tpk3 pseudohifsel gelişimde farklı roller oynamaktadır. Tpk1 ve Tpk3'ün filamentasyonu baskıladığı Tpk2'nin ise pseudohifsel üremeyi aktive ettiği farklı delesyon deneyleri ile gözlenmiştir. Tpk2'nin pseudohifsel gelişimde rol oynayan Sfl1 ve Mga1 ile etkileşimde olduğu gözlenmiştir. Pseudohifsel gelişimde rol alan diğer transkripsiyon faktörleri Skn7, Hsm2 olup Flo8 ile etkileşerek filament cevap elementleri (FREs) tarafından düzenlenen genlerin transkripsiyonunu indüklemektedir (Palecek ve ark., 2002; Pan ve ark., 2000) (Şekil 12).

Her iki yol Ras2 ile active olup *MUC1/FLO11* geninin ekspirasyonunu düzenlemektedir. *MUC1/FLO11*, diploid hücrelerin pseudohifsel gelişimi, haploid hücrelerin invaziv gelişimi için gerekli hücre yüzey flokülasyonunu kodlamaktadır. Genin anlatımı için Tec1, Ste12 ve Flo8 transkripsiyon faktörleri gerekmektedir (Gagiano ve ark., 2002).

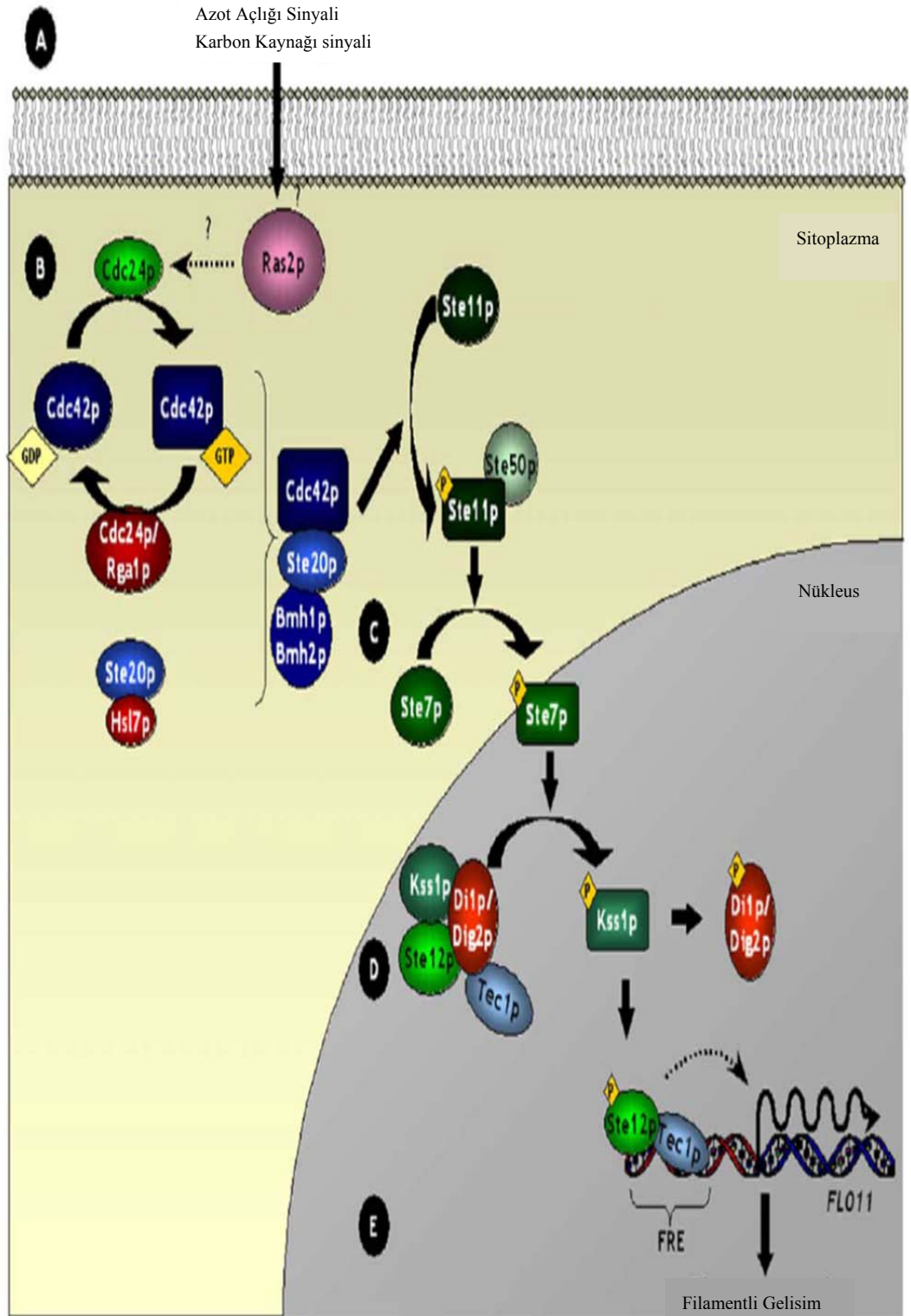
Maya formundan pseudohifsel gelişime geçen *S. cerevisiae* hücrelerinde hücre döngüsü boyunca da önemli değişiklikler olmaktadır. Maya formundaki hücrelerin tomurcukları maya hücresinin ucunda gelişirken daha sonra gelişme tüm yüzey boyunca gerçekleşmekte ve yavru hücre ana hücreden ayrılmaktadır. Sonuç olarak oluşan yeni hücre kritik büyüklüğe gelinceye kadar G1 fazında gelişimini devam ettirmektedir. Pseudohifsel gelişim boyunca uzatılmış G2/M fazı bulunmaktadır. Anne ve tomurcuğu ayıran bölme oluştuğunda yavru hücre ve anne hücre aynı boyuttadır böylece iki hücre yeni döngüye eş zamanlı olarak başlamaktadır (Gancedo, 2001).



Şekil 1. 12. *S. cerevisiae*'da filamentli üreme sinyal yolu (cAMP-PKA) (François ve ark., 2012)

Diploid hücrelerdeki pseudohifsel gelişim ve haploidlerdeki invaziv gelişimin benzer gereksinimleri bulunmaktadır. Her ikisinde de MAP kinaz yolu ve PKA yolu aynı rolü oynamaktadır. Ancak iki farklı tip hücrede bu iki farklı yolun düzenlenmeleri farklılık göstermektedir. Haploid hücrelerde *MUC1/FLO11* mRNA seviyesi YPD’de eksponansiyel fazda artar. Gelişmenin diğer fazlarında çok düşük seviyelere inerken, diploid hücrelerde mRNA seviyesi her zaman düşük kalmaktadır. SLAD besiyerinde ise *MUC1/FLO11* mRNA seviyesi diploidlerde durmadan artar. Haploidlerde gelişmenin birinci saati artarken sonrasında aniden düşmektedir (Palecek ve ark., 2002; Gagliano ve ark., 2002).

MAP kinaz yolu ise pseudohifsel gelişim için bir çok element bulundurmaktadır ve bunlar diploid hücrelerin filamentli gelişimi ve haploid hücrelerin invaziv gelişimi için gereklidir. Yeterli sinyalin alınması ile Ras2 aktive olmakta ve guanine nükleotid değiştirme faktörü Cdc24’ü aktif hale getirmektedir. Cdc24’ün aktif hale getirdiği Cdc42 artık GTP bağlıdır. Aktif olan Cdc42 protein kinaz Ste20 ile etkileşime geçmekte ve Ste20’ye bağlı negatif düzenleyiciyi uzaklaştırmaktadır. Bu yolda Ste20p, Ste11p, Ste7p ve Kss1p’den oluşan MAP kinaz kaskadını aktif hale getirebilmektedir. Kss1 MAP kinaz yolunun özgül faktörüdür ve pseudohifsel gelişimi aktive ya da inhibe edebilmektedir. MAP kinaz kaskadın (Ste20p-Ste11p-Ste7p) fonksiyonu Kss1 I inhibitörden aktivatöre dönüştürmektir. Fosforillenmeyen Kss1 Ste12’ye bağlanarak onun transkripsiyon aktivitesine engel olarak pseudohifsel gelişimi önlemektedir. Diğer bir özgül faktör Ste12 olup transkripsiyon faktörüdür ve bu yolda son istasyondur denilebilir. Ste12, bir başka transkripsiyon faktörü Tec1 ile birlikte filament cevap elementleri (FREs) tarafından düzenlenen genlerin transkripsiyonunu indüklemektedir (Şekil 1.13) (Gancedo, 2001; Palecek ve ark., 2002; Gagliano ve ark., 2002).



Şekil. 1.13. *S. cerevisiae*'da filamentli üreme sinyal yolu (MAPK) (François ve ark., 2012)

Dimorfizm bir çok mayada gözlenirken yoğun olarak *S. cerevisiae* ve *C. albicans* ile çalışılmıştır. *C. albicans*'da da pseudohif oluşumunda MAP kinaz yolu rol oynamaktadır. *S. cerevisiae*'daki *STE20*, *STE7* ve *KSS1* genlerinin *C. albicans*'daki fonksiyonel homologları *CST20*, *HST7* ve *CEK1*'dir. Bu genlerdeki delesyon *C. albicans*'ın katı besiyerinde hif oluşumunu engellerken serumda *Candida* hifi oluşumu engellenememiştir. *C. albicans*'daki filamentli gelişim azot açlığı, sıcaklık artışı ve pH gibi çeşitli streslerden etkilenmektedir. *Y. lipolitica*'da ise Mhy1 proteini STRE dizisine bağlanarak filamentli gelişime geçişi sağlamaktadır (Palecek ve ark., 2002).

S. cerevisiae'da olduğu gibi morfogeneze karışmış olan farklı genler farklılaşmayı dolaylı yolla etkileyebilmektedir. Örneğin *C. albicans* *TPS1* geninde meydana gelen bir bozulma glukoz varlığında 37 °C'de; galaktoz ve gliserol varlığında ise 42 °C'de hif oluşumunu engellemektedir. Birinci durum glukoz metabolizmasındaki değişimden dolayı olabileceği gibi ikinci durum yüksek sıcaklıkta trehaloz olmadığı bir durumda korunmak amaçlı reflekstir (Gancedo, 2001).

2.MATERYAL

2.1.Materyal

2.1.1.Çalışmada kullanılan mayalar

Çalışmalar süresince kullanılan *Candida albicans* ATCC 14053, *S. cerevisiae* FY2, *S. cerevisiae* (*Areg1*), *S. cerevisiae* Σ 1278b suşları Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden elde edilmiştir. *Candida rugosa* NRRL-Y-95, *Metschnikowia fructicola* NRRL-Y-27328, *Pichia stipitis* NRRL-Y-8209, *Yarrowia lipolytica* NRRL-Y-1095, *Zygosaccharomyces bailii* NRRL-Y-2227, *Zygosaccharomyces rouxii* NRRL Y-229 suşları ise Agricultural Research Service (ARS)'den elde edilmiştir.

Çalışmada kullanılan ve vajenden izole edilen izolatlar *maya1*, *maya2*, *maya3* ve *maya4* olarak adlandırılmıştır.

S. cerevisiae'da trehaloz ve glikojen birikimi ile ilgili çok sayıda araştırma olduğu için, *S.cerevisiae* (*Areg1*) yoğun glikojen üretimi, *Saccharomyces cerevisiae* Σ 1278b ise yoğun pseudohifsel gelişimi nedeni ile kontrol suşlar olarak tercih edilmiştir.

2.1.2.Çalışmada kullanılan çözeltiler

0.25 M Na₂CO₃ çözeltisi

Na ₂ CO ₃	26.5 g
Distile su	1000 mL

0.25 M Na₂CO₃ çözeltisi hazırlamak için 26.5 g Na₂CO₃ toplam hacim 1000 mL olacak şekilde distile suda çözülmüş ve otoklavda (Hirayama HV-50L)

121 °C’de 15 dak. 1.5 atm basıncında steril edildikten sonra kullanılmıştır (Parrou ve ark., 1997).

1M Asetik asit çözeltisi

Asetik asit 57.7 mL

Distile su 1000 mL

1M asetik asit çözeltisi hazırlamak için % 99’ luk asetik asit stok çözeltisinden ($M=60.05 \text{ g / mol}$) 57.7 mL asetik asit alınarak toplam hacim 1000 mL olacak şekilde steril distile suda çözülerek hazırlanmıştır (Parrou ve ark., 1997).

0.2 M Sodyum asetat çözeltisi

Sodyum asetat 27.2 g

Distile su 1000 mL

0.2 M sodyum asetat çözeltisi için 27.2 g sodyum asetat toplam hacim 1000 mL olacak şekilde distile suda çözülmüş ve otoklavda (Hirayama HV-50L) 121 °C’de 15 dak. 1.5 atm. basıncında steril edilerek kullanılmıştır (Parrou ve ark., 1997).

α -Amiloglukosidaz (Sigma A-7420)

α -amiloglukosidaz 0,0037 g

0.2 M Sodyum asetat çözeltisi 200 μ L

α -Amiloglukosidaz liyofilize enzim olarak satın alınmıştır. Çalışmalardan önce her seferinde 0.0037 g α -amiloglukosidaz steril 200 μ L 0.2 M sodyum asetat (CH_3COONa) çözeltisinde çözülerek hazırlanmış ve deneylerde kullanılmıştır (Parrou ve ark., 1997).

Trehalaz (Sigma T-8778)

Enzim direkt olarak 3 mU olacak şekilde kullanılmış olup deneyler süresince -20 °C’ de saklanmıştır (Parrou ve ark., 1997).

Stok glukoz, gliserol ve asetik asit çözeltileri

Glukoz, gliserol ve asetik asit çözeltileri % 20 (w/v) olacak şekilde distile suda çözülerek hazırlanmış ve 121 °C’ de 15 dak. 1.5 atm. basıncında otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır. Sterilizasyondan sonra YPD (Yeast Pepton Dextrose) besiyeri için stok glukoz çözeltisinden son konsantrasyon % 2 olacak şekilde glukoz besiyerine ilave edilmiştir. YPG (Yeast Pepton Gliserol) besiyeri için stok gliserol çözeltisinden son konsantrasyon % 2 olacak şekilde gliserol besiyerine ilave edilmiştir. YPAA (Yeast Pepton Asetik asit) besiyeri için ise stok asetik asit çözeltisinden son konsantrasyon % 2 olacak şekilde besiyerine ilave edilmiştir (Türkel, 2005).

TBE buffer (5X)

Tris Base	54 g
Borik asit	27.5 g
EDTA (0.5M)	20 mL (pH:8.0)

İçeriği belirtilen solüsyon 1000 mL’de çözünerek hazırlanmış olup moleküler analizlerde kullanılmıştır.

2.1.3.Besiyerleri

Yeast Extract, Pepton (YP)

Yeast Extract	10 g
Peptone	20 g
D. su	1000 mL

Belirtilen besiyeri içeriğine göre hazırlanıp 121 °C’ de 15 dak. 1.5 atm. basıncında otoklavlanarak (Hirayama HV-50L) steril edilmiştir. Hazırlanan besiyeri, zengin içerikli besiyeri olarak çalışmalarda kullanılmıştır (Rose ve ark., 1990).

Yeast extract glucose chloramphenicol agar (YGC Agar) (HIMEDIA)

Yeast Extract	5 g
Glukoz	20 g
Kloromfenikol	0.1 g
Agar	15 g

İçeriği verilen ticari besiyeri 1000 mL’ de 40.10 g olacak şekilde tartılarak 121 °C’de 15 dak. 1.5 atm. basıncında otoklavlanarak (Hirayama HV-50L) steril edildikten sonra izolasyon çalışmasında kullanılmıştır (Deak ve Beuchat, 1996).

Yeast nitrogen base (YNB)(Y-1251)

Ticari olarak satılan *YNB* besiyeri 1000 mL’ de 1.7 g olacak şekilde tartıldıktan ve filtre (0.2 µm) sterilizasyonu yapıldıktan sonra kullanılmıştır (Rose ve ark., 1990).

Synthetic low ammonium dextrose (SLAD)

YNB (azotsuz ve aminoasitsiz) 1.7 g

10 mM Amonyum Sülfat 5 mL

Belirtilen maddeler toplam hacim 1000 mL olacak şekilde distile suda çözülmüş ve 121 °C’de 15 dak. 1.5 atm. basıncında otoklavda (Hirayama HV-50L) steril edilmiştir. Sterilizasyonun ardından karbon kaynağı olarak steril % 20’lik glukoz çözeltisinden son konsantrasyon % 2 olacak şekilde glukoz ilave edilmiştir (Gimeno ve ark., 1992).

2.2.Kullanılan Kitler

Glukoz tayin kiti: Glukoz Oksidaz Peroksidaz Kit (Glucose-TR) (Spinreact)

DNA izolasyon kiti: High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)

Saflaştırma kiti: QIA Quick Gel Extraction Kit (Qiagene)

RNA izolasyon kiti: Qiagene RNeasy Mini Kit

Reverse transkriptaz kiti: Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesi Kit (Roche)

SybrGreen Master Mix: Fast Start Essential DNA Green Master Mix (Roche)

3.METOD

3.1.Araştırmada Kullanılan Maya Suşları ve Üretilmeleri

3.1.1.Araştırmada kullanılan izolatların saflaştırılması

Çalışmada identifikasyonları yapılmak amacı ile daha önce vajan kültürlerinden izole edilen ve Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Labaratuvarı'nda stok halinde bulunan örnekler öncelikle YPD sıvı besi ortamında canlandırılmış ve YGC Agar (HIEDIA) besiyerine inokülasyonu yapılarak 30 °C'de 3-4 gün boyunca inkübe (Nüve EN 500) edilmiş ve saf olarak elde edilmiştir (Samson ve ark., 2004). İnkübasyon sonunda saf olarak elde edilen mayalar YPD Agar petrilere pasajlanmıştır. Bu şekilde saflaştırılmış olan izolatlar +4 °C'de muhafaza edilmiş ve ayrıca % 20 gliserolde -70 °C'de stoklanmıştır. Daha sonra izolatların sekans analizi yöntemi ile türleri belirlenmiştir.

3.1.2.Araştırmada kullanılan suşların üretilmeleri

Bu çalışmada kullanılan maya suşları liyofilize halde elde edildiğinden YPD besiyerinde canlandırılmıştır. YPD sıvı ortamda canlandırılan bu kültürler YPD Agar petrilere 30 °C'de geliştirilmiştir. Mayalar aynı besiyerinde +4 °C'de ve % 20'lik gliserolde -70 °C'de stoklanarak araştırmalar süresince kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan tüm suşlar rutin amaçlar için standart yöntem kullanılarak çalkalamalı inkübatörde (İnnova 44) 30 °C'de, 135 rpm'de YPD besi ortamında üretilmiştir (Rose ve ark., 1990). Yapılan araştırmalar farklı karbon kaynakları gerektirdiğinde YPG (% 1 maya özütü, % 2 pepton, % 2 gliserol) ve YPAA (% 1 maya özütü, % 2 pepton, % 2 asetik asit) besiyerleri kullanılmıştır (Rose ve ark., 1990).

Bazı araştırmalar maya hücreleri minimal ortamda üretilerek yapılmıştır. Minimal ortam için Yeast Nitrogen Base (YNB) (amino asitsiz ve amonyum s lfatsız) kullanılmıştır (Rose ve ark., 1990). Farklı azot kaynakları gerektiğinde % 0.1 prolin ve % 0.1 üre kullanılmış olup oksidatif stres çalışmalarında besiyerindeki son konsatrasyonu 40  mol olacak şekilde menadion eklenmiştir. Metal stresi deneylerinde ise üreme ortamına son konsantrasyon 0.1 mM olacak şekilde herbir metal çözeltisinden eklenmiştir (Parrou ve ark., 1999; Todorova ve ark., 2009).

3.2.Glikojen ve Trehaloz  l  mleri

Glikojen ve trehaloz birikimlerini belirleyebilmek için YPD sıvı besiyerinde geliştirilen mayaların 30  C’de 135 rpm’de 10 mL’lik başlangıç kültürleri hazırlanmıştır. 16 saat boyunca geliştirilen hücrelerden başlangıç yoğunlukları yaklaşık olarak $OD_{600}=0.2$ olacak şekilde, 20 mL’lik taze besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. Hücreler 30  C 135 rpm’de karbondhidrat a lı ı, azot a lı ı, sıcaklık, oksidatif stres ve metal stresleri gibi farklı stres koşullarına maruz bırakılmıştır. 8000 rpm’de 15 dak. santrifüj (Heraus Biofuge Stratos) edilerek çöktürülen hücrelerin süpernatantları uzaklaştırıldıktan sonra bir kez 1 mL steril saf su ile yıkanmış ve yaş ağırlıkları belirlendikten sonra -80  C’de trehaloz ve glikojen ölçümleri yapılcaya kadar muhafaza edilmiştir.

Trehaloz ve glikojen tayini için -80  C’den çıkarılan hücrelerin oda sıcaklığına gelmeleri sağlanmış ve 12.800 g’de santrifüj (Eppendorf 5415R) edilerek eppendorf tüplerindeki su tamamen uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin yer aldığı eppendorf tüplerine 0.25 M Na_2CO_3 çözeltisinden 250  L eklenmiştir. Hücreler parçalanmaları için su banyosunda (Julabo TW20) 95  C’de 2 saat boyunca zaman zaman karıştırılarak inkübe edilmiştir. Su banyosundan çıkarılan hücre lizatının içerisine 1 M asetik asitten 150  L ve 0.2 M NaOAc’dan 600  L eklenerek toplam 1 mL hücre lizatu elde edilmiştir. Trehaloz ve glikojen ölçümü için hücre lizatu iki eşit parçaya bölünmüş olup glikojen ölçümü için 500  L’lik ilk kısıma 100  g α -amiloglikosidaz enzimi (sigma A-7420) ilave edilip 57  C’de 18 saat inkübe (Nüve EN500) edilmiştir, 500  L’lik ikinci süspansiyona ise trehaloz

miktarını belirleyebilmek için 3mU trehalaz enzimi (sigma, T-8778) ilave edilerek 37 °C’de 18 saat süre ile inkübasyona (Nüve EN500) bırakılmıştır (Parrou ve François, 1997). İnkübasyondan sonra hücre ve enzim süspansiyonu 12.800 g’de santrifüj (Eppendorf 5415R) edilmiş ve süpernatant kısımları kullanılarak glukoz oksidaz-peroksidaz (GOD-POD) kiti ile enzimatik reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan glukoz miktarı kit protokolüne uygun olarak belirlenmiştir (Goldstein ve Lampen, 1975). Süpernatantan 20 µL alınarak 980 µL GOD-POD enzim karışımı içerisine eklenmiş, 30 °C’de 30 dak. su banyosunda (Julabo TW20) bekletilmiş ve daha sonra spektrofotometrede (Beckman Coulter DU 530) OD₅₄₆’da absorbanları ölçülerek standart glukoz çözeltisine göre glukoz miktarı belirlenmiştir. Glukoz miktarları mayaların yaş ağırlıkları ile normalize edilerek sonuçlar kaydedilmiştir. Deneyler aynı şartlarda 4 kez tekrarlanmıştır.

3.3.Zamana Bağlı Trehaloz ve Glikojen Miktarının Belirlenmesi

C. albicans, *C. rugosa*, *M. fructicola*, *P. stipitis*, *Y. lipolytica*, *Z. bailii*, *Z. rouxii*, *S.cerevisiae* ve *S. cerevisiae* (*Δreg1*)’in zamana bağlı glikojen ve trehaloz birikimlerini belirleyebilmek için öncelikle mayaların 10 mL YPD sıvı besiyerinde 30 °C’de 135 rpm’de 16 saatlik inkübasyon (İnnova 44) sonucu başlangıç kültürleri hazırlanmıştır. Başlangıç yoğunlukları yaklaşık olarak OD₆₀₀=0.2 olacak şekilde taze besiyerine (YPD) inokülasyonları yapılmış olan maya hücreleri 30 °C’ de 135 rpm’ de inkübasyona (İnnova 44) bırakılmış ve 6, 12, 24, 48, ve 72. saatlerde yaklaşık olarak 50-60 mg (yaş ağırlık) maya spektrofotometrik olarak belirlenerek ortamdan alınmış 8000 rpm’de 15 dak. santrifüj (Heraus Biofuge Stratos) edilmiştir. Süpernatantları ortamdan tamamen uzaklaştırıldıktan sonra iki kez 1mL steril distile su ile yıkanan hücrelerin yaş ağırlıkları belirlenmiş ve kısım 3.2’de belirtilen enzimatik yöntem ile trehaloz ve glikojen ölçümleri yapılmaya kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.4.Karbonhidrat Açlığının Glikojen ve Trehaloz Birikimine Etkisinin Belirlenmesi

Maya suşlarının besiyerinde oluşturulan karbonhidrat açlığında biriktirdiği trehaloz ve glikojen miktarı araştırılmıştır. Araştırmada karbon kaynağı olarak glukoz yerine % 2 gliserol ve % 2 asetik asit olmak üzere iki farklı karbon kaynağı kullanılmıştır. Son konsantrasyonlarında ayrı ayrı % 2 gliserol ve % 2 asetik asit bulunan 10 mL'lik YP besiyerlerinde başlangıç kültürü hazırlanan hücreler aynı içerikli 25 mL taze YP besiyerine $OD_{600}=0.2$ olacak şekilde inoküle edilmiş ve 30 °C'de 135 rpm'de inkübasyona (İnnova 44) bırakılmıştır. $OD_{600}=0.8$ 'de toplanan hücreler 8000 g'de 15 dak. santrüfuj edilmiş ve iki kez 1mL steril distile su ile yıkandıktan sonra yaş ağırlıkları hesaplanarak -80 °C'de kısım 3.2'de belirtilen enzimatik yöntem ile trehaloz ve glikojen ölçümleri yapılmaya kadar muhafaza edilmiştir.

3.5.Azot Açlığının Glikojen ve Trehaloz Birikimine Etkisinin Belirlenmesi

Maya suşlarının azot açlığı ortamında trehaloz ve glikojen birikimlerini belirleyebilmek için (amonyum fosfat ve aminoasit içermeyen) Yeast Nitrogen Base (YNB) besiyeri kullanılmış olup azot kaynağı olarak son konsantrasyonlarında ayrı ayrı % 0.1 prolin ve % 0.1 üre olmak üzere farklı iki azot kaynağı içeren iki farklı besi yeri hazırlanmıştır. Maya hücrelerinin 10 mL'lik % 0.1 prolin içeren ve 10 mL'lik % 0.1 üre içeren besiyerlerinde gecelik kültürleri hazırlanmış olup, aynı içerikli 25 mL taze besiyerine $OD_{600}=0.2$ olacak şekilde inokülasyonları yapılmıştır. 30 °C'de 135 rpm'de inkübasyona (İnnova 44) bırakılan ve logaritmik fazda toplanan hücreler 8000 g'de 15 dakika santrifuj (Heraus Biofuge Stratos) edildikten sonra süpernatantları uzaklaştırılmış ve iki kez 1mL steril distile su ile yıkanıp yaş ağırlıkları belirlenmiştir. Hücreler trehaloz ve glikojen miktar tayinleri kısım 3.2'de belirtilen enzimatik yöntem ile belirleninceye kadar -80 °C'de muhafaza edilmişlerdir.

3.6.Oksidatif Stresin Trehaloz ve Glikojen Birikimine Etkisinin Belirlenmesi

Oksidatif stresin maya suşları üzerindeki trehaloz ve glikojen birikimine etkisini araştırmak üzere 10 mL YPD besiyerinde 16 saat boyunca geliştirilen hücreler 25 mL YPD taze besiyerine $OD_{600}=0.2$ olacak şekilde inoküle edilmiştir ve 30 °C’de 135 rpm’de pre-log faza ($OD_{600}=0.5$) gelinceye kadar inkübasyona (İnnova 44) bırakılmıştır. Maya hücrelerinin yoğunlukları $OD_{600}=0.5$ olduğunda ortama son konsantrasyon 40 μ M olacak şekilde menadion ilave edilmiş (Todorova ve ark., 2009) olup 4 saat boyunca 30 °C’de 135 rpm’de inkübasyona (İnnova 44) bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda maya kültürleri 8000 g’de 15 dak. santrifüj edilerek çöktürülmüş olup iki kez 1mL steril distile su ile yıkanan mayaların yaş ağırlıkları belirlenmiştir. Hücreler kısım 3.2’de belirtilen enzimatik yöntem ile trehaloz ve glikojen içerikleri belirleninceye kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.7.Sıcaklık Stresinin Trehaloz ve Glikojen Birikimine Etkisinin Belirlenmesi

Sıcaklık stresinin mayalardaki trehaloz ve glikojen birikimine etkisini belirlemek amacı ile test mayaları 10 mL YPD besiyerinde 25 °C 135 rpm’de 16 saat geliştirilen hücrelerden 25 ml taze YPD besiyerine $OD_{600}=0.2$ olacak şekilde iki seri inokülasyon yapılmış ve 25 °C’de 135 rpm’de 1.5 saat boyunca inkübasyona (İnnova 44) bırakılmışlardır. Bir seri hücre 25 °C’den alınarak sıcaklık şoku oluşturulmak üzere 39 °C’de inkübe (innova 44) edilmiştir (Parrou ve ark., 1997). Diğer seri hücre kontrol grubu olarak 25 °C’de geliştirilmeye devam edilmiştir. Farklı sıcaklıklarda 4 saat boyunca inkübe edilen ve bu süre sonunda 8000 g’de 15 dak. santrifüj (Heraus Biofuge Stratos) edilen maya hücreleri süpernatantları uzaklaştırıldıktan sonra 2 defa 1mL steril distile su ile yıkanmıştır. Kısım 3.2’de belirtilen enzimatik yöntem ile trehaloz ve glikojen içerikleri belirleninceye kadar -80 °C’de muhafaza edilmişlerdir.

3.8.Metal Stresinin Trehaloz ve Glikojen Birikimine Etkisinin Belirlenmesi

Maya suşlarının farklı metal streslerinde trehaloz ve glikojen birikimlerini belirleyebilmek amacı ile maya suşları 10 mL YPD besiyerinde 16 saat geliştirildikten sonra 25 mL taze besiyerine $OD_{600}=0.2$ olacak şekilde inoküle edilmiş ve 30 °C’de 135 rpm’de inkübasyona (İnnova 44) bırakılmıştır. Maya kültürlerine 1.5 saatin ardından son konsantrasyonu 0.1 mM olacak şekilde $Fe_2(SO_4)_3$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $MgSO_4$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $CdCl_2$ çözeltileri eklenmiş olup 4 saat boyunca 30 °C’de 135 rpm’de inkübasyona (İnnova 44) bırakılmıştır. Kontrol olarak aynı mayalar YPD besiyerinde metal stresi uygulanmadan 30 °C’de 135 rpm’de ve deney grubu ile aynı sürelerde geliştirilmiştir. 4 saat sonunda toplanan deney grubu ve kontrol grubu mayalar 8000 g’de 15 dak. santrifüj (Heraeus Biofuge Stratos) edilmiştir. Her bir kültürün besiyerleri uzaklaştırıldıktan sonra 1 mL steril distile su ile iki kez yıkanan mayaların yaş ağırlıkları belirlenmiştir. GOD-POD kiti ile kısım 3.2’de belirtilen yöntem kullanılarak trehaloz ve glikojen içerikleri belirleninceye kadar -80 °C’de muhafaza edilmişlerdir.

3.9.Pseudohifsel Gelişimin Trehaloz ve Glikojen Biriminine Etkisinin Belirlenmesi

Maya suşları 10 mL YPD besiyerinde 16 saat boyunca geliştirildikten sonra 25 mL SLAD (Synthetic Low Ammonium Dextrose) besiyerine $OD_{600}=0.2$ olacak şekilde inoküle edilmişlerdir (Gimeno ve ark., 1992). Ayrıca pseudohifsel gelişimi tetiklemek amacı ile SLAD ortamına son konsantrasyon % 1 olacak şekilde iso-propanol eklenmiştir (Lorenz ve ark., 2000). Maya suşları 30 °C’de 135 rpm’de inkübe (İnnova 44) edilmiştir. SLAD’da geliştirilen seriye paralel olarak kontrol olarak aynı mayalar YPD besiyerinde ve aynı koşullarda (30 °C-135 rpm) geliştirilmiştir. 24, 36, 48 ve 72. saatlerde her iki seriden örnekler alınarak pseudohifsel gelişim ışık mikroskobu ile takip edilmiş ve fotoğraflanmıştır (Şekil 4.14).

Maya suşlarının kontrol serilerinden ve SLAD besiyerinden toplanan örnekler pseudohifsel gelişmenin trehaloz ve glikojen birikimlerine etkisini araştırmak üzere 8000 g'de 15 dak. santrifüj (Heraus Biofuge Stratos) edilerek çöktürülmüş yaş ağırlıkları belirlendikten sonra kısım 3.2'de belirtilen yöntem ile enzimatik tayini yapılmaya kadar -80 °C'de muhafaza edilmişlerdir.

3.11.İzole Edilen Mayaların İdentifikasyonlarının Yapılması

DNA izolasyonu için Roche High Pure PCR Template Preparation Kiti üretici firmanın belirttiği şekilde kullanılmıştır. İzole edilen 4 maya suşuna *Maya1*, *Maya2*, *Maya3*, *Maya4* şeklinde kod numaraları verilmiştir. İzolatlar YPD Agar besiyerinde 30 °C'de 2 gün boyunca geliştirilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda toplanan bir öze dolusu örnek 100 µL 1x PBS'de ependorflar içerisinde süspanse edilmiştir. Vortekslenen (Heidolph Reax Control) hücre süspansiyonu -80 °C'de 7 dak. bekletilerek fiziksel parçalanma uygulanmıştır. Ependorftaki maya hücreleri üzerine 200 µL bağlanma tamponu ve 20 µL proteinaz K (100 mg/mL) eklenerek ters düz edilen pelletler su banyosunda (Julabo TW20) 10 dak. 72 °C'de inkübe edilmiştir. Örnekler karışım toplama tüplerinin içerisine konan filtreler üzerine aktarılmış ve 1 dak. 8000 g'de santrifüj (Eppendorf 5415R) edilmiştir. Yeni toplama tüplerine aktarılan filtreler üzerine 500 µL inhibitör uzaklaştırma tamponu eklenmiştir. 1 dak. 8000 g'de santrifüj (Eppendorf 5415R) yapıldıktan sonra yeni toplama tüplerine aktarılan filtreler üzerine 450 µL yıkama tamponu aktarılmıştır. Hücreler tekrar 1 dak. 8000 g'de santrifüj (Eppendorf 5415R) edilmiş ve bir kez daha 450 µL yıkama tamponu eklendikten sonra 10 sn 13.000 g'de santrifüj (Eppendorf 5415R) edilmiştir. Yeni ependorflara aktarılan filtreler ortamdaki alkolün uzaklaşması için kapakları açık olarak 5 dak. bekletilmiş ve daha önceden su banyosunda (Julabo TW20) 72 °C'de ısıtılan elüsyon çözeltisinden 50 µL filtreler üzerine aktarılmıştır. Kapakları kapalı olarak 2 dak. kadar bekletilen ependorf içerisindeki filtreler 1dak. 8000 g'de santrifüj (Eppendorf 5415R) edilerek DNA'ların elüsyon buffer ile birlikte ependorflarda toplanması sağlanmıştır. DNA örnekleri 1 kb marker eşliğinde 6X lik yükleme

boyası ile 3 µL hacminde 50 mg/mL etidium bromür içeren % 1'lik agaroz jele yüklenerek 1X TBE tamponunda 90 V'da 40 dak. yürütme işleminden sonra UV transilluminatörde (Uvitec) incelenerek, -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.12.İncelenecek Gen Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Amplifikasyonu

Türlerin tanımlanması ve belirlenmesi için mayalar için tanımlanan evrensel primerler ITS1-ITS4 (White ve ark., 1990) kullanılmış olup ITS1-5.8S rDNA-ITS2 gen bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmışdır. PZR için 1 µL kalıp DNA olmak üzere 2.5 µL Taq polimeraz tamponu, 2.5 µL 25mM MgCl₂, 2 µL dNTP karışımı (2mM; dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2'şer µL primer (Çizelge 3.1), 0.3 µL Taq polimeraz (5 U/ µL) ve 12.7 µL steril distile su olmak üzere toplam hacmi 25 µL olan reaksiyon karışımı kullanılmıştır. Reaksiyonlar için Bio-Rad i-cycler ve Techne TV-5000 Thermal Cyclerlar kullanılmış olup PZR reaksiyonunda aşağıda verilen çoğaltım ajanları ve süreleri uygulanmıştır.

95 °C de 2 dak.

35 döngü

94 °C 40 sn

55 °C 40 sn

72 °C 1 dak

72 °C 5 dak

4 °C süresiz

Elde edilen PZR ürünleri 1 kb marker eşliğinde 6X lik yükleme boyası ile 3 µL hacminde 50 mg/mL etidium bromür içeren % 1'lik agaroz jele yüklenerek 1X TBE tamponunda 90 V'da 40 dak. yürütme işleminden sonra UV transilluminatörde (Uvitec) incelenmiştir.

Çizelge 3.1. ITS1-ITS4 primerler

ITS1 primerinin nükleotid dizisi:	5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS4 primerinin nükleotid dizisi:	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

3.11.PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

PZR ürünlerinin saflaştırılması için QIA Quick Gel Extraction Kit protokolü uygulanmıştır. Bu amaçla % 1'lik agaroz jelde yürütülen 15 µL'lik PZR örneği UV transilluminatörde (Uvitec) gözlenerek, band steril bistüri ile agaroz jelden kesilmiştir. Kesilen jel parçası daha önceden darası alınmış ependorflara aktarılmış ve ağırlığı belirlenmiştir. 1 birim jele 1 birim membran bağlama solüsyonu eklenmiştir. 50 °C'de 10 dak. su banyosunda (Julabo TW20) bekletilen agaroz parçalarının tamamen erimesi sağlanmış ve bu süre içerisinde örneklerin tamamen çözünmesi için 2-3 dakikada bir vortekslenmiştir (Heidolph Reax Control). Her bir örnek 2 mL toplama tüpüne yerleştirilen QIA quick spin kolona aktarılmış ve 1 dak. 13.000 rpm'de santrifüj (Eppendorf 5415R) edilmiştir. Yeni toplama tüplerine aktarılan kolon üzerine yeniden 500 µL bağlama tamponu eklenmiş ve 1 dak. 13.000 rpm'de santrifüj (Eppendorf 5415R) yapılmıştır. Yeni toplama tüplerine aktarılan kolona 750 µL membran yıkama solüsyonu ilave edilerek 3 dak. bekleme süresinin ardından 1 dak. 13.000 rpm'de santrifüj (Eppendorf 5415R) yapılmıştır. Tekrar 1 dak. 30 sn. santrifüjleri (Eppendorf 5415R) yapılan kolonlar ependorflara aktarılmıştır. Ortamdaki alkolün

uzaklaştırılması için ependorfların kapakları açık olarak 2-3 dak. bekletilmiştir. PZR ürününü elue etmek için 50 µL elüsyon buffer kolonun merkezine aktarılmış ve kolon ağzı kapalı olarak 1 dak. bekledikten sonra 1 dak. 13.000 rpm’de santrifüj (Eppendorf 5415R) edilerek PZR ürününün mikrofüj tüplerine alınması sağlanmıştır.

Saflaştırılan PZR ürünleri 1 kb marker eşliğinde 6X lik yükleme boyası ile 2 µL hacminde 50 mg/mL etidium bromür içeren % 1’lik agaroz jele yüklenerek 1X TBE tamponunda 90 V’da 40 dak. yürütme işleminden sonra UV transilluminatörde (Uvitec) incelenmiştir.

3.12.Saflaştırılmış PZR Ürünlerinin Dizi Analizi

Saf PZR ürünleri elde edilen ITS1-5.8S rDNA-ITS2 gen bölgelerinin dizi analizini yapmak üzere her bir örnek için toplam hacmi 10 mL olan ileri ve geri primerleri içeren iki reaksiyon tüpü hazırlanmıştır. Her bir PZR tüpü içerisine 2 µL 1.6 µM primer, 8 µL Beckman Qick Start Master Kit eklenerek aşağıda belirtilen koşullarda PZR yapılmıştır.

30 döngü;

96 °C 20 saniye

55 °C 20 saniye

72 °C 1 dakika

Amplifikasyon sonrasında saflaştırma yapmak üzere Agencourt Clean SEQ manyetik boncuk sistemi kullanılmıştır. Bunun için 10 µL’ lik örnek için 5.5 µL stop solüsyonu (0.5 µL steril distile su, 0.2 µL 3 M pH:5.2 sodyum asetat, 100 mM pH:8 sodyum EDTA ve 20 mg/mL glikojen) eklenmiştir. Her bir örneğe 10

μ L Agencourt Clean SEQ manyetik boncuk ve 55 μ L % 73'lük izopropanol eklenmiş ve homojen karışımı sağlanmıştır. Örnekler manyetik alan olmaksızın 10 dak. bekletildikten sonra manyetik stanta alınarak 5 dak. bekletilmiştir. Süpernatant pipetör ile uzaklaştırılmış ve 200 μ L % 73'lük izopropanol eklenmiş ve 3 dak. oda sıcaklığında, manyetik stantta bekletilmiştir. Daha sonra örneklerden izopropanol uzaklaştırılmış ve bu işlem bir kez daha tekrarlanmıştır. 10-20 dak. oda sıcaklığında kurutmaya bırakılan örnekler, 40 μ L örnek yükleme solüsyonu (SLS) içinde çözülmüş ve manyetik stantta 5 dak bekletilmiştir. Oluşan süpernatantın 35 μ L'si 96'lık platelere aktarılmış ve ayırma tamponu içeren ikinci bir plate ile kapiller sisteme verilmiştir (Beckman CEQ 8000).

3.13.Gen Dizilerinin Analizi

İncelenen izolatlara ait ITS1-5.8S rDNA-ITS2 gen bölgelerine ait dizi bilgileri National Center of Biotechnology Information (NCBI)'ın www.ncbi.nlm.nih.gov adresindeki gen bankası verileri ile BLAST programı üzerinden karşılaştırılarak filogenetik benzerlikleri açısından incelenmiştir (Altschul ve ark., 1997).

3.14.Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) İçin RNA İzolasyonu

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) yapmak üzere tüm stres koşullarında yüksek trehaloz ve glikojen üreten suş *C. rugosa* ve kontrol suşlar olarak *C. albicans* ve *S. cerevisiae* seçilmiştir.

Farklı stres koşullarına maruz bırakılmış maya suşlarından RNA izolasyonu için Qiagen RNeasy Mini Kit kullanılmıştır. Stres koşuluna maruz bırakılan hücreler süpernatantlarından santrifüjle (Eppendorf 5415R) ayrılarak 1 mL steril distile su ile yıkanmış ve 1000 g'de 5 dak. santrifüj (Eppendorf 5415R) edilerek ortamdaki su tamamen uzaklaştırılmıştır. Eppendorflarda kalan su ise

aspirasyonla uzaklaştırılmıştır. Daha önceden 1 mL'sine 10 µL β-Merkeptanol eklenen liziz buffer'dan her bir örneğe 600 µL eklenmiş ve vortekslenmiştir (Heidolph Reax Control). Örnekler seramik boncuklar bulunduran tüplere aktararak MagNa lyser (Roche) cihazı ile 1 dak. en yüksek hızda vortekslenip (Heidolph Reax Control) çalkalanmış ve böylece hücreler mekanik parçalanmaya maruz bırakılmıştır. 350 µL lizat yeni mirofüje alınmış ve 2 dak. 8000 g'de santrifüj (Eppendorf 5415R) edildikten sonra süpernatantlar yeni mikrofüj tüpüne aktarılmıştır. 350 µL % 70'lik ethanol eklenerek pipet ile karıştırılan 700 µL örnek toplama tüplerine yerleştirilen kolona aktarılmıştır. Kapakları kapatılıp 15 sn 8000 g' de santrifüj (Eppendorf 5415R) işlemi sonrası toplama tüpü uzaklaştırılan kolona 700 µL bağlanma tamponu eklenmiştir. 15 sn 8000 g'de santrifüjden (Eppendorf 5415R) sonra toplama tüpü yenilenen kolona 500 µL yıkama tamponu eklenerek 8000 g'de 15 sn santrifüj (Eppendorf 5415R) yapılmış ve aynı işlem ikinci kez tekrarlanmıştır; fakat bu defa 8000 g'de 2 dak. santrifüj (Eppendorf 5415R) işlemi uygulanmıştır. Kolonlar mikrofüj tüplerine aktararak üzerlerine 30 µL RNaz içermeyen su eklenmiştir. 1 dak. 8000 g'de santrifüj (Eppendorf 5415R) işlemi sonrası mikrofüj tüpüne aktarılan RNA'ların saflıkları NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) ile belirlendikten sonra cDNA eldesi için kullanılmıştır.

3.15.cDNA Eldesi

Farklı stres koşullarına maruz bırakılmış mayalardan saflaştırılan RNA'lardan cDNA'ları elde etmek üzere Roche Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit protokolü uygulanmıştır. 1. aşamada PZR tüpü içerisinde 1 µg RNA, 1 µL anchored-oligo(dT) primer (50 pmol / µL), 1.2 µL random hexamer primer (600 pmol/ µL) ve toplam hacim 11.4 µL olacak şekilde pcr-grade su içeren karışım hazırlanmıştır ve Veriti Thermal Cyclers (AB) içerisinde 65 °C'de 10 dak. inoküle edilmiştir. Bu süre içerisinde 2. aşama için gerekli olan ve 4 µL 5X reaksiyon buffer, 0.5 µL RNaz inhibitör (40 U / µL), 2 µL deoksinükleotidler (her birinden 10 mM), 1 µL DTT ve 1.1 µL revers transkriptaz'dan oluşan karışım

hazırlanmıştır. 1. aşama için hazırlanan karışım süre sonunda Thermal Cycler'dan çıkarılarak ikinci karışımdan 1. karışım içerisine toplam hacim 20 µL olacak şekilde eklenmiş ve 50 °C'de 20 dakika, 85 °C'de 5 dakika olacak şekilde PZR işlemi başlatılmıştır. Elde edilen cDNA'lar RT- PZR'da kullanılmak üzere -80 °C'de saklanmıştır.

3.16.RT PZR İçin Primer Tasarımı

RT- PZR'ları yapılacak olan mayaların Trehaloz Fosfat Sentaz (*TPS1*) ve Glikojen Sentaz (*GSY1*) gen bölgesine ait ileri ve geri primerlerini belirlemek üzere; *S. cerevisiae* için gen bölgeleri www.ncbi.nlm.nih.gov'dan elde edilerek <http://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>'den RT-PZR'a uygun primerler belirlenmiş ve sentezlettirilmiştir (Ek 1). *C. albicans* ve *C. rugosa* için ise www.ncbi.nlm.nih.gov dan *TPS1* ve *GSY1* gen bölgeleri bilinen *Candida* türleri; *C. albicans*, *C. dubliensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*'nın dizileri <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>'dan hizalanarak; gen bölgeleri bilinmeyen *C. rugosa* için ve *C. albicans* için ortak primerler <http://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>'dan tasarlanmış ve sentezlettirilmiştir (Ek 2).

RT-PZR için kontrol gen bölgesi olarak *S. cerevisiae*'nın Actin (*ACT1*) gen bölgesine ait primerler www.ncbi.nlm.nih.gov ve <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> kullanılarak belirlenmiş ve sentezlettirilmiştir (Ek 3). *Candida albicans* ve *Candida rugosa*'ya ait ortak *ACT1* gen bölgesine ait primerleri belirlemek amacı ile *ACT1* gen bölgeleri bilinen *Candida* türleri; *C. albicans*, *C. dubliensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*'nın dizileri <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>'dan hizalanarak; gen bölgeleri bilinmeyen *C. rugosa* için ve *C. albicans* için ortak primerler <http://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>'dan tasarlanmış ve sentezlettirilmiştir (Ek 4). Tüm primerlerin dizisi Çizelge 3.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. RT-PZR analizlerinde kullanılan primer dizileri

PRİMER ADI	PRİMER DİZİSİ
<i>S. cerevisiae ACT1 R</i>	5' CAATTCGTTGTAGAAGGTATGATGCC '3
<i>S. cerevisiae ACT1 F</i>	5' TGACGACGCTCCTCGTGCTGTCTT '3
<i>Candida ACT1 R</i>	5' CCATATCGTCCCAGTTGGAAAC '3
<i>Candida ACT1 F</i>	5' ATGTGTAAAGCCGGT TTTGCC G '3
<i>S. cerevisiae TPS1 R</i>	5' TCTTCTTCAACCCTTCCAAC '3
<i>S. cerevisiae TPS1 F</i>	5' AGGCTAACAACTAGGTACTCACA '3
<i>Candida TPS1 R</i>	5' CATTAAATGRTAATCATGAACCCA '3
<i>Candida TPS1 F</i>	5' TGGCCACTTTTCCATTATCA '3
<i>S. cerevisiae GSY1 R</i>	5' TCT ACA CAA TGG CAG GGC TA '3
<i>S.cerevisiae GSY1 F</i>	5' ACG AAA CAAACG ATG CCA TA '3
<i>Candida GSY1 R</i>	5' TTGRTTGATTCTTTGTCTTCTGG '3
<i>Candida GSY1 F</i>	5' CTTGGGGTTACACKCCWGC '3

3.17.RT-PZR ile *TPS1* ve *GSY1* Gen Bölgelerinin Transkripsiyon Oranının Göreceli Belirlenmesi

RT-PZR için gerekli karışım Roche Fast Start Essential DNA Green Master Mix ile hazırlanmıştır. Bunun için toplam karışım hacmi 20 µL olmak üzere; 6 µL PZR grade su, 1 µL 10X ileri, 1 µL 10X geri primer, 10 µL master mix (Taq DNA polimeraz, Reaksiyon buffer, dNTP karışımı, Sybr Green boyası ve MgCl₂) ve son olarak 2 µL cDNA kullanılmıştır. RT-PZR için aşağıda verilen çoğaltım koşulları uygulanmıştır.

95 °C 600 saniye

45 Döngü

95 °C 20 saniye

55 °C 20 saniye

72 °C 20 saniye

95 °C 30 saniye

1 döngü

65 °C 60 saniye

95 °C 1 saniye

40 °C 30 saniye

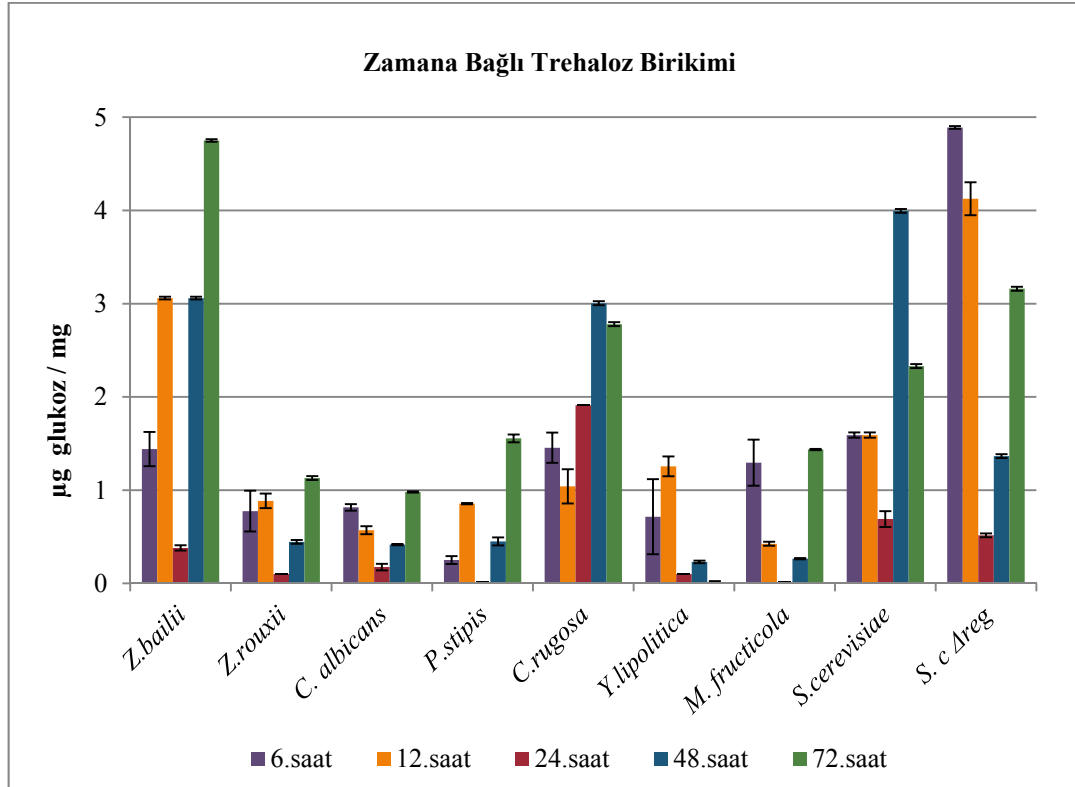
RT-PZR için karşılaştırmalı analiz yapmak amacı ile tek bir reaksiyon döngüsünde farklı stres koşullarına maruz bırakılmış tek bir mayaya ait aynı gen bölgelerinin (*TPSI* veya *GSYI*) transkripsiyonu kontrol gen bölgesi (*ACT1*) ile birlikte aynı döngüde reaksiyona sokulmuştur. Aynı zamanda stres koşullarının trehaloz sentaz (*TPSI*) ve glikojen sentaz (*GSYI*) genlerinin transkripsiyona etkisini belirleyebilmek amacı ile aynı reaksiyon döngüsünde kontrol olarak stressiz koşullarda geliştirilmiş maya örnekleri de kullanılarak karşılaştırmalı RT-PZR analizleri yapılmıştır.

4.BULGULAR

4.1.Zamana Bağı Trehaloz ve Glikojen Miktarının Belirlenmesi

4.1.1.Zamana bağı trehaloz miktarının belirlenmesi

C. albicans, *C. rugosa*, *M. fructicola*, *P. stipitis*, *Y. lipolytica*, *Z. bailii*, *Z. rouxii*, *S. cerevisiae* ve *S. cerevisiae ($\Delta reg1$)*'in zamana bağı trehaloz birikimleri Şekil 4.1'de verilmiştir.



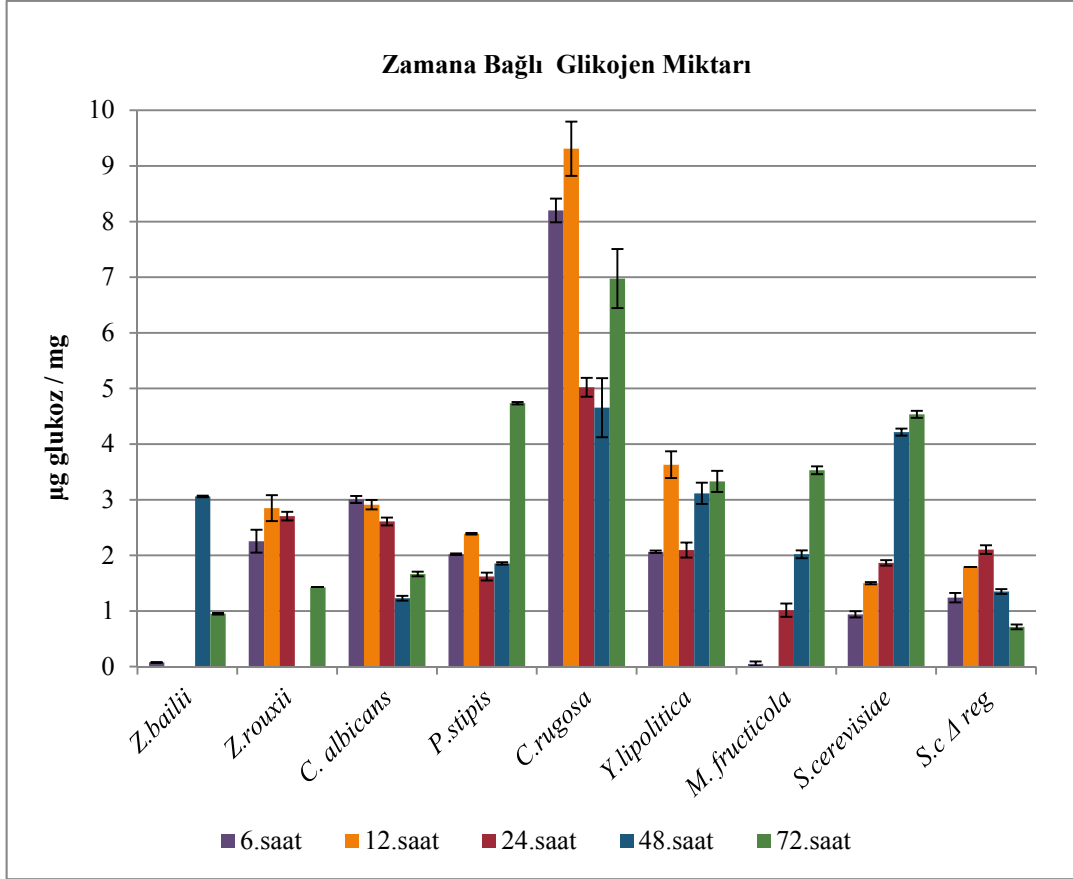
Şekil 4.1.Farklı maya türlerinde üreme sürecine bağı olarak belirlenen trehaloz miktarları (µg glukoz / mg) (n=4)

Farklı maya türlerine ait trehaloz miktarı µg glukoz / mg olarak belirlenmiştir. Verilere göre *C. rugosa*, *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae ($\Delta reg1$)* ve *Z.*

baili'de diğer mayalara göre daha yüksek trehaloz birikimi belirlenmiştir. *Z. baili* için en yüksek trehaloz miktarı 72. saatte 4.75 ± 0.37 µg glukoz / mg iken *C. rugosa*'nın en yüksek trehaloz miktarı 48. saatte 3.05 ± 0.02 µg glukoz / mg, *S. cerevisiae*'nin en yüksek trehaloz miktarı 48. saatte 3.99 ± 0.02 µg glukoz / mg ve *S. cerevisiae* (*Δreg1*)'in en yüksek trehaloz miktarı ise 6. saatte 4.89 ± 0.01 µg glukoz / mg olarak belirlenmiştir. *Z. bailii*, *S. cerevisiae* ve *S. cerevisiae* (*Δreg1*)'in en düşük trehaloz miktarları ise 24. saatte tesbit edilmiştir. *Z. bailii* için bu değer 0.38 ± 0.02 µg glukoz / mg, *S. cerevisiae* için 0.69 ± 0.08 µg glukoz / mg ve *S. cerevisiae* (*Δreg1*) için ise 0.52 ± 0.02 µg glukoz / mg'dır. Diğer maya suşlarındaki trehaloz birikimi bu üç maya suşuna oranla oldukça düşük olup *C. albicans* dışındaki tüm maya suşlarında en düşük trehaloz birikimine 24. saatte rastlanmıştır. En düşük trehaloz birikimi ise *M. fructicola* suşunda 24 saatte belirlenmiş olup 0.01 ± 0.00 µg glukoz / mg'dır.

4.1.2.Zamana bağlı glikojen miktarının belirlenmesi

Maya hücrelerinin biriktirdiği glikojen miktarı zamana ve türe göre farklılık göstermiştir. En yüksek glikojen miktarı *C. rugosa*'ya ait olup yüksek glikojen üretimi ile bilinen kontrol suş *S. cerevisiae* (*Δreg1*)'den oldukça yüksektir. *C. rugosa*'nın biriktirdiği glikojen miktarı 12. saatte 9.31 ± 0.49 µg glukoz / mg olarak belirlenirken 6. saatte biriktirdiği glikojen miktarı (8.20 ± 0.21 µg glukoz / mg) ve 72. saatte biriktirdiği glikojen miktarı (6.98 ± 1.22 µg glukoz / mg) diğer maya suşlarının farklı zamanlarda biriktirdiği glikojen miktarından daha yüksektir. *C. rugosa*'nın en düşük trehaloz birikimine 48. saatte rastlanmış olup 4.66 ± 0.53 µg glukoz / mg'dır. *Z. bailii* ve *M. fructicola*'da 12. saatte, *Z. rouxii*'de ise 48 saatte glikojen birikimine rastlanmamıştır (Şekil 4.2).



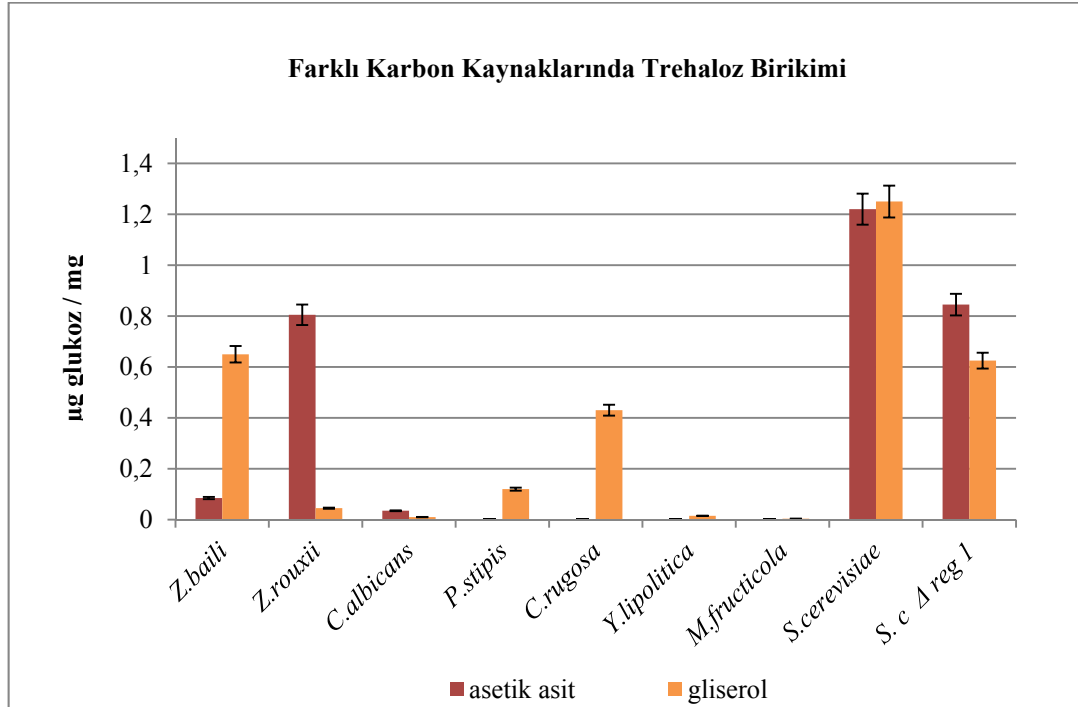
Şekil 4.2.Farklı maya türlerinde üreme sürecine bağlı olarak belirlenen glikojen miktarları (µg glukoz / mg) (n=4)

4.2.Farklı Stres Koşullarına Maruz Bırakılan Mayaların Trehaloz ve Glikojen Metabolizması

4.2.1.Farklı karbon kaynaklarının trehaloz metabolizmasına etkisi

Herbir mayanın alternatif karbon kaynağı olarak kullanılan asetik asit ve gliserolde ürettiği trehaloz miktarı farklı olup, *Z. bailii* gliserolde 0.65 ± 0.02 µg glukoz / mg ve asetik asite 0.09 ± 0.01 µg glukoz / mg olmak üzere; gliserolde asetik asite göre daha fazla trehaloz biriktirmiştir. *Z. rouxii* için ise durum tam tersi olmuştur. Gliserolde biriktirdiği trehaloz miktarı 0.50 ± 0.02 µg glukoz / mg iken, asetik asitte 0.81 ± 0.02 µg glukoz / mg trehaloz birikimi gözlenmiştir. *C. albicans*'ın her iki alternatif karbon kaynağında trehaloz birikimi oldukça düşük

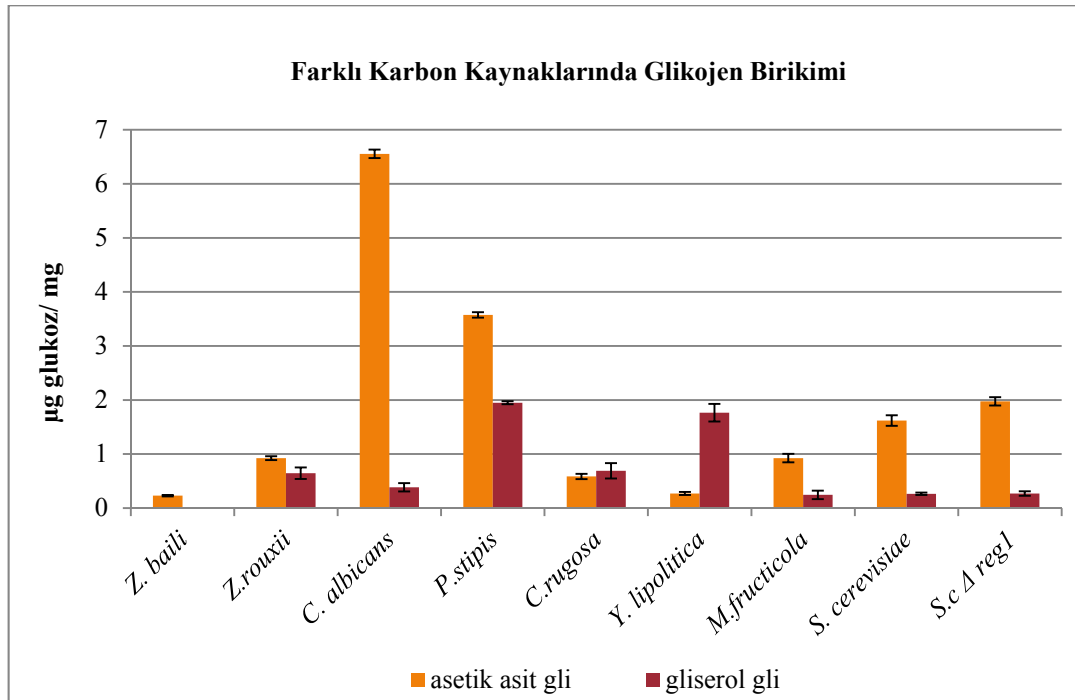
olup bu miktarlar gliserolde 0.01 ± 0.02 μg glukoz / mg, asetik asitte 0.04 ± 0.01 μg glukoz / mg'dır. *P.stipis*'de trehaloz birikimi *Z. bailii*'de olduğu gibi alternatif karbon kaynağı olarak gliserol kullanıldığında daha fazladır ve asetik asit kullanıldığında trehaloz birikimi gözlenmezken gliserol varlığında 0.12 ± 0.02 μg glukoz / mg'dır. *C. rugosa*'nın gliserol varlığında trehaloz birikimi 0.43 ± 0.03 μg glukoz / mg iken asetik asit varlığında trehaloz varlığına rastlanmamıştır. *M. fructicola* ve *Y. lipolitica*'da asetik asit varlığında trehaloz birikimi gözlenmezken gliserol varlığında ise çok az olmak üzere; *Y. lipolitica* için 0.02 ± 0.02 μg glukoz / mg ve *M. fructicola* için ise 0.004 ± 0.00 μg glukoz / mg olarak belirlenmiştir. *S. cerevisiae*'da her iki alternatif karbon kaynağı varlığında trehaloz birikim değerleri yakın olup diğer maya suşlarından daha yüksektir. Asetik asit varlığında trehaloz miktarı 1.22 ± 0.01 μg glukoz / mg iken gliserol varlığında ise 1.25 ± 0.03 μg glukoz / mg'dır. *S. cerevisiae* (Δreg1) için ise asetik asitte trehaloz birikimi 0.85 ± 0.02 μg glukoz / mg iken gliserolde 0.63 ± 0.00 μg glukoz / mg olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3.Farklı maya türlerinde alternatif karbon kaynağının trehaloz birikimine etkisi (μg glukoz / mg) (n=4)

4.2.2.Farklı karbon kaynaklarının glikojen metabolizmasına etkisi

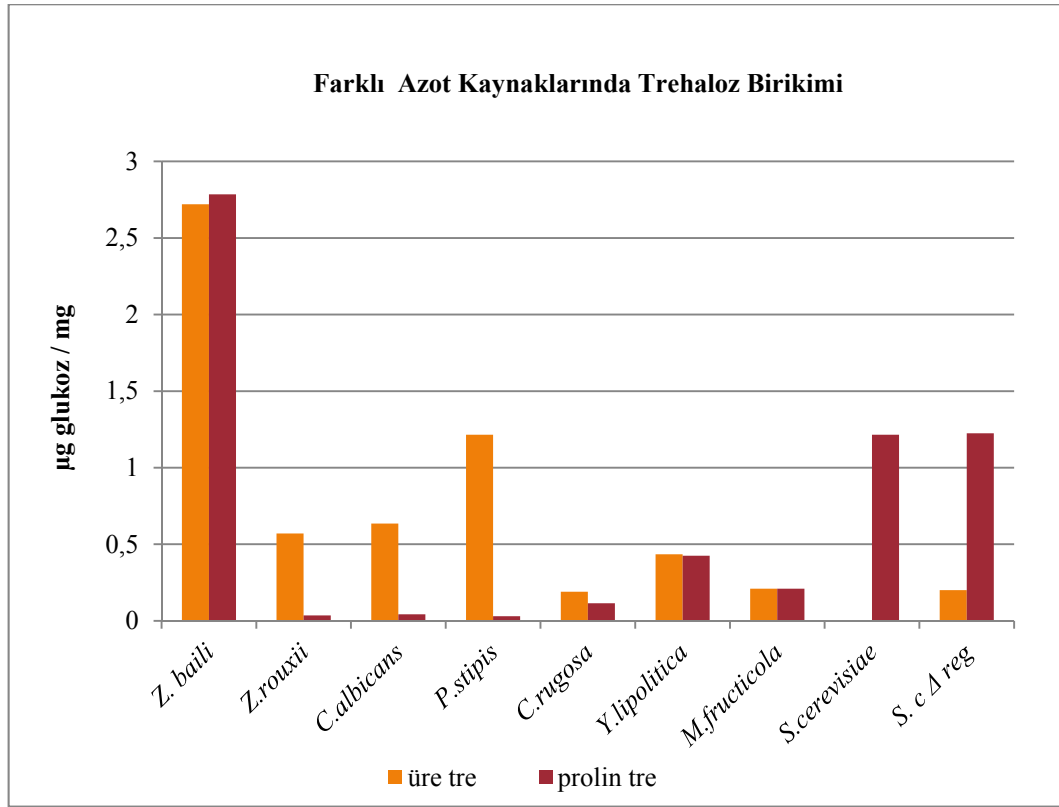
Maya suşlarının alternatif karbon kaynaklarının bulunduğu ortamda trehaloza oranla daha fazla glikojen biriktirdiği gözlenmiştir. *Y. lipolitica* dışındaki tüm mayalarda asetik asitin bulunduğu ortamda biriken glikojen miktarı gliserol bulunan ortamdaki glikojen miktarından daha yüksek olmuştur. En yüksek glikojen miktarına asetik asit bulunan ortamda *C. albicans*'la ulaşılmış olup 6.55 ± 0.07 µg glukoz / mg olarak tesbit edilmiştir. İkinci yüksek trehaloz birikimi yine asetik asitin bulunduğu ortamda *P. stipis* ile elde edilmiş olup 3.57 ± 0.05 µg glukoz / mg olarak belirlenmiştir. *Z. bailii* için glikojen miktarı diğer maya suşlarına oranla düşük olup asetik asit varlığında 0.23 ± 0.01 µg glukoz / mg iken gliserol varlığında glikojen birikimi gözlenmemiştir. *Y. lipolitica*'nın glikojen miktarı gliserol varlığında 1.77 ± 0.16 µg glukoz / mg'dır. Glikojen üretimi açısından kontrol suş olarak kullanılan *S. cerevisiae* ($\Delta reg1$)'in glikojen birikimi asetik asit varlığında daha yüksek olup 1.98 ± 0.08 µg glukoz / mg olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5.Farklı maya türlerinde alternatif karbon kaynağının glikojen birikimine etkisi (µg glukoz/mg) (n=4)

4.2.3.Farklı azot kaynaklarının trehaloz metabolizmasına etkisi

Z. bailii'de azot kaynağı olarak hem üre hem de prolinin kullanıldığı farklı iki minimal besi ortamlarında diğer mayalara oranla yüksek trehaloz miktarına ulaşılmıştır. *Z. bailii* için ürenin bulunduğu besiyerinde trehaloz miktarı 2.72 ± 0.02 μg glukoz / mg iken prolinin bulunduğu ortamda 2.78 ± 0.06 μg glukoz / mg olarak belirlenmiştir. *Z. rouxii*, *C. albicans*, *P. stipis* ve *C. rugosa* için ürenin yer aldığı minimal ortamda trehaloz miktarı prolin bulunan ortama oranla daha yüksek olmuştur. *Y. lipolitica* ve *M. fructicola* için ise her iki azot kaynağında da trehaloz birikiminin yakın değerlerde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6).



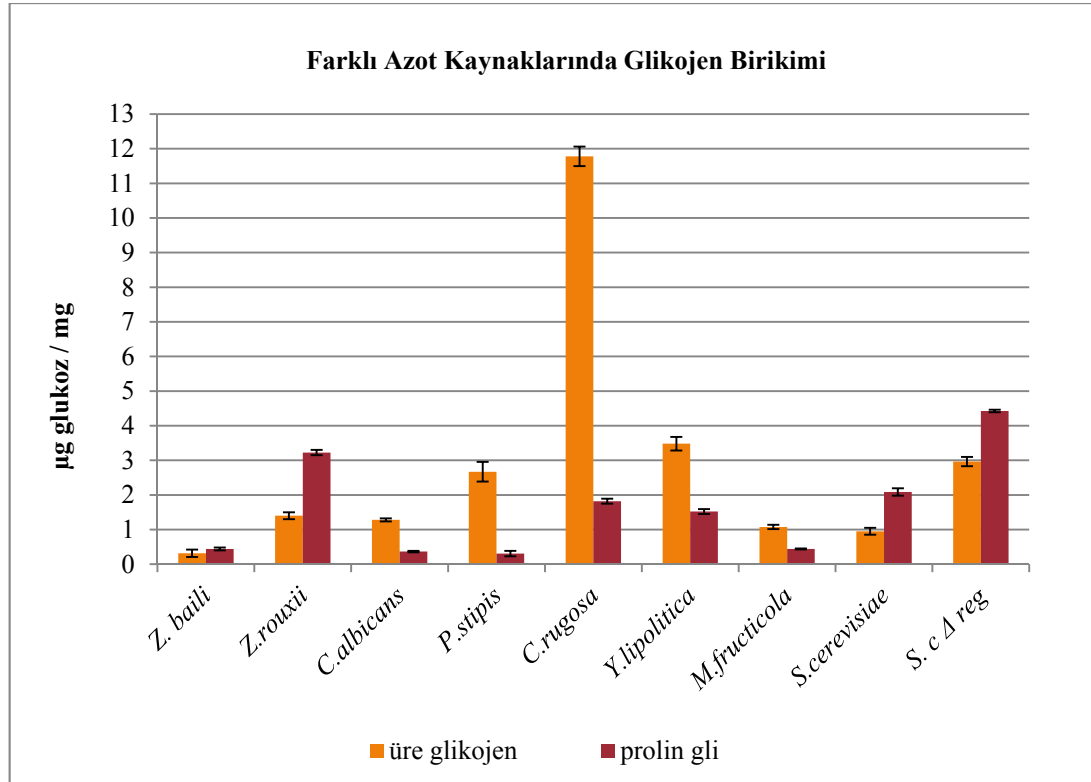
Şekil 4.6.Farklı maya türlerinde alternatif azot kaynağının trehaloz birikimine etkisi (μg glukoz / mg) (n=4)

S. cerevisiae için ise prolinin bulunduğu ortamda trehaloz birikimi daha yüksek olarak tespit edilmiş olup, *S. cerevisiae* için 1.20 ± 0.02 μg glukoz / mg iken *S. cerevisiae* ($\Delta reg1$) için 1.20 ± 0.02 μg glukoz / mg olarak saptanmıştır. En

düşük trehaloz birikimleri ise *Z. rouxii* için prolinin bulunduğu ortamda 0.04 ± 0.00 μg glukoz / mg olup, *C. albicans* için prolinin bulunduğu ortamda 0.04 ± 0.00 μg glukoz / mg ve *S. cerevisiae* için ürenin bulunduğu ortamda $0.003 \pm 0,00$ μg glukoz / mg olarak tesbit edilmiştir (Şekil 4.6).

4.2.4.Farklı azot kaynaklarının glikojen metabolizmasına etkisi

Alternatif azot kaynakları kullanılarak yapılan çalışmada en yüksek glikojen miktarı azot kaynağı olarak üre içeren ortamda *C. rugosa*'dan elde edilmiş olup 11.78 ± 0.30 μg glukoz / mg olarak belirlenmiştir. Kontrol suş olarak kullanılan *S. cerevisiae* (*Δreg1*)'in üre varlığında ürettiği glikojen miktarı 2.97 ± 0.13 iken prolin varlığında 4.43 ± 0.04 μg glukoz / mg'dır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7.Farklı maya türlerinde alternatif azot kaynağının glikojen birikimine etkisi (μg glukoz / mg) (n=4)

Ürenin bulunduğu minimal ortamda *Z. bailii*'de 0.32 ± 0.11 µg glukoz / mg , *Z. rouxii*'de 1.40 ± 0.09 , *C. albicans*'da 1.28 ± 0.04 µg glukoz / mg, *P. stipis*'de 2.67 ± 0.2 µg glukoz / mg, *Y. lipolitica*'da 3.48 ± 0.2 µg glukoz / mg, *M. fructicola*'da 1.07 ± 0.06 µg glukoz / mg, *S. cerevisiae*'da 0.95 ± 0.09 ve *S. cerevisiae* ($\Delta reg1$) için 2.97 ± 0.13 µg glukoz / mg glikojen birikimi olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7).

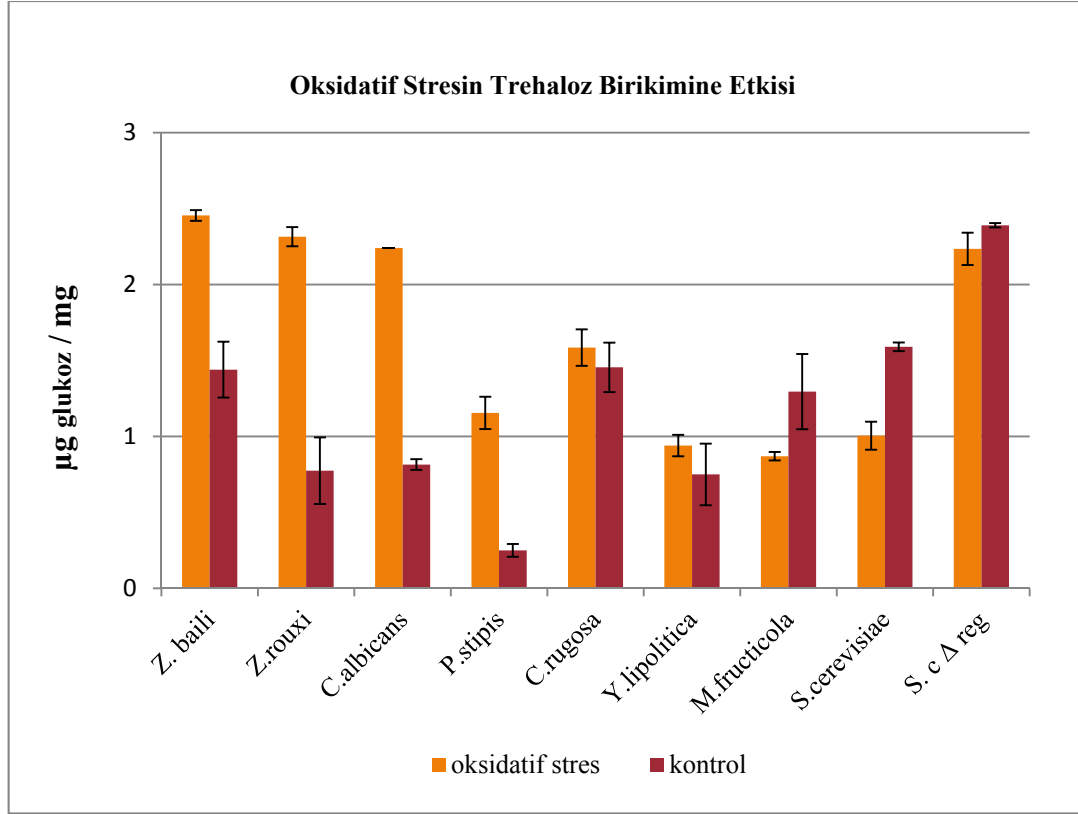
Prolinin bulunduğu ortamda ise *Z. bailii* (0.44 ± 0.04 µg glukoz / mg), *Z. rouxii* (3.25 ± 0.07 µg glukoz / mg), *S. cerevisiae* (2.09 ± 0.1 µg glukoz / mg), *S. cerevisiae* ($\Delta reg 1$) (4.4 ± 0.03 µg glukoz / mg) için glikojen birikimi üreli minimal ortama göre daha yüksek olmuştur (Şekil 4.7).

4.2.5.Oksidatif stresin trehaloz metabolizmasına etkisi

Oksidatif stres oluşturmak amacı ile YPD besiyerine menadion eklenmiştir. Stres koşulu altında tüm maya suşlarının trehaloz birikimi Şekil 4.8'de verildiği gibi olup stressiz koşullarda geliştirilen maya suşlarında kontrol olarak gösterilmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda oksidatif stres varlığında *Z. bailii*'de trehaloz miktarı 2.45 ± 0.03 µg glukoz / mg, *Z. rouxii*'de 2.31 ± 0.06 µg glukoz / mg *C. albicans*'da 2.24 ± 0.00 µg glukoz / mg, *P. stipis*'de 1.55 ± 0.10 µg glukoz / mg, *C. rugosa*'da 1.58 ± 0.10 µg glukoz / mg, *Y. lipolitica*'da 0.94 ± 0.07 µg glukoz / mg, *M. fructicola*'da 0.87 ± 0.02 µg glukoz / mg, *S. cerevisiae*'da 1.01 ± 0.09 µg glukoz / mg ve *S. cerevisiae* ($\Delta reg 1$)'de ise 2.24 ± 0.10 µg glukoz / mg olarak belirlenmiştir. *Z. bailii*, *Z. rouxii*, *C.albicans*, *P.stipis* *C. rugosa* ve *Y. lipolitica* için oksidatif stresin kontrol olarak kullanılan stressiz koşullardakinden daha fazla trehaloz ürettiği belirlenmiştir. Oksidatif stres *M. fructicola*, *S. cerevisiae* ve *S. cerevisiae* ($\Delta reg1$)'in trehaloz üretimini tetiklememiştir. Oksidatif stres kontrole göre maya suşları arasında en çok *P. stipis*'i etkilemiş olup trehaloz üretimi oksidatif stres altında 4.62 kat artmıştır. Kontrolde *P. stipis*'in ürettiği trehaloz miktarı 0.25 ± 0.04 µg glukoz / mg iken oksidatif streste 1.15 ± 0.11 µg glukoz /

mg olarak saptanmıştır. Oksidatif stres altında en fazla trehaloz üretimi *Z. bailii*'de (2.45 ± 0.03 µg glukoz / mg), en az trehaloz üretimi ise *M. fructicola*'da (0.87 ± 0.02 µg glukoz / mg) gözlenmiştir (Şekil 4.8).



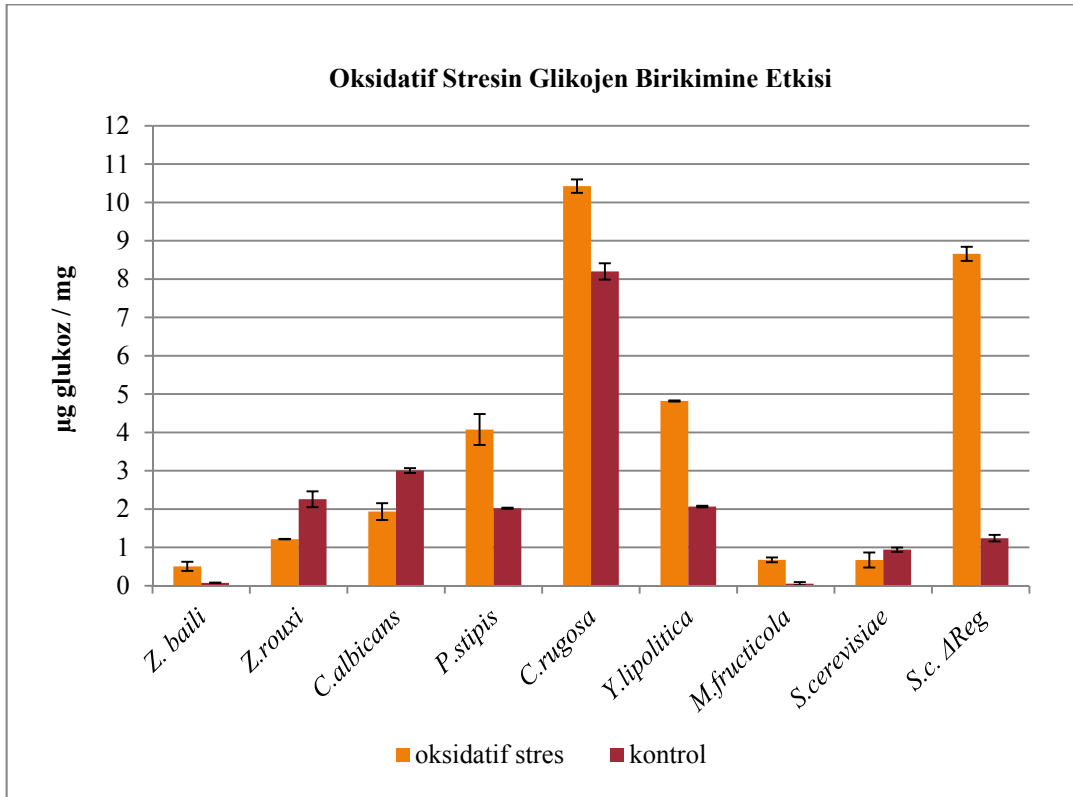
Şekil 4.8.Farklı maya türlerinde oksidatif stresin trehaloz birikimine etkisi (µg glukoz / mg) (n=4)

4.2.6.Oksidatif stresin glikojen metabolizmasına etkisi

Oksidatif stresin glikojen birikimine etkisini belirlemek için yaptığımız çalışmanın sonuçları kontrol olarak kullanılan stressiz koşullardaki glikojen miktarı ile Şekil 4.9'da verilmiştir.

Oksidatif streste glikojen birikiminin trehaloz birikimine oranla daha fazla olduğu gözlenmiştir. En yüksek glikojen miktarı *C. rugosa*'da 10.21 ± 0.40 µg glukoz / mg olarak saptanmıştır. *C. rugosa*'nın stressiz koşullardaki glikojen

üretiminin oksidatif strese oranla daha düşük ve 8.20 ± 0.21 μg glukoz / mg olduğu belirlenmiştir. Kontrol suş olarak kullanılan ve yüksek glikojen üretimi beklenen *S. cerevisiae* (*Areg1*) için glikojen miktarı 8.66 ± 0.20 iken stressiz koşullarda 1.24 ± 0.08 μg glukoz / mg olarak oldukça düşük miktarda olduğu gözlenmiştir. Oksidatif stres altında üretilen glikojen miktarları; *Z. bailii* için 0.51 ± 0.12 μg glukoz / mg, *Y. lipolitica* için 4.87 ± 0.33 μg glukoz / mg, *P. stipis* için 4.07 ± 0.40 μg glukoz / mg, *M. fructicola* için 0.68 ± 0.06 μg glukoz / mg olarak tespit edilmiş ve bu değerlerin kontrol olarak kullanılan stressiz koşullardaki glikojen üretiminden yüksek olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra diğer maya suşlarının oksidatif stres altında glikojen üretimleri *Z. rouxii* 1.22 ± 0.00 μg glukoz / mg, *C. albicans* 1.94 ± 0.20 μg glukoz / mg, *M. fructicola* 0.67 ± 0.20 μg glukoz / mg ve *S. cerevisiae* 0.67 ± 0.20 μg glukoz / mg olarak tesbit edilmiş olup bu maya suşlarının glikojen birikim değerleri kontrollerden düşük olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9).

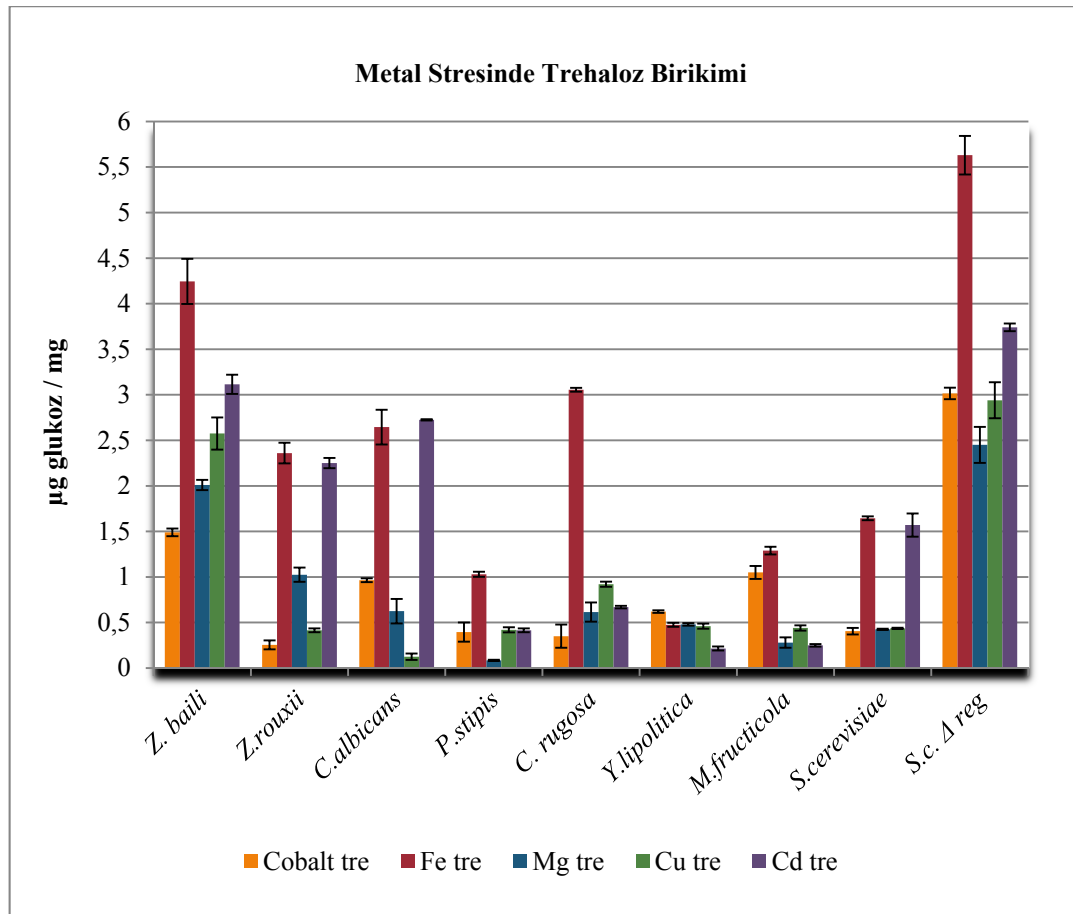


Şekil 4.9.Farklı maya türlerinde oksidatif stresin glikojen birikimine etkisi (μg glukoz / mg) (n=4)

Oksidatif stres altında glikojen birikimi en düşük olan maya suşu *Z. bailii* ($0.51 \pm 0.12 \mu\text{g glukoz / mg}$) olarak tesbit edilmiştir. Kontrol ve oksidatif stres arasında glikojen üretim farkı en fazla *S. cerevisiae* (Δreg1)’de gözlenmiş olup oksidatif stres altında stressiz koşullara göre 6.93 kat daha fazla glikojen üretmiştir.

4.2.7.Farklı metal streslerinin trehaloz metabolizmasına etkisi

Son konsantrasyon 0.1 mM olacak şekilde metal çözeltileri ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, MgSO_4 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CdCl_2) ile oluşturulan stres sonucunda maya suşlarının oluşturduğu trehaloz miktarı Şekil 4.10’da verilmiştir.



Şekil.4.10.Farklı maya türlerinde metal stresinin trehaloz birikimine etkisi ($\mu\text{g glukoz / mg}$) (n=4)

Tüm maya suşlarında Fe(III) stresinde oluşturulan trehaloz miktarı diğer metal streslerine oranla daha fazladır. Özellikle Fe(III) stresinde trehaloz üretiminin en yüksek gözlemlendiği maya suşları; *Z. bailii* için 4.25 ± 0.24 µg glukoz / mg, *C. albicans* için 2.65 ± 0.19 µg glukoz / mg, *C. rugosa* için 3.05 ± 0.02 µg glukoz / mg ve *S. cerevisiae* ($\Delta reg1$) için ise 5.63 ± 0.20 µg glukoz / mg olarak belirlenmiştir. Fe(III) stresinde en az trehaloz üreten maya suşu *Y. lipolitica* olup 0.48 ± 0.02 µg glukoz / mg olarak belirlenmiştir. Maya suşlarının Fe(III)'den sonra en çok trehaloz biriktirdiği metal çözeltisi $CdCl_2$ 'dir. Özellikle *Z. bailii* (3.12 ± 0.11 µg glukoz / mg), *Z. rouxii* (2.25 ± 0.06 µg glukoz / mg), *C. albicans* (2.73 ± 0 µg glukoz / mg), *S. cerevisiae* (1.57 ± 0.13 µg glukoz / mg) ve *S. cerevisiae* ($\Delta reg1$) (3.74 ± 0.04 µg glukoz / mg) için Cd stresindeki değerler Fe(III) stresindeki deki değerlere oldukça yakın olmuştur (Şekil 4.10).

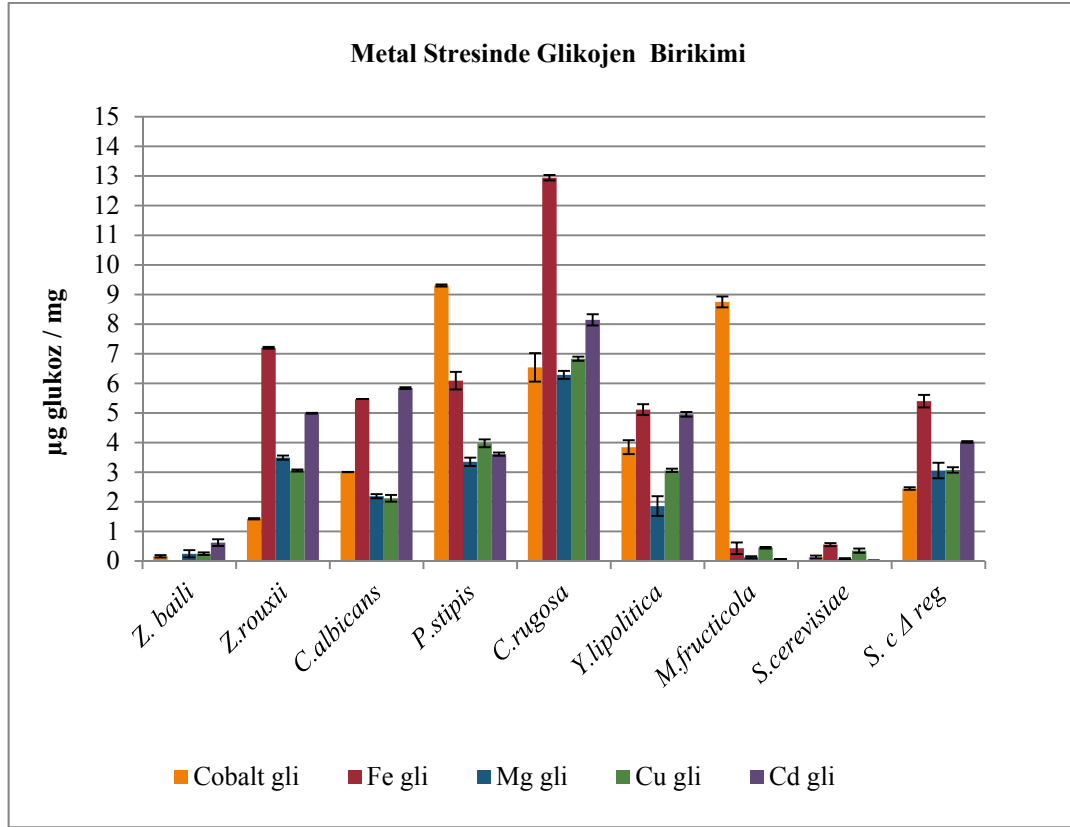
Z. bailii en az trehalozu Co stresinde biriktirmiş olup 1.49 ± 0.04 µg glukoz / mg iken *Z.rouxii* için en az trehaloz birikimi Co stresinde gerçekleşmiş olup 0.26 ± 0.05 µg glukoz / mg olarak tesbit edilmiştir. Diğer maya suşlarının en az trehaloz biriktirdiği metal stresi ve değeri; *C. albicans* için Cu stresinde 0.13 ± 0.04 µg glukoz / mg; *P.stipitis* için Mg stresinde 0.09 ± 0.01 µg glukoz / mg, *C. rugosa* için $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ stresinde 0.35 ± 0.13 µg glukoz / mg, *Y. lipolitica* için Cd stresinde 0.22 ± 0.02 µg glukoz / mg ve *S. cerevisiae* ($\Delta reg1$) için Mg stresinde 2.45 ± 0.20 µg glukoz / mg olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10).

4.2.8.Farklı metal streslerinin glikojen metabolizmasına etkisi

Farklı metal streslerinde farklı maya suşlarının biriktirdiği glikojen miktarı Şekil 4.11'de verilmiştir. *Z. bailii*'nin farklı metal streslerinde glikojen üretimi oldukça düşüktür ve en yüksek glikojen üretimi Cd stresinde 0.62 ± 0.11 µg glukoz / mg olarak belirlenmiş olup Fe(III) stresinde glikojen üretimi gözlenmemiştir. *Z. rouxii*'nin Fe(III) stresinde ürettiği glikojen miktarı diğer metal streslerine oranla daha yüksek olup 7.20 ± 0.03 µg glukoz / mg olarak belirlenmiş en düşük glikojen üretimi ise Co stresinde gerçekleşmiş ve 1.43 ± 0.02 µg glukoz / mg olarak saptanmıştır. *C. albicans*'ın Cd stresindeki glikojen miktarı

5.84 ± 0.03 µg glukoz / mg ve Fe(III) stresindeki glikojen miktarı değeri 5.46 ± 0.00 µg glukoz / mg çok yakın olarak gözlenmiştir. *C. albicans*'ın en düşük glikojen ürettiği metal stresi Cu'dır ve glikojen miktarı 2.12 ± 0.11 µg glukoz / mg olarak belirlenmiştir. *P. stipitis* en yüksek glikojen birikimini CoCl₂.6H₂O stresinde gerçekleştirmiş olup 9.31 ± 0.04 µg glukoz / mg, en düşük glikojen birikimini ise MgSO₄ stresinde gerçekleştirmiş olup 3.35 ± 0.14 µg glukoz / mg olarak tesbit edilmiştir. Maya suşları arasında en yüksek glikojen birikimine *C. rugosa* ile Fe(III) stresinde ulaşılmış olup 12.95 ± 0.10 µg glukoz / mg olarak saptanmıştır. *C. rugosa*'nın farklı metal streslerinde glikojen üretimi diğer maya suşlarına ve kontrol suşa oranla yüksek olup en düşük glikojen üretimi 6.29 ± 0.13 µg glukoz / mg olarak Mg stresinde gerçekleşmiştir. *Y. lipolitica*'nın Fe(III) stresinde glikojen üretimi 5.11 ± 0.18 µg glukoz / mg ile Cd stresindeki glikojen birikimi 4.96 ± 0.08 µg glukoz / mg değerleri oldukça yakın olup diğer metal streslerinden daha etkili glikojen üretimine sebep olmuştur. *Y. lipolitica* için en düşük glikojen üretimi ise Mg stresinde ve 1.86 ± 0.30 µg glukoz / mg olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11).

M. fructicola'nın Co stresinde ürettiği glikojen miktarı 8.75 ± 0.18 µg glukoz / mg olup diğer metal streslerinde glikojen üretimi oldukça düşük olarak belirlenmiş ve en düşük glikojen değerine Cd stresinde rastlanmış olup değeri 0.06 ± 0.00 µg glukoz / mg olarak belirlenmiştir. *S. cerevisiae* için tüm metal streslerinde glikojen birikimi oldukça düşük olup en yüksek Fe(III) stresinde 0.55 ± 0.05 µg glukoz / mg ve en düşük Cd stresinde 0.02 ± 0.01 µg glukoz / mg değerleri elde edilmiştir. Kontrol suş olarak kullanılan *S. cerevisiae* (*Δ reg1*)'in Fe(III) stresindeki glikojen üretimi diğer streslere göre daha yüksek olup 5.40 ± 0.20 µg glukoz / mg olarak belirlenmiş en düşük glikojen üretimi ise Co stresinde 2.45 ± 0.04 µg glukoz / mg olarak tesbit edilmiştir (Şekil 4.11).



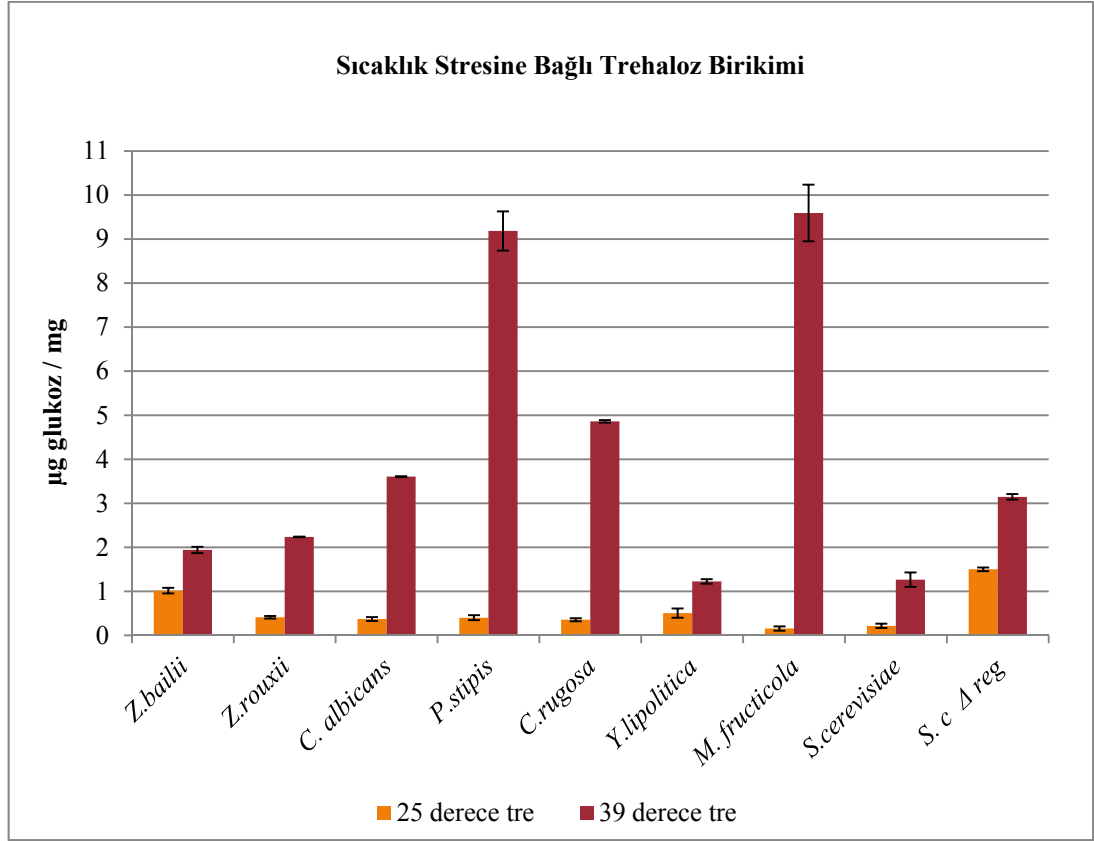
Şekil 4.11.Farklı maya türlerinde metal stresinin glikojen birikimine etkisi (µg glukoz / mg) (n=4)

4.2.9.Sıcaklık stresinin trehaloz metabolizmasına etkisi

Sıcaklık stresi oluşturmak amacı ile 25 °C’de geliştirilen mayalar 39 °C’de sıcaklık stresine maruz bırakılmış ve trehaloz birikimlerine karşılaştırmalı olarak bakılmış sonuçlar Şekil 4.12’de belirtilmiştir.

25 °C’de tüm mayalarda trehaloz birikimi oldukça düşük iken 39 °C’de trehaloz birikiminin tüm mayalarda arttığı gözlenmiştir fakat bu oran tüm mayalar için farklı değerlerdedir. Sıcaklık stresi ile trehaloz birikiminde en fazla artış gösteren mayalar; *M. fructicola* 39 °C’de 9.59 ± 0.64 µg glukoz / mg, 25 °C’de ise 0.16 ± 0.05 µg glukoz / mg, *P. stipitis* 39 °C’de 9.185 ± 0.4 µg glukoz / mg 25 °C’de ise 0.40 ± 0.06 µg glukoz / mg ve *C. rugosa* 39 °C’de 4.86 ± 0.02 µg glukoz / mg 25 °C’de ise 0.35 ± 0.04 µg glukoz / mg olarak belirlenmiştir. En yüksek

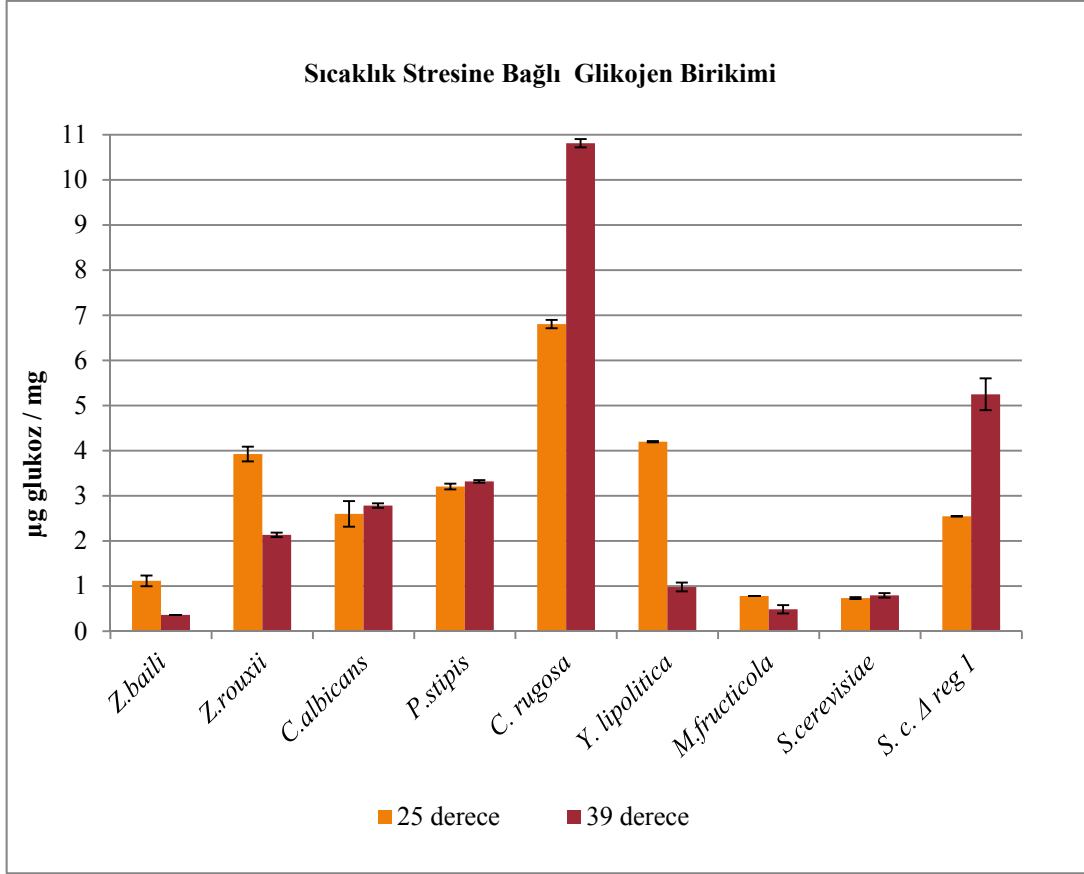
trehaloz üretimi *M. fructicola*'da belirlenirken en düşük trehaloz üretimi ise *Y. lipolitica*'da saptanmıştır.



Şekil 4.12.Farklı maya türlerinde sıcaklık stresinin trehaloz birikimine etkisi (µg glukoz / mg) (n=4)

4.2.10.Sıcaklık stresinin glikojen metabolizmasına etkisi

Sıcaklık stresinin farklı maya türlerinde glikojen metabolizmasına etkisi araştırılmış ve sıcaklık stresinde biriktirdikleri glikojen miktarı Şekil 4.13'de verilmiştir.



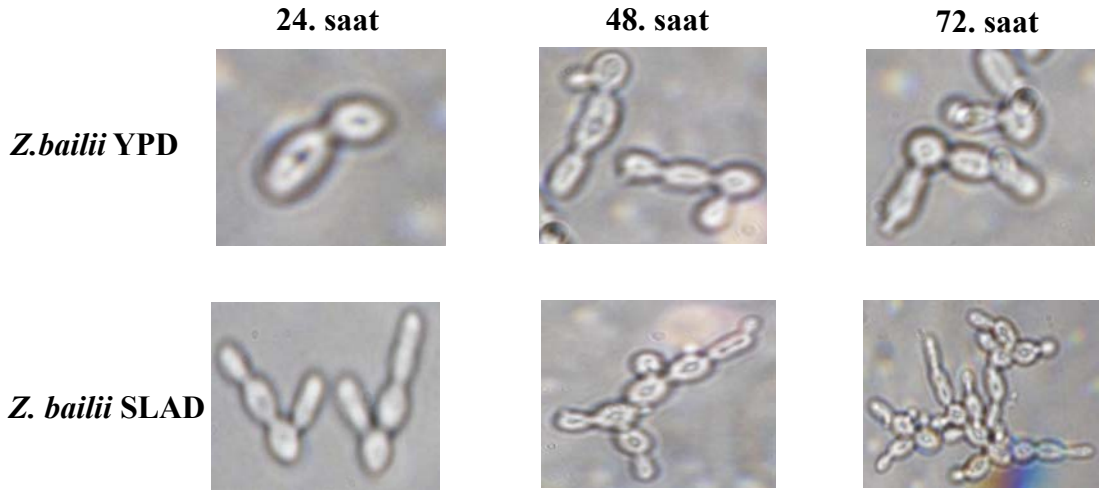
Şekil.4.13.Farklı maya türlerinde sıcaklık stresinin glikojen birikimine etkisi (µg glukoz / mg) (n=4)

Farklı maya türlerinin 25 °C’de ürettiği glikojen miktarı aynı sıcaklıkta üretilen trehaloz miktarına göre daha yüksek olup bazı mayalarda ise 39 °C’de üretilen glikojen miktarı 25 °C’dekinden daha düşüktür. *C. rugosa* ve *S. cerevisiae* (*Δreg1*) için 39 °C’de üretilen glikojen miktarı yüksek iken *C. albicans*, *P. stipitis*, *M. fruticola* ve *S. cerevisiae* için her iki sıcaklıktaki glikojen miktarı birbirine yakındır. En yüksek glikojen miktarına *C. rugosa*’da 39 °C’de ulaşılmış olup 10.82 ± 0.09 µg glukoz / mg olarak belirlenmiştir. Aynı maya suşunun 25 °C’deki glikojen birikimi de diğer mayalardan yüksek olup 6.81 ± 0.09 µg glukoz / mg olarak tesbit edilmiştir. En düşük glikojen üretimine ise *Z. bailii*’de rastlanmıştır olup değeri 0.36 ± 0.00 µg glukoz / mg olarak saptanmıştır.

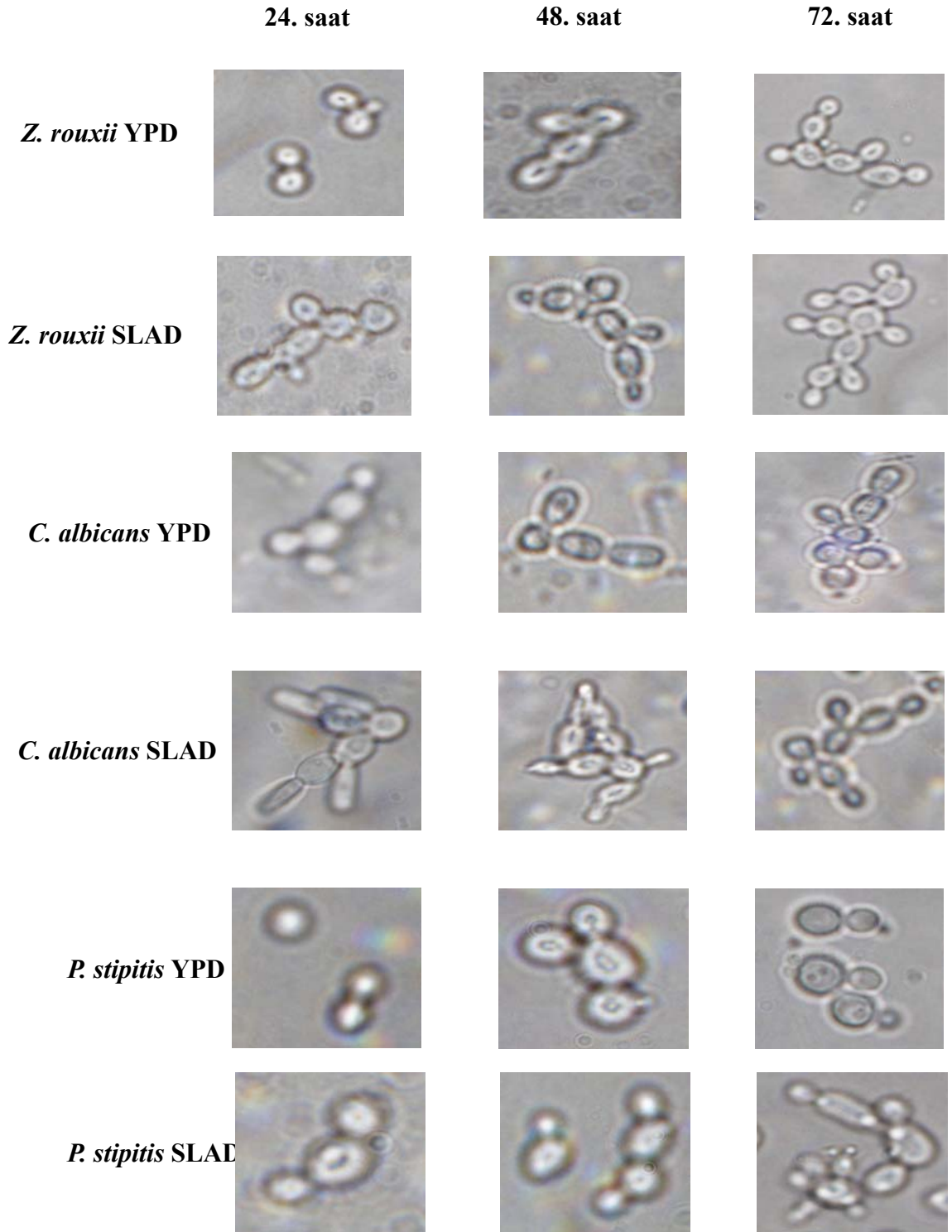
4.3.Mayaların Pseudohifsel Gelişimi

4.3.1.Pseudohifsel gelişimin uyarılması ve mikroskopik görüntüleri

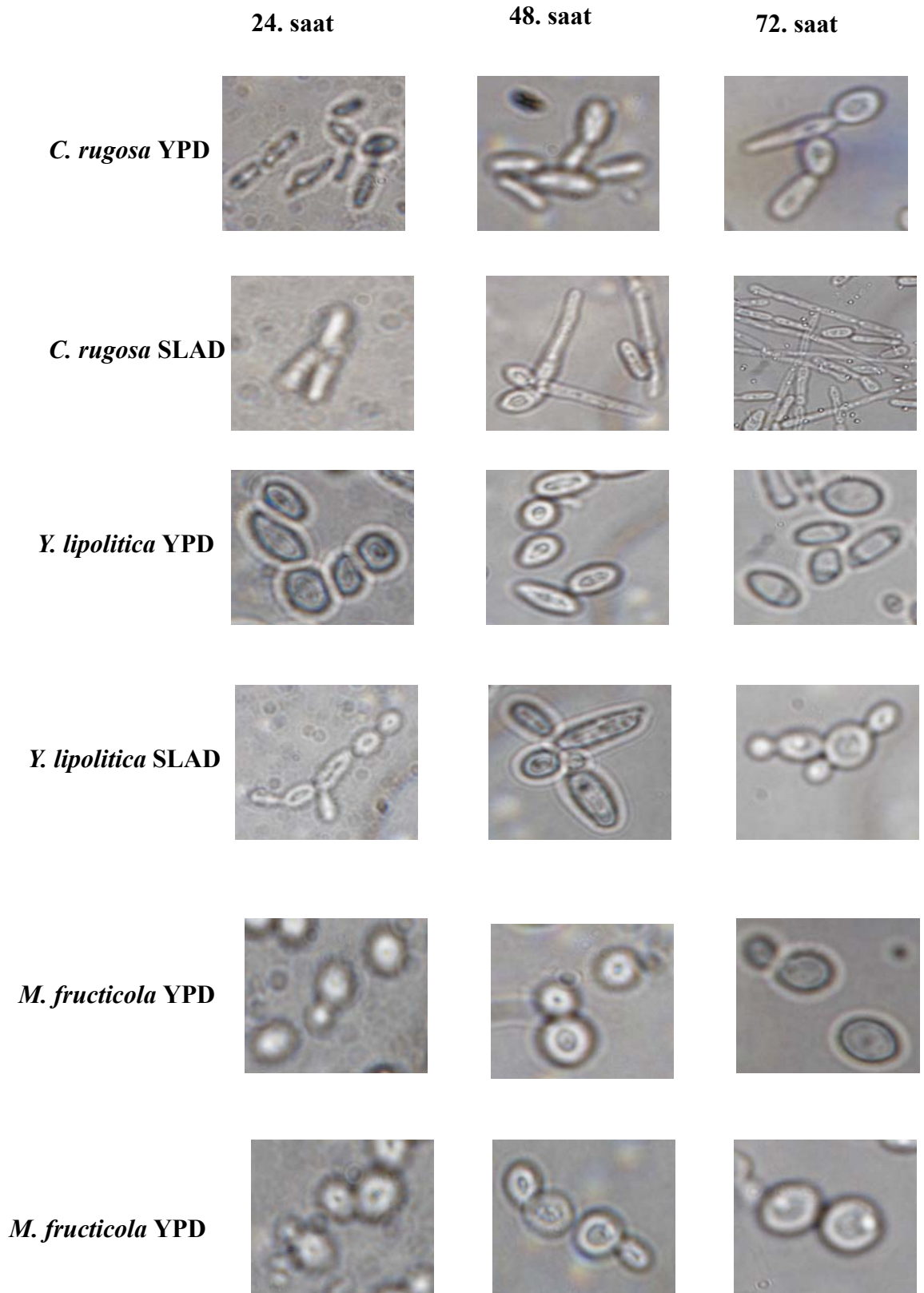
Pseudohifsel farklılaşmayı uyarabilmek için SLAD besi ortamında geliştirilen ve aynı zamanda kontrol amaçlı YPD’ de geliştirilen mayaların 24, 48 ve 72. saatlere ait mikroskopik görüntüleri Şekil 4.14’de verilmiştir. Kontrol olarak pseudohifsel farklılaşma gösterdiği bilinen *S. cerevisiae* $\Sigma 1278b$ suşu kullanılmıştır. 24. saatte *Z. bailii* YPD besiyerinde pseudohif oluşturmazken SLAD besi ortamında farklılaşma göstermiştir. Bu durumun *Z. rouxii*, *P. stipitis*, *C. rugosa*, *Y. lipolitica* ve kontrol suş için de geçerli olduğu belirlenmiştir. *C. albicans*’da ise 24. saatte hem YPD besi ortamında hemde SLAD besi ortamında pseudohifsel farklılaşma gözlenmiştir. Yapılan çalışmada 24. saatte *M. fructicola* ve *S. cerevisiae*’de ne YPD besi ortamında ne de SLAD besi ortamında pseudohifsel farklılaşmaya rastlanmamıştır. 24. saatte en çok görülen farklılaşma *Z. rouxii*, *C. albicans*, *Y. lipolitica* ve kontrol suşa aittir (Şekil 4.14).



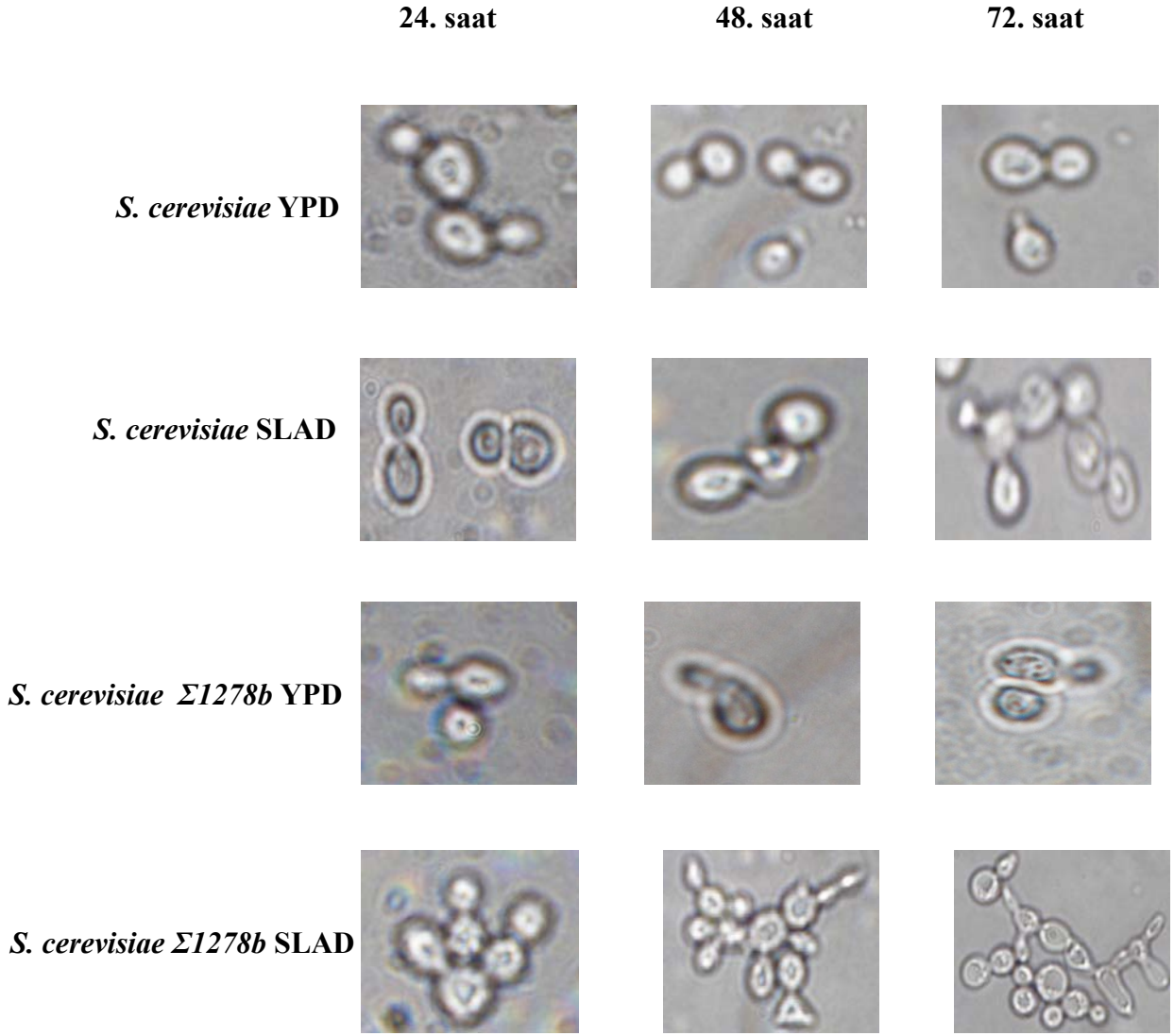
Şekil 4.14.Farklı maya suşlarında pseudohifsel farklılaşmanın uyarılması



Şekil 4.14. (Devam) Farklı maya suşlarında pseudohifsel farklılaşmanın uyarılması



Şekil 4.14. (Devam) Farklı maya suşlarında pseudohifsel farklılaşmanın uyarılması



Şekil 4.14. (Devam) Farklı maya suşlarında pseudohifsel farklılaşmanın uyarılması

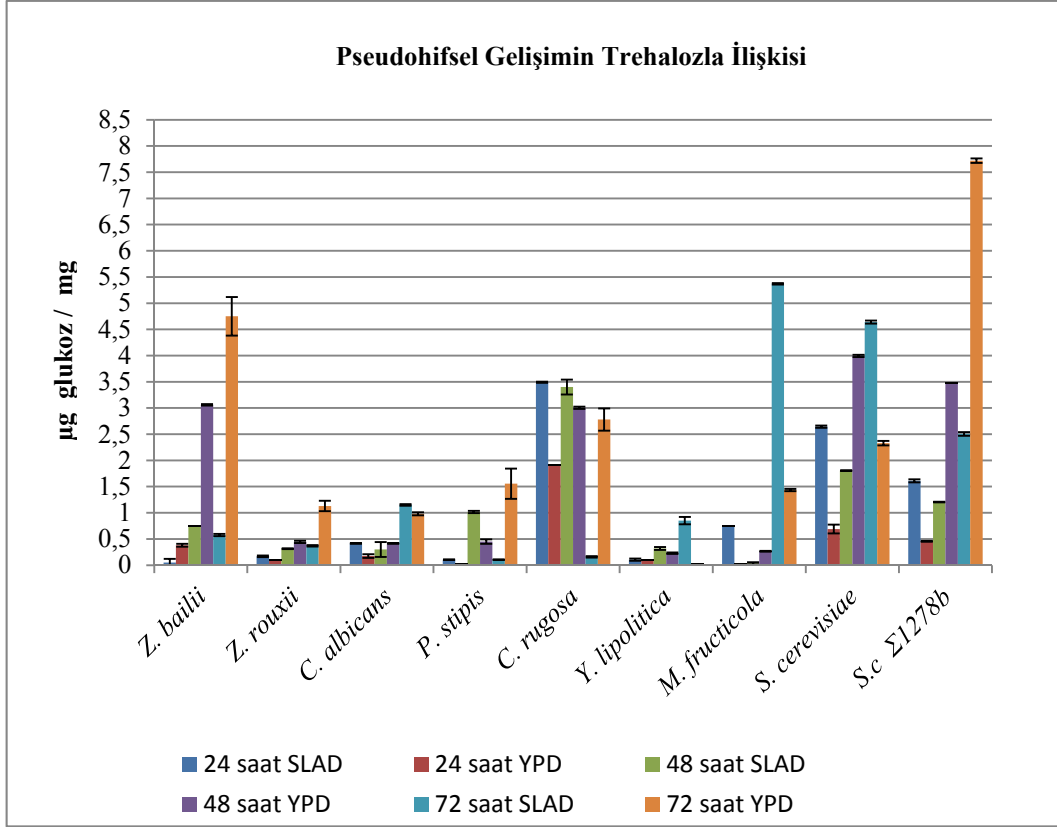
48. saatte ise *Z. bailii*'de YPD besi ortamında pseudohifsel farklılaşma belirmeye başlarken SLAD besi ortamında önemli bir artış gözlenmiştir. *Z. rouxii* için ise 48 saatte YPD besi ortamında pseudohifsel farklılaşma gözlenirken bu durum SLAD besi ortamında daha belirgin bir şekilde göze çarpmaktadır. Aynı durum *C. albicans* ve *P. stipitis* için de geçerlidir. Bunun yanı sıra *C. rugosa*, *Y. lipolitica* ve *S. cerevisiae*'de ise 48. saatte YPD besi ortamında pseudohifsel farklılaşma gözlenmezken SLAD ortamında az olmakla birlikte 24. saate göre daha fazla farklılaşma belirlenmiştir. *M. fructicola*'da ise bir değişim

gözlenmemiştir. 48. saatte en fazla farklılaşma kontrol suşta gözlenmekle birlikte; *Z. bailii*, *Z. rouxii* ve *C. albicans*'da da kayda değer değişim gözlenmiştir (Şekil 4.14).

72. saat sonuçlarına bakıldığında özellikle *Z. bailii*, *Z. rouxii* ve *C. albicans*'da gözlenen pseudohifsel farklılaşma kontrol suş *S. cerevisiae* $\Sigma 1278b$ 'de gözlenen farklılaşma gibi oldukça yoğun olarak saptanmıştır. Bu maya suşlarının hem YPD hem de SLAD besi ortamındaki değişimlerinin belirgin olduğu gözlenmiştir. *P. stipitis*'de ise SLAD ortamında filamentli gelişim gözlenirken YPD ortamında belirlenememiştir. *C. rugosa*'da 72. saatte gözlenen farklılaşma diğer maya suşlarından farklı olarak mayanın boyuna uzaması şeklinde belirlemiştir. *M. fructicola*'da 72. saatte de herhangi bir farklılaşma gözlenmezken *Y. lipolitica*'da az miktarda değişim SLAD besi ortamında saptanmıştır. *S. cerevisiae*'da 72 saatte gözlenen değişim diğer saatlerden daha yoğun olarak belirlenmiştir (Şekil 4.14).

4.3.1.Pseudohifsel gelişimin trehaloz metabolizmasına etkisi

Pseudohifsel farklılaşma ile trehaloz birikimi arasındaki ilişki Şekil 4.15'de verilmiştir. *Z. bailii* için bakıldığında 24 saatte, 48 saatte ve 72 saatte YPD ortamında biriktirdiği trehaloz miktarının SLAD besi ortamında biriktiren trehaloz miktarından daha yüksek olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.15.SLAD ve YPD besiyerlerinde geliştirilen mayaların zamana bağlı trehaloz birikimi (n=4)

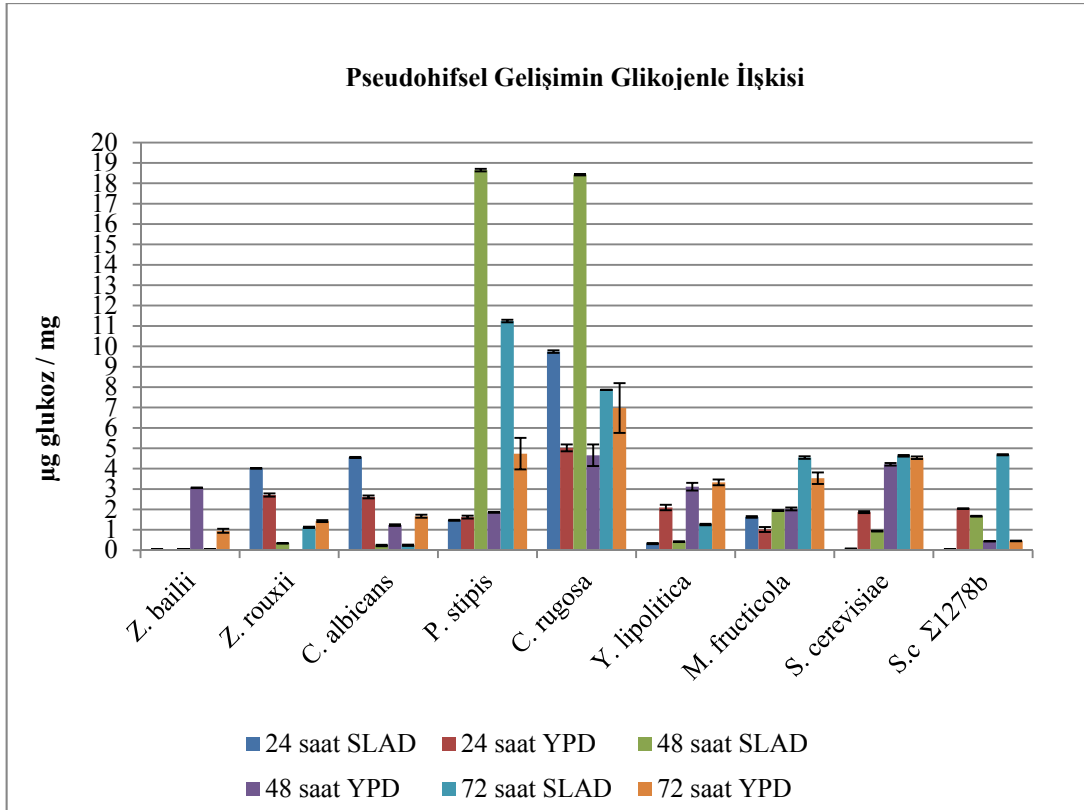
Z. rouxii için ise 24 saatte SLAD besi ortamında biriktirilen trehaloz miktarının (0.17 ± 0.01 µg glukoz / mg) YPD ortamında biriktirilen trehaloz miktarından (0.10 ± 0.00 µg glukoz / mg) biraz daha yüksek olduğu gözlenirken 48. ve 72. saatlerde ise tam tersi gözlenmiştir. *C. albicans*'ın 24 saatte SLAD ortamında trehaloz miktarı 0.42 ± 0.01 µg glukoz / mg olarak belirlenirken aynı sürede YPD ortamında biriktirilen trehaloz miktarı ise 0.18 ± 0.03 µg glukoz / mg olarak belirlenmiştir. *C. albicans*'ın 48 saatte SLAD ortamında biriktirdiği trehaloz 0.30 ± 0.10 µg glukoz / mg iken YPD ortamında 0.42 ± 0.01 µg glukoz / mg trehaloz birikimi saptanmıştır. 72. saatte ise SLAD ortamında biriken trehaloz YPD ortamından daha fazla olarak saptanmıştır. *P. stipitis* için 72. saat dışında diğer zamanlarda SLAD ortamında biriktirilen trehaloz miktarının YPD ortamından daha çok olduğu gözlenmiştir. Bu durum *C. rugosa*'da da tesbit edilmiştir. *Y. lipolitica* için 24, 48 ve 72. saatlerde SLAD ortamında biriktirilen

trehaloz miktarı YPD ortamındakinden fazla olarak belirlenmiştir. *M. fructicola*’nın 72. saatte SLAD ortamında biriktirdiği trehaloz miktarı yüksek olup 5.37 ± 0.01 µg glukoz / mg olarak saptanmıştır. *S. cerevisiae* için 48. saat hariç SLAD ortamında biriktirilen trehaloz miktarının daha fazla olduğu belirlenmiştir. Kontrol suş *S. cerevisiae* $\Sigma 1278b$ ’nin ise 24. saat dışında 48. ve 72. saatlerde YPD ortamında biriktirilen trehaloz miktarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. SLAD ortamında biriktirilen trehaloz miktarı 72. saatte *M. fructicola*’ya ait olup 5.37 ± 0.01 µg glukoz / mg’dır. Yine 72. saatte *S. cerevisiae*’nin biriktirdiği 5.37 ± 0.01 µg glukoz / mg trehaloz da SLAD ortamında biriktirilmiştir. *S. cerevisiae* $\Sigma 1278b$ ’nin 72. saatte biriktirdiği 7.72 ± 0.04 µg glukoz / mg trehaloz bu süreç içerisinde biriktirilen en yüksek değer olarak gözlenmiştir (Şekil 4.15).

4.3.2.Pseudohifsel gelişimin glikojen metabolizmasına etkisi

SLAD ortamı ve glikojen arasındaki ilişki kontrol olarak YPD besi ortamı kullanılarak Şekil 28’de verilmiştir. SLAD ortamında en yüksek glikojen birikimine 48. saatte *P. stipitis* (18.65 ± 0.06 µg glukoz / mg) ve *C. rugosa* (18.43 ± 0.03) suşlarında rastlanmıştır. *P. stipitis*’in 72 saatteki SLAD besi ortamında ki glikojen birikimi 11.25 ± 0.06 µg glukoz / mg ve *C. rugosa*’nın 72. saatteki SLAD besi ortamında ki glikojen birikim değeri 7.87 ± 0.01 µg glukoz / mg değerleri de diğer suşların farklı zamanlarda YPD ve SLAD ortamında biriktirdiği glikojen miktarından daha yüksektir. *Z. bailii* için en yüksek glikojen birikimine 48. saatte YPD besiyerinde ulaşılmıştır. *Z. rouxii*’nin 24. saatte SLAD besi ortamında oluşturduğu glikojen miktarı 4.02 ± 0.02 µg glukoz / mg olup *Z. rouxii* için en yüksek glikojen birikimidir. *C. albicans* için ise 24. saatte SLAD besi ortamında biriktirdiği glikojen miktarı 48. ve 72. saatlerde YPD ve SLAD ortamlarında biriken glikojen miktarından daha yüksek olup 4.55 ± 0.02 µg glukoz / mg olarak belirlenmiştir. *C. albicans*’ın 48. ve 72. saatlerde YPD ortamında biriktirdiği glikojenin SLAD ortamından daha yüksek olduğu belirlenmiştir. *P. stipitis*’in 24. saat dışında SLAD ortamında biriktirdiği glikojen miktarının YPD ortamına oranla yüksek olduğu tesbit edilmiştir. *M. fructicola*’nın 72. saatte SLAD

ortamında biriktirdiği glikojen miktarı 1.26 ± 0.03 μg glukoz / mg olup 24. ve 48. saatlerde SLAD besi ortamında biriktirilen glikojen miktarından daha yüksek olarak saptanmıştır. *S. cerevisiae*'nin 72. saatte SLAD ortamında biriktirdiği glikojen miktarı 4.63 ± 0.04 μg glukoz / mg olup *S. cerevisiae*'nin en yüksek glikojen miktarı olarak belirlenmiştir. Kontrol suş olarak kullanılan *S. cerevisiae* $\Sigma 1278b$ 'nin 72. saatte SLAD ortamında biriktirdiği glikojen miktarı *S. cerevisiae*, *M. fructicola*, *C. rugosa* ve *P. stipitis* suşlarında olduğu gibi yüksek ve 4.68 ± 0.02 μg glukoz / mg olarak tesbit edilmiştir (Şekil 4.16)

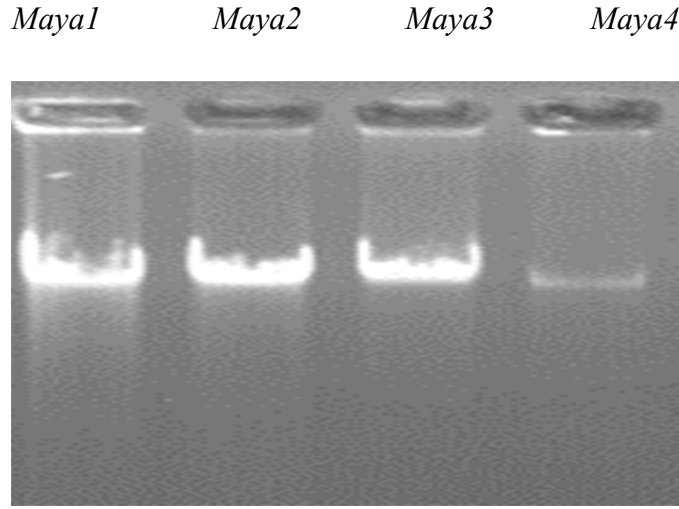


Şekil 4.16.SLAD ve YPD besiyerlerinde geliştirilen mayaların zamana bağlı glikojen birikimi (n=4)

4.4.İzole Edilen Mayaların Moleküler Yöntemle Tanımlanması

4.4.1.DNA izolasyonu

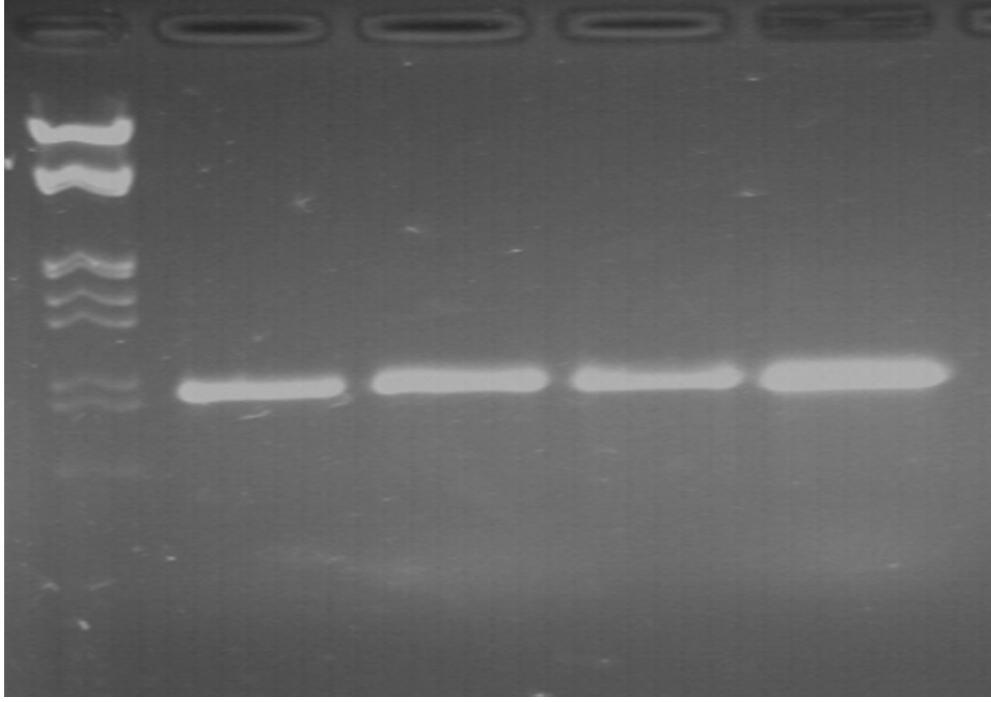
Maya1, *maya2*, *maya3* ve *maya4* şeklinde adlandırılan izolatların DNA izolasyon sonucu Şekil 4.17’de verilmiştir.



Şekil 4.17.İzolatlara ait genomik DNA

4.4.2.İncelenecek gen bölgesinin (ITS1-5.8SrDNA-ITS2) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile amplifikasyonu ve saflaştırılması

ITS1 ve ITS4 primer çifti kullanılarak ITS1-5.8S rDNA-ITS2 gen bölgesi yaklaşık 850 bp boyutunda (Şekil 4.18) amplifiye edilerek QIA Quick Gel Extraction Kit sistemi ile saf olarak elde edilmiş ve istenilen 850 bp büyüklüğündeki PZR ürünleri marker ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır.



Şekil 4.18.İzolatlara ait ITS1-5.8S rDNA-ITS2 gen bölgelerinin saflaştırılmış PZR ürünleri

4.4.3.PZR ürünlerinin dizi analizi

İzolatlara ait ITS1-5.8S rDNA-ITS2 gen bölgelerinin dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen dizi analizleri her bir izolat için NCBI Blast programı ile değerlendirilerek NCBI gen bankasında benzerlik gösterdikleri türler belirlenmiş ve saflaştırılan 4 suşun yüksek benzerlik oranları ile *Candida glabrata* olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.18).

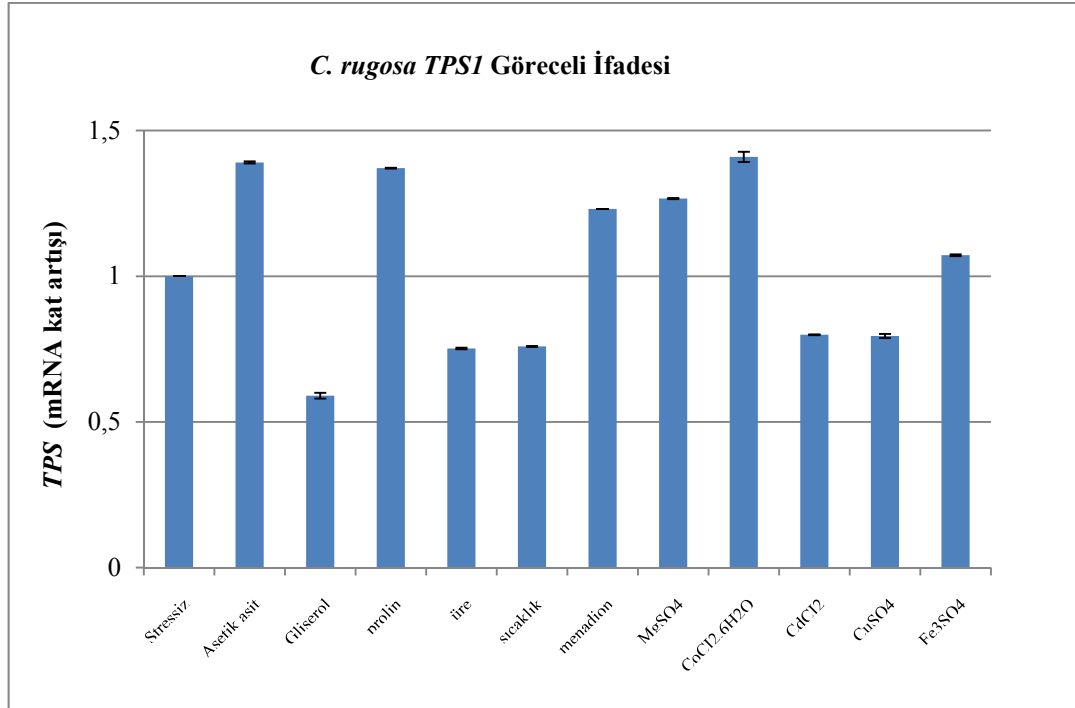
Çizelge 4.1.İncelenen izolatların dizi analizleri sonrası belirlenen en yakın NCBI gen bankası temsilcileri

İzolatlar	NCBI Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı	Maksimum Benzerlik Oranı	Accession Numarası	İşlem Tarihi
Maya 1	<i>Candida glabrata</i>	% 99	JN093145.1	20/03/2012
	<i>Candida glabrata</i>	% 99	FN394005.1	20/03/2012
Maya 2	<i>Candida glabrata</i>	% 99	JN093145.1	20/03/2012
	<i>Candida glabrata</i>	% 99	FN394005.1	20/03/2012
Maya 3	<i>Candida glabrata</i>	% 99	JN093145.1	20/03/2012
	<i>Candida albicans</i>	%99	JN093144.1	20/03/2012
Maya 4	<i>Candida glabrata</i>	%95	JN093145.1	20/03/2012
	<i>Candida albicans</i>	%95	Jn093144.1	20/03/2012

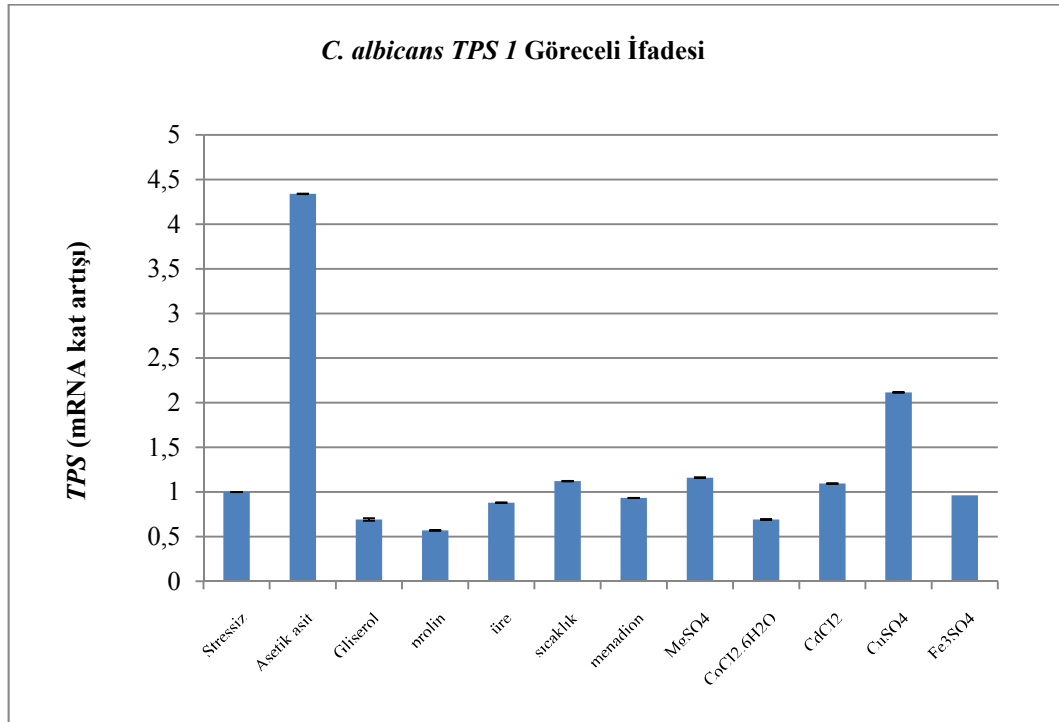
4.5.C. *rugosa*, *C.albicans* ve *S. cerevisiae*’ ya ait *TPS1* ve *GSY1* Gen Bölgelerinin RT-PZR ile Analizi

4.5.1.C. *rugosa*, *C. albicans* ve *S. cerevisiae*’ ya ait *TPS1* gen bölgelerinin RT-PZR ile analizi

Gerçek zamanlı PZR (RT-PZR) ile yapılan çalışma sonucu *C. rugosa*, *C. albicans* ve *S. cerevisiae*’ ya ait *TPS1* gen bölgesinin mRNA sentez düzeyleri şekil 4.19, 4.20 e 4.21’de verilmiştir. *C. rugosa*’nın stressiz koşullara oranla *TPS1* mRNA düzeylerinde; karbonhidrat stresi asetik asit’de 1.39 kat, azot stresi prolin’de 1.37 kat, oksidatif stres menadion’da 1.23 kat ve metal stresleri Mg’da 1.27; Co’da 1.40 ve Fe(III)’de 1.07 kat artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.19).



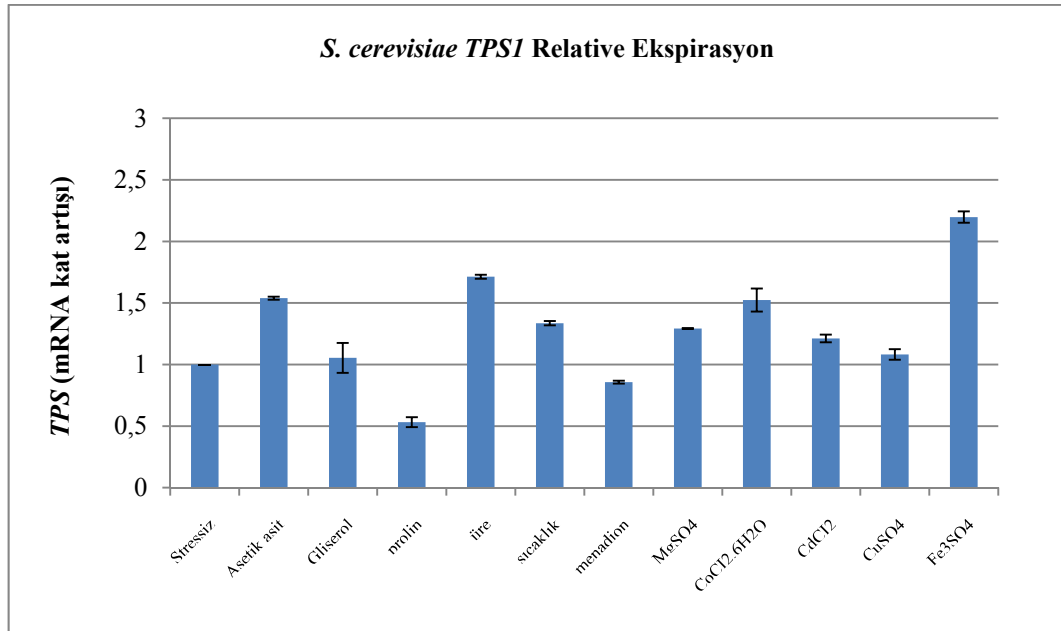
Şekil 4.19. *C. rugosa*'ya ait farklı stres koşullarındaki *TPS1* mRNA düzeyleri kat artışı ilişkisi (n=4)



Şekil 4.20. *C. albicans*'a ait farklı stres koşullarındaki *TPS1* mRNA düzeyleri kat artışı ilişkisi (n=4)

C. albicans için ise özellikle asetik asit stresinde stressiz koşullara oranla 4.3 kat daha fazla mRNA ekspirasyonu gerçekleşmiştir. Cu stresinde ise normal koşullara oranla 2.1 kat artış gözlenmiştir. Bunun yanı sıra sıcaklık stresinde 1.1 kat, Mg stresinde 1.1 kat, Cd stresinde 1.1 kat artış gözlenmiştir (Şekil 4.20).

Kontrol suş olarak kullanılan *S. cerevisiae*'nin ise stressiz koşullara oranla asetik asit stresinde 1.54 kat, üre stresinde 1.71 kat, sıcaklık stresinde 1.33 kat, Mg stresinde 1.29 kat, Co stresinde 1.52 kat, Cd stresinde 1.2 kat, CuSO₄ stresinde 1.08 kat ve Fe(III) stresinde 2.20 kat artış belirlenmiştir (Şekil 4.21).



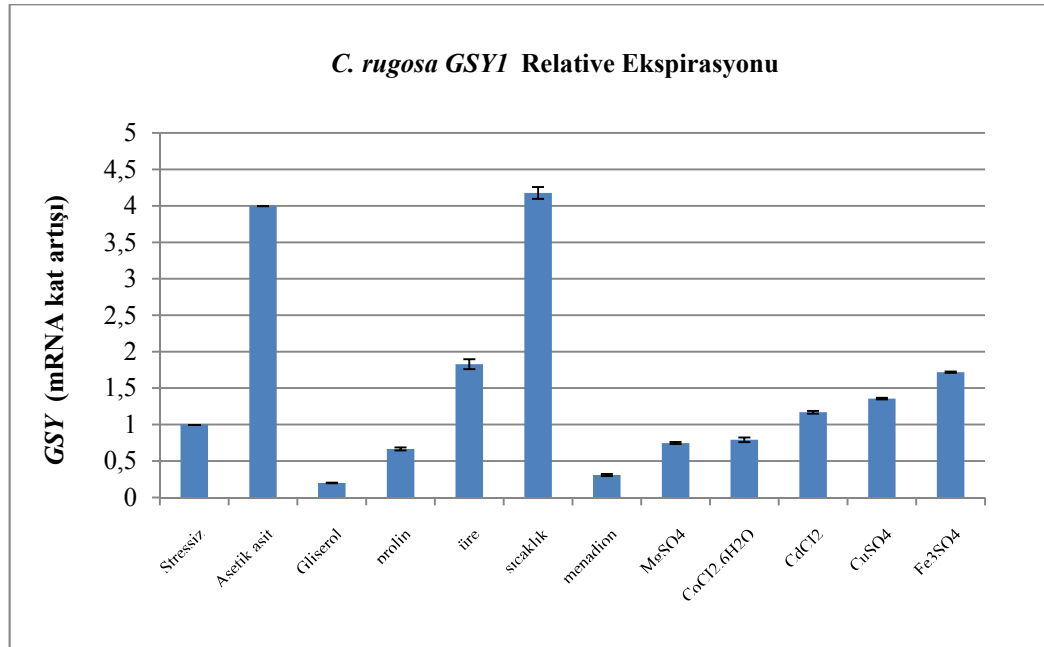
Şekil 4.21. *S. cerevisiae*'ya ait farklı stres koşullarındaki *TPS1* mRNA düzeyleri kat artışı ilişkisi (n=4)

4.5.1. *C. rugosa*, *C. albicans* ve *S. cerevisiae*'ya ait *GSY1* gen bölgelerinin R-T PZR ile analizi

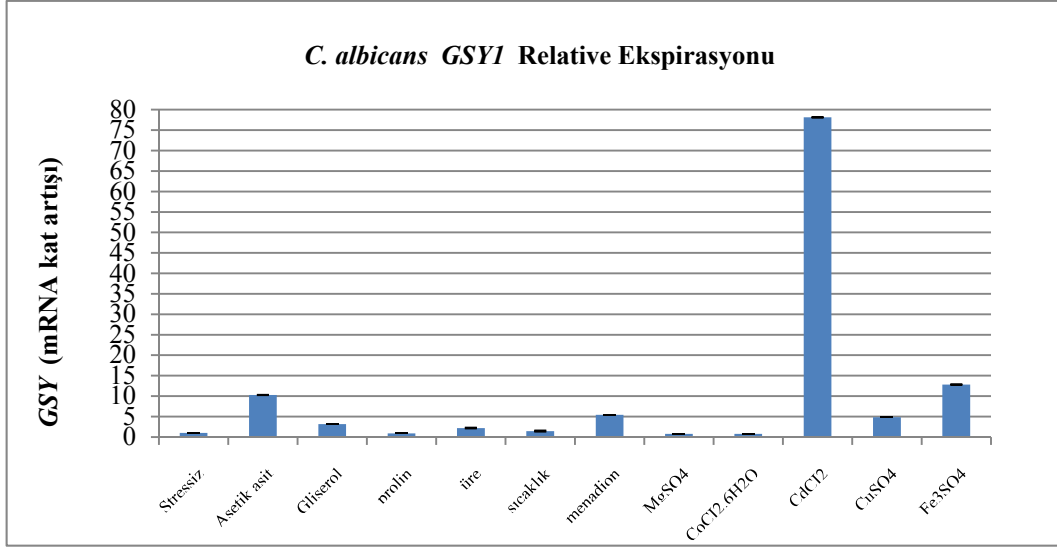
GSY1 gen bölgesinin mRNA ekspirasyon düzeyi *C. rugosa*, *C. albicans* ve *S. cerevisiae* için belirlenmiş ve Şekil 4.22, Şekil 4.23 ve 4.24'de verilmiştir.

C. rugosa için özellikle asetik asit ve sıcaklık streslerinde yüksek artış gözlenmiş ve asetik asit stresinde bu artışın stressiz koşula oranla 3.99 kat, sıcaklık stresinde 4.17 kat olduğu belirlenmiştir. Diğer bir artış oranı üre stresinde belirlenmiş olup 1.80 olarak tesbit edilmiştir. Bunun yanı sıra Cd stresinde 1.17 kat, Cu stresinde 1.36 kat, Fe(III) stresinde 1.72 kat olarak saptanmıştır.

Şekil 4.23'de belirtildiği gibi *C. albicans* *GSY* mRNA seviyesinin Cd stresinde 78.13 kat arttığı belirlenmiştir. Fe(III) stresinde ise *GSY* mRNA seviyesinin 12.8 kat artarken, asetik asit stresinde 10.20 kat; oksidatif stres-menadionla bu artışın 5.42 kat seviyesinde olduğu Cu stresinde 4.84 kat ve gliserol stresinde ise 3.15 kat olduğu belirlenmiştir.

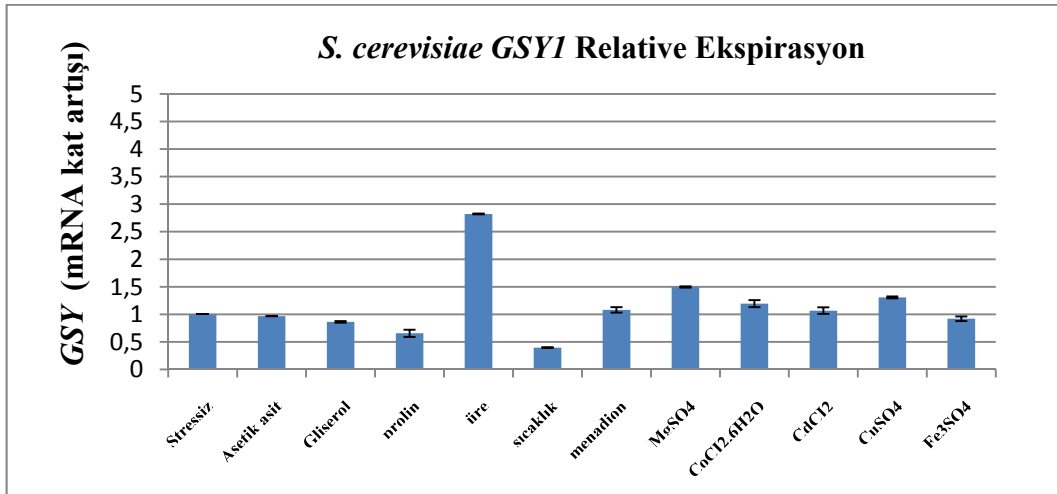


Şekil 4.22. *C. rugosa*'ya ait farklı stres koşullarındaki *GSY1* mRNA düzeyleri kat artışı ilişkisi (n=4)



Şekil 4.23. *C. albicans*'a ait farklı stres koşullarındaki *GSY1* mRNA düzeyleri kat artışı ilişkisi (n=4)

S. cerevisiae'nın *GSY1* mRNA seviyelerinde ise özellikle üre stresinde 2.82 kat artış belirlenmiştir. Oksidatif stres menadion'da artış 1.10 kat, Mg stresinde 1.50 kat, Co stresinde 1.20 kat, Cd stresinde 1.10 kat, Cu stresinde ise 1.30 kat olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.24. *S. cerevisiae*'ya ait farklı stres koşullarındaki *GSY1* mRNA düzeyleri kat artışı ilişkisi (n=4)

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Maya hücrelerinde depo karbonhidratları olarak bilinen trehaloz ve glikojen çevre koşullarına ve hayat döngüsü aşamalarına bağlı olarak farklı oranlarda biriktirilmektedirler (Parrou ve ark., 1997; Lillie ve Pringle, 1980). Birçok potansiyel endüstriyel uygulamalarından dolayı mayalarda trehaloz metabolizmasının genetik kontrolü ve trehaloz biyokimyası ile ilgili çalışmalar önem kazanmıştır. Farklı stres koşullarına maruz bırakılan mayalarda çalışılan bu depo karbonhidratlarının biyolojik fonksiyonlarının daha iyi anlaşılması kullanım alanlarını genişletmektedir (Plourde ve ark, 2000).

Glikojen ve trehaloz metabolizması ile ilgili çalışmalar daha çok *S. cerevisiae* ile yapılmış olup *C. albicans* (Zaragoza ve ark., 2003; Argüelles ve ark., 1997); *Yarrowia lipolitica* (Flores ve ark., 2011); *Z. bailii* (Cheng ve ark., 1999) ile ilgili az sayıda araştırma bulunmaktadır. Bununla birlikte çalışmada kullanılan diğer maya suşları *C. rugosa*, *P. stipitis*, *M. fructicola*, *Z. rouxii*'nin trehaloz ve glikojen metabolizması ile ilgili araştırmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada trehaloz ve glikojen metabolizmaları ile ilgili bilgi bulunmayan suşların farklı stres koşullarındaki trehaloz ve glikojen birikimleri enzimatik yöntemle belirlenmiştir. Lipaz aktivitesi nedeni ile bir çok çalışmada kullanılan *C. rugosa* 'nın son zamanlarda belirlenen patojenitesi bu maya suşunun önemini daha da arttırmaktadır (Dib ve ark., 1996). Yapılan bu çalışmada yüksek trehaloz ve glikojen birikimi gösteren ve daha önce depo karbonhidrat metabolizması rapor edilmemiş olan *C. rugosa* 'nın olası *TPSI* ve *GSYI* genlerinin farklı stres koşulları altındaki ifadesi kontrol suşlar olarak *C. albicans* ve *S. cerevisiae* kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmada aynı zamanda maya suşlarında farklı stres ortamlarında görülen pseudohifsel farklılaşmanın trehaloz ve glikojen metabolizmasına etkisi belirlenmiştir. Vajen örneklerinden elde edilen izolatların moleküler yöntemler ile tanımlanması yapılmıştır.

Mayalarda trehaloz durağan fazda ve bazı stres koşullarına yanıt olarak üretilmektedir. Trehalozun yıkımı ise glikojen depolarının yıkılmasından sonra

gerçekleşmekte olup bu süre hücre ölümüne denk gelmekte ve trehaloz canlılığı uzun süre korumak amacı ile tüketilmektedir (Lillie ve Pringle, 1980).

Lillie ve Pringle (1980) yaptıkları çalışmada glukoz varlığında, erken eksponansiyel fazda trehaloz ve glikojen miktarının oldukça düşük olduğunu ortamda hala glukoz varken glikojenin üretilmeye başlandığını ve glukoz tükenmeden hemen önce maksimum seviyeye ulaştığını belirlemişlerdir. Trehalozun birikiminin ise ortamdaki glukoz miktarının glikojen birikmeye başladığı zamankinden 3 kat daha az olduğunda başladığını görmüşlerdir.

Bu çalışmada maya suşlarının ilk 6 saatte trehaloz biriktirebildikleri belirlenmiştir ve bu durumun Plourde-Owobi ve ark.(2000), Basu ve ark., (2006) ve Jules ve ark. (2004)'ün belirttiği gibi besi ortamından trehalozun transportu ile gerçekleştiği söylenebilir. Glikolitik yolun kontrolü için trehaloz mutlaka sentezlenmelidir. Bazal seviyede de olsa az miktarda sentezlenen trehaloz sentezlenip *Hxk2*'yi kontrol etmektedir. Plourde-Owobi ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada trehaloz metabolizmasının bilinen genler dışında maltoz metabolizmasından etkilendiğini ve trehalozun sentezinde *TPS1*'in aktivitesi dışında dışarıdan alımının söz konusu olabileceğini vurgulamışlardır. Trehalozun ortamdan yüksek ve düşük affiniteli taşıyıcı sistem (α -glicoside transporter (*AGT1*)) ile taşınabileceğini belirtmişlerdir. *AGT1* (α -glicoside transporter) birçok disakkariti ortamdan transport edebilme yeteneğindedir (Jules ve ark., 2004; Basu ve ark., 2006). Maya özütü içeren besiyerleri trehaloz içerebilir. Araştırmacılar tarafından yapılan çalışmada trehalozun dışardan alımını ve bu durumun maltozla olan ilişkisini belirleyebilmek için *S. cerevisiae mal⁻ tps* mutantına pRS315 MAL63 plazmiti transforme edilmiştir. Maya, maya özütü içeren veya sentetik mineral besiyerinde karbon kaynakları eklenerek geliştirilmiştir. Hücre içi trehaloz enzimatik hidroliz yöntemi ile hücre dışına çıkarılmış ve hücre dışı galaktoz, glukoz ve trehaloz varlığı kromatografik yöntem ile belirlenmiştir. *tps1* mutantının glukozda gelişemediği ve herhangi bir karbon kaynağı varlığında trehaloz biriktirmediği gözlenmiştir. Galaktoz içeren besiyerinde MAL pozitif *tps1* mutantı suşta disakkarit birikimi tamamen silinmezken bunun tam tersi galaktoz mineral medyumda veya galaktoz sentetik medyumda sadece izogenik

yabanıl türün az miktarda trehaloz biriktirdiği görülmüştür. *tps1* hücrelerinde trehaloz birikiminin dışardan alımla gerçekleştiği gözlenmiştir. Trehaloz birikiminin MAL lokusu ile ilgisini belirlemek için *mal tps1* hücredeki trehaloz birikimi incelenmiş ve hücrenin maltoz varlığında yaşayabiliyorken trehaloz biriktirmediği tespit edilmiştir. Aynı şekilde *AGT1* delesyonu ile trehaloz birikim seviyesinin önemli derecede düştüğü belirlenmiştir. Dış kaynaklı trehalozun hücre kuru ağırlığının her bir gramı için % 13'ü geçemeyeceği, bu aşamada trehaloz yıkım enzimlerinin devreye girdiğini, bunun sebebinin de hücre içi ozmotik basınç dengesini korumaktan kaynaklandığını göstermişlerdir (Plourde-Owobi ve ark., 2000). Bu durumda yapılan deneylerde her bir suşun ilk 6 saatte biriktirdiği trehalozun bir kısmını maya özütü içeren besiyerinden transport ettiği düşünülebilir (Plourde-Owobi ve ark., 2000; Jules ve ark., 2004).

Farklı maya türleri ile yapılan bu çalışmada her bir maya suşunun zaman içinde trehaloz ve glikojen birikim miktarlarının farklı olduğu gözlenmiştir. *Y. lipolitica* ve *S. cerevisiae* (*Δ reg1*) dışındaki tüm maya suşlarının 24. saatten itibaren trehaloz biriktirdikleri belirlenmiştir. 48. ve 72. saatlerde belirtilen maya suşlarında trehaloz miktarının arttığı tespit edilmiştir. *Y. lipolitica* ve *S. cerevisiae* (*Δreg1*)'in 48. saatte ortamdaki trehalozu tükettiği belirlenmiştir. Çalışmada 72. saatte kadar çoğu maya için trehaloz birikimi devam ettiği gözlenmiştir. *Y. lipolitica* için durum daha farklı olmakla birlikte *Y. lipolitica*'nın 24. saate kadar trehaloz biriktirdiği, 48. ve 72. saatlerde trehalozu harcadığı belirlenmiştir.

Chi ve ark. (2001) *Saccharomycopsis fibuligera* ile yaptıkları çalışmada hücreleri 30 °C'de 200 rpm'de geliştirmişler ve maksimum trehaloz birikimine durağan fazın başlarında rastlamışlardır bu sürede elde ettikleri maksimum trehaloz miktarı % 16.5 w/w olarak belirtilmiştir.

Rua ve ark., (2008) yaptıkları araştırmada filamentli fungus, *Phycomyces blakesleeianus*'un zamana bağlı trehaloz ve glikojen birikimini incelemiş maksimum glikojen varlığına ekponansiyel gelişim fazının ikinci yarısında, 24. saatte rastladıklarını ve trehaloz içeriğinin glikojen içeriğinden daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada araştırmacılar maksimum trehaloz içeriğine ise 36. saatte ulaşmışlardır. Bu süre ekponansiyel gelişim fazının sonuna

rastlamaktadır. Her iki karbonhidratın taşınımının ortamda önemli derecede azalan glukoz içeriğinden sonra, durağan fazın başlangıcı ile başladığı ve miktarının 84. saatten sonra düştüğü gözlemlenmiştir.

Türkel (2005) farklı *Pichia* türleri ile yaptığı çalışmada maya suşlarının durağan fazdan taze besiyerine alındıkları zaman daha önce biriktirdikleri trehalozları hızlı bir şekilde degrede ettiklerini gözlemlemiştir. Taze besiyerine inokülasyondan sonra yaklaşık 6 saat içinde trehaloz miktarının yaklaşık olarak sıfıra düştüğü belirtilmiştir. Trehaloz birikiminin ikinci logaritmik fazda başladığı ve durağan faza kadar yüksek seviyelerde bulunduğu belirtilmiştir. *Pichia* türleri içerisinde *P. angusta*'nın trehaloz seviyesinin ise durağan fazın ortalarına kadar düşük kaldığı ve sonrasında trehaloz miktarının aniden yükseldiği gözlemlenmiştir. Stok glikojenin yıkımı ise aynı şekilde taze besiyerine alındığında hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir. *S. cerevisiae* için logaritmik fazın sonlarında glikojen birikimi gerçekleşirken *P. anomala*'nın glikojen içeriği logaritmik fazın erken safhasında artış göstermiştir ve durağan faz boyunca gittikçe artmıştır. *P. angusta* için ise glikojen birikimi durağan fazın sonlarına doğru gerçekleşmiştir. *P. farinosa* için glikojen miktarı diğer *Pichia* türlerine göre hep düşük kalmıştır. Aynı cinsin farklı türleri ile yapılan çalışmada dahi görülmüştür ki her bir türün trehaloz ve glikojen birikimi zaman ve miktar açısından kendi içinde farklılık göstermektedir. Açlığı önlemede risk sınırı her bir maya için farklı olduğundan bu çalışmada elde edilen sonuçlar mayaların farklı metabolizmalarından dolayı farklılık arz etmektedir.

Mayalar 30 saatin sonunda durağan faza girmekte ve glikojeni eksponansiyel fazın sonlarına doğru ortamdaki besin miktarı önemli derecede düştüğünde biriktirmeye başlamakta ve durağan fazın başlarında glikojeni tüketmektedirler (Parrou ve ark., 1999). Mayalarda glikojen trehalozdan önce tüketilen karbon kaynağı olup glikojenin yıkımı ise hücre canlılığını korumak amaçlı steroller ve doymamış yağ asitlerinin üretimi ile ilgilidir (Rua ve ark., 2008).

Bu çalışmadaki maya suşlarının biriktirdiği glikojen miktarı incelendiğinde her bir maya suşunun glikojen birikim tablosunun farklı olduğu

görülmüştür. *Z. bailii*, *Z. rouxii*, *C. albicans* ve *S. cerevisiae* ($\Delta reg1$)'in glikojeni ilk 24 saatte biriktirdiği ve 48. saatten sonra ortamda biriktirilen glikojenin harcandığı gözlenmiştir. Bununla birlikte *P. stipitis*, *C. rugosa* ve *Y. lipolitica*'nın ilk 12 saatte biriktirdikleri glikojen miktarı oldukça yüksek olup 48. saatte bu miktarın düştüğü ve 72. saatte tekrar glikojen miktarının arttığı saptanmıştır. *M. fructicola* ve *S. cerevisiae*'da ise glikojen miktarının zamanla arttığı bulunmuştur. Bu durumun yapılan diğer çalışmalarda da belirtildiği üzere her bir mayanın farklı glikojen metabolizmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Besinsel açlık mikroorganizmaların karşılaştığı en yaygın streslerden biridir. Glukoz ortamda tükendiğinde mayalar diauxic değişime girmekte, hücre dinlenmeye geçip metabolizmasını yeniden düzenlemekte, etanol ve asetat gibi fermente edilmeyen karbon kaynaklarından enerji sağlamaya çalışmaktadır. Hücre bölünmesi başladığında hücre post-diauxic faza girmekte ve bu aşamada gelişim oldukça yavaşlamaktadır. Karbon kaynağı tükendiğinde ise hücre durağan faza girmekte bu süre türe göre değişmektedir. Bu aşamalarda birçok gen transkribe olmaktadır (Gasch ve Werner-Wahburne, 2002). Aktif olan bu genlerin promotorlarında stres cevap elementleri (STRE) bulunmaktadır. Karbon açlığı durumu haploid ve diploid maya kültürlerinin durağan faza girmelerini sağlamaktadır (François ve Parrou, 2000).

Bu çalışma sırasında mayalar gecelik kültürleride dahil olmak üzere zayıf karbon kaynakları ile strese maruz bırakılmış ve taze besiyerine alındıktan yaklaşık 4 saat sonra trehaloz ve glikojen ölçümleri yapılmıştır. Çalışmada karbon stresi uygulamak amacı ile ortama alternatif karbon kaynağı olarak gliserol ve asetik asit eklediğimizde, asetik asit varlığında az miktarda olmakla birlikte sadece *Z. bailii*, *Z. rouxii* ve *S. cerevisiae* suşlarının trehaloz biriktirdiği saptanmıştır. Gliserol varlığında ise yine az miktarda olmak üzere *Z. bailii*, *C. rugosa* ve *S. cerevisiae* suşlarının trehaloz biriktirdiği belirlenmiştir. Glikojen birikiminin trehaloz birikimine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Asetik asit stresinde özellikle *C. albicans*, *P. stipitis*, *M. fructicola* ve *S. cerevisiae* suşlarının gliserol stresine oranla daha fazla glikojen biriktirdiği gözlenmiştir. Bütün örnekler için karbon stresinde trehaloz ve glikojen birikiminin oldukça düşük

olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışma sonucunda maya suşlarının trehalozdan daha çok glikojen biriktirmeleri konu ile ilgili daha önce yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Parrou ve ark. (1999) yaptıkları deneylerde mayaları glukoz açlığına ve asetat içeren minimal ortama maruz bırakmışlar, trehaloz ve glikojen döngüsünü incelemişlerdir. İki karbonhidratın mobilizasyonunun asetat varlığında glukoz açlığından daha hızlı olduğunu ve glikojenin trehalozdan daha hızlı mobilize olduğunu gözlemlemişlerdir. Araştırmacıların *S. cerevisiae* ile yaptıkları çalışmada glukoz açlığı (sınırlılığı) durumunun glikojen ve trehaloz metabolizması üzerine az etkisi olduğu vurgulanmıştır.

Glikojen birikim miktarının her bir maya için farklı düzeyde olmasının mayaların bu farklı karbon kaynaklarını stres kaynağı olarak algılamaları ve ekspansiyel faza daha çabuk geçmeleri ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada diğer araştırmalardan farklı olarak mayalar gecelik kültürleri de aynı olmak üzere prolin ve üre gibi zayıf azot kaynaklarının bulunduğu iki farklı besiyerinde geliştirilip trehaloz ve glikojen içerikleri enzimatik yöntemle belirlenmiştir. Çalışma sonucunda *S. cerevisiae* ve *S. cerevisiae (Areg1)*'in prolin varlığında daha fazla trehaloz biriktirirken *Y. lipolitica*, *M. fructicola* ve *Z. bailii*'nin her iki zayıf azot kaynağında aynı miktarda trehaloz biriktirdiği görülmüştür. Diğer maya suşlarında ise üre bulunan ortamda prolinin bulunduğu ortama göre daha fazla trehaloz birikimi belirlenmiştir. Genel olarak trehaloz birikiminin düşük olduğu bulunmuştur.

Farklı araştırma gruplarının konu ile ilgili yapmış oldukları çalışmalar incelendiğinde, bu çalışmada elde edilen bu sonuçlara kıyasla farklı maya suşlarında daha fazla trehaloz birikimi elde ettikleri görülmüştür. Jongersen ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada maya örneklerini zengin bir besiyerinden azot kaynağı içermeyen besi ortamına transfer etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda ilk 2 saatlik süreç içerisinde trehaloz miktarlarının arttığından daha sonra ise düştüğünden bahsetmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen sonuçların düşük olması maya örneklerinin zayıf da olsa bir azot kaynağına transfer edilmesine bağlanabilir.

Glikojen miktarları incelendiğinde ise, farklı maya türleri üre ve prolin olmak üzere farklı azot kaynaklarında üretildiğinde maya suşlarının farklı oranlarda glikojen biriktirdikleri görülmüştür. *C. rugosa*'nın biriktirdiği glikojen miktarı diğer maya türlerine göre oldukça yüksek bulunmuştur. Trehaloz ve glikojen miktarlarını karşılaştırıldığında ise tüm mayaların biriktirdiği glikojenin trehalozdan fazla olduğu gözlenmiştir. Lille ve Pringle (1980)'in belirttiği gibi her iki depo karbonhidratının hücredeki birikim ve tüketim miktarları hücrenin metabolizmasına göre değişmekte ve ilk biriktirilen ve tüketilen glikojen olmaktadır. Benzer şekilde yapmış olduğumuz çalışmada eksponansiyel gelişim aşamasına kadar zayıf azot kaynaklarında strese maruz bıraktığımız hücreler bu kısa süreç içerisinde ilk olarak glikojen biriktirmiştir. Glikojenin sentezinde yer alan enzimler trehalozun sentezinde görev alan enzimlerden daha fazla uyarılmıştır. Bu nedenle azot açlığında ilk olarak tercih edilen depo karbonhidratının glikojen olduğu düşünülmektedir.

Türkel (2005)'in yaptığı çalışmaya paralel olarak yapılan bu çalışmada farklı maya türlerinin azot stresi durumunda trehaloz ve glikojen birikimlerinin farklı düzeyde olduğu belirlenmiştir. Araştırmacı azot açlığının *P. anomala*'da yüksek trehaloz ve glikojen birikimine yol açtığını belirtirken *P. farinosa* için bu depo karbonhidratlarının birikiminin temel düzeyde kaldığını ve azot açlığı stresinin bu mayayı depo karbonhidratlarının birikimi açısından tetiklemediğini ifade etmiştir. Çalışmada yer alan diğer *Pichia* türü *P. angusta* ise azot açlığı stresinden etkilenecek trehaloz ve glikojen biriktirmiştir.

Bununla birlikte *Rhizopus oryzae* ile yapılan bir başka çalışmada, fungus normal gelişim ortamından azot kaynağı içermeyen yeni besi ortamına transfer edilmiş ve 1 saat sonra ortamdan toplanan kültürün trehaloz ve glikojen içeriği belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların aksine çalışmada *R. oryzae*'nin ve kontrol suş *S. cerevisiae*'nin azot açlığında kısa bir sürede trehaloz biriktirdiği belirtilmiştir (Uyar ve ark., 2010).

Bu çalışmada yapılan karbonhidrat ve azot açlığı stresleri genel olarak değerlendirildiğinde glikojenin trehalozdan daha önce ve daha yüksek miktarda

biriktirildiği belirlenmiştir. Benzer şekilde yapılan çalışmalar incelendiğinde farklı araştırma grupları ile paralel sonuçlar bulunmuştur.

Jongersen ve ark. (2002) *S. cerevisiae* ile yaptıkları çalışmada maya hücrelerini açlık ortamına almışlar ve 8 saat bu ortamda kaldıktan sonra trehaloz miktarının analizini yapmışlardır. Sonuç olarak trehaloz miktarının zengin besiyerindekine oranla 4 kat arttığını göstermişlerdir. Trehaloz birikim oranının açlık ortamına alındıktan sonra ilk iki saat içinde hızlı bir şekilde yükseldiği, 2 saatten sonra % 25 oranında düştüğü ve son iki saatlik süreçte ise trehaloz birikim miktarında önemli bir değişiklik olmadığı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. Aynı çalışmada glikojen içeriğinin ise açlık ortamında 2 kat artış gösterdiğini ve bu birikimin ilk 2 saatte olduğunu vurgulanmışlardır. Stres durumunda önce tüketilen karbonhidratın glikojen olduğunu trehalozun ise daha ekonomik olarak harcandığını belirtmişlerdir.

Lille ve Pringle (1980) ise *S. cerevisiae* ile yaptıkları benzer çalışmada glikojen birikiminin açlık ortamına aktarıldıktan sonra bir saat içinde başladığını trehaloz birikiminin ise 4. saate kadar başlamadığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar trehaloz ve glikojen birikiminin farklı tip besinsel açlıklara cevap olarak hücre tarafından biriktirildiğini ve bu durumun ortama adapte olmak için gerekli değer kadar olduğunu belirtmişlerdir. Bu birikim ve tüketilme değerleri her iki depo karbonhidratı için farklı olmakla birlikte bu durumun her ikisinin hücrenin ekonomi politikasında oynadığı farklı rollerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Aerobik organizmalar oksijeni enerji elde etmek amacı ile gıda moleküllerinin oksidasyonunda kullanmaktadırlar. Tamamen indirgenmeyen oksijen hücrede süperoksit radikaller, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu sağlamaktadır. ROS'lar ise hücresel komponentleri oksitleyerek ciddi hasarlara sebep olabilmektedirler. Bu zarar onarılmadığı sürece kanser, diyabet, damar tıkanıklığı ve erken yaşlanma gibi birtakım hastalıklar ortaya çıkabilmektedir (Mutoh ve ark., 2005). Bu çalışmada hücreyi oksidatif strese maruz bırakmak amacı ile bir kinon olan menadion (2-metil-1,4-naftokinon: vitamin K3) kullanılmıştır. (Castro ve ark., 2008).

Menadion vitamin K'nın sentezinde öncül olarak davranmaktadır. Düşük seviyede menadion (2µM) oksidatif stresi indüklerken yüksek miktarda menadion ise doku hasarlarına, mitokondriyal DNA hasarlarına ve hücre ölümlerine neden olabilecek toksik oksidatif strese neden olmaktadır (Loor ve ark., 2010).

Bu araştırmada gelişme ortamına son konsantrasyon 40 µM olacak şekilde eklenen menadionla oluşturulan oksidatif stres sonucunda farklı mayaların biriktirdiği trehaloz ve glikojen miktarını enzimatik yöntem ile belirlenmiştir. Hücreler yaklaşık 3 saat stres koşuluna maruz bırakılmıştır. Sonuç olarak, kontrol olarak kullanılan *S. cerevisiae* suşları dahil olmak üzere tüm mayalarda 3 µg glukoz / mg geçmeyecek miktarda trehaloz birikimi görülmüştür. Aynı koşullarda hücrelerin glikojen birikimleri ise beklendiği gibi kontrol suş *S. cerevisiae* (*Areg1*)'den daha düşük bulunmuştur. Maya suşlarının trehaloz ve glikojen birikim miktarları karşılaştırıldığında ise *Z. bailii* ve *Z. rouxii* hariç diğer mayaların glikojen birikimlerinin trehaloz birikimlerinden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Tüm mayalar arasında diğer stres koşullarında da gözlemlendiği gibi *C. rugosa*'nın önemli miktarda glikojen biriktirdiği saptanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları Kanwal ve ark. (2011)'in yaptıkları çalışma ile uyuşmakta olup *Z. bailii* ve *Z. rouxii* hariç diğer maya hücrelerinin oksidatif stres altında ilk önce glikojeni biriktirdiği tespit edilmiştir.

Yaptığımız çalışmaya paralel olarak Kanwal ve ark. (2011) oksidatif stresin *S. cerevisiae* stok karbonhidratları metabolizmasına etkisini incelemişler ve stres oluşturmak amacı ile 5mM dietil maleat kullanmışlardır. Oksidatif stresin trehaloz birikimine ciddi bir etkisi olmadığını sadece stressiz koşullara oranla 1.50 kat arttığını belirtmişlerdir. Glikojen içeriğinin ise trehaloza oranla daha fazla arttığını belirtmişlerdir. Trehalaz miktarında 1 saat içinde artış gözlenmiş ve bu stres koşulu altında trehalozun yıkıldığını düşünmüşlerdir. Stres koşulu altında hücreyi koruyabilmek amacı ile glikolitik akışın kontrol altına alındığı ve glikojenin birikimindeki artışın sebebinin ise glikojenin glikolitik akışı kontrol etmesinden kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Gash ve ark (2000) *S. cerevisiae* ile yaptıkları çalışmada maya hücrelerini 0.3 mM H₂O₂ ve 1M menadionla oksidatif strese maruz bırakılmışlardır. Hücrenin

bu stresler altında gen anlatım profilini incelemişlerdir. Her iki ajanda da gen anlatımının benzer olmasına rağmen aslında her iki ajanın hücrede farklı reaktif oksijen türlerini oluşturmakta olduğunu ve bu stresin Yap1p transkripsiyon faktörü aracılığı ile farklı genleri aktif hale getirdiklerini belirtmişlerdir.

Zaragoza ve ark., (2003), yaptıkları çalışmada hidrojen peroksit (50mM) ile oluşturdukları oksidatif stresin *C. albicans* *TPS1* geni üzerindeki transkripsiyonel etkisini incelemişlerdir. Trehaloz birikimi Tps1p'in aktivasyonu ve Nth1p'in inaktivasyonu ile olmaktadır. Yapılan deneyde H₂O₂'nin Tps1p aktivitesini indüklediği ve hücre içi trehaloz miktarını arttırdığı belirtilmiştir. *tps1/tps1* mutantlarının oksidatif ajanlara maruz kaldıklarında hücre ölümleri ile sonuçlandığı gözlenmiştir. Araştırmacıların yaptıkları çalışmada maya hücresi sıcaklık ve ozmotik stres gibi farklı stres koşullarına maruz bırakılmış fakat bu stres koşullarında ölümle karşılaşılmamıştır. Singer ve Lindquist (1998)'e göre hücre maruz kaldığı ROS'lara karşı membran proteinlerini ve fosfolipidlerini dengeleyebilmek için trehaloza gereksinim duymaktadır.

Nery ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada maya hücrelerini % 10 trehaloz ile uyarıldıklarında hidrojen peroksit karşı daha toleranslı oldukları gözlemlenmiştir. Bu trehalozun peroksit karşı önemli bir koruyucu ajan olduğunu göstermektedir. Araştırmacılar yaptıkları deneylerde *tps1* mutant hücrelere H₂O₂ stresinde ve menadion stresinde trehalozu dışarıdan vermişler ve H₂O₂ stresinin membran oksidasyonu yarattığını ve trehalozun dışarıdan verildiğinde daha etkili bir koruma oluşturduğunu, menadion için ise etkisi hücre içinden başladığından oksidatif stresten korunmak amacı ile trehalozun hücre içi birikiminin daha etkili olduğu gözlemiştir.

Stres cevabı ile trehaloz ve glikojen birikimi arasında kuvvetli bir ilişki vardır ve ilişki genlerin aktivasyonuna bağlıdır. Sadece bilinen genler değil glikolitik enzimleri kodlayan genler, protein yıkım faktörleri ve plazma membran faktörleri de stres cevabında rol oynamaktadır. Bu genlerin transkripsiyonel düzenlenmesi stres koşullarında aktive olan ısı şoku faktörleri HSF (heat shock factor) ile ilişkilidir. Son zamanlarda bu genlerin promotor bölgelerinde ortak sekans olarak bulunan CCCCT dizisi belirlenmiştir. Bu dizinin stresle indüklenen

birçok gende (*SSA3*, *CTT1*, *HSP12*, *TSP2*) de yer aldığı bilinmektedir. Bu genler için bu DNA elementleri genel ismi ile STRE (stres cevap elementleri) olarak adlandırılmaktadır. STRE motiflerinin aynı zamanda trehaloz ve glikojen sentezinden sorumlu genlerde de bulunduğu gözlenmiştir. STRE elementlerinin kontrolünde olan genler sıcak stres, osmotik stres, düşük pH ve besin açlığında aktif olarak transkribe olmaktadır (Winderickx ve ark., 1996).

Bu çalışmada zengin besiyerinde geliştirilen farklı maya hücreleri taze kültüre aktarıldıktan sonra OD=0.5’de sıcaklık stresi oluşturmak amacı ile 25 °C’den 39 °C’ye aktarılmış ve sıcaklık stresinin depo karbonhidratlarının birikimine olan etkisi incelenmiştir. 25 °C’de ve 39 °C’de geliştirilen mayaların bazılarının yüksek trehaloz, bazılarının ise yüksek glikojen biriktirdiği gözlenmiştir. Sıcaklık stresinde en yüksek trehaloz birikimi *C. albicans*, *P. stipitis*, *C. rugosa* ve *M. fructicola* suşlarında saptanmıştır. Tüm suşlar için 39 °C’deki trehaloz birikimi 25 °C’deki trehaloz birikiminden oldukça yüksek bulunmuştur. Sıcaklığın maya suşlarında uygulanan stres koşulları arasında trehaloz birikimini en çok tetikleyen stres koşulu olduğu belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan maya türlerinin trehaloz birikiminin kontrol olarak kullanılan *S. cerevisiae*’nin trehaloz birikiminden yüksek olduğu bulunmuştur.

Sıcaklık stresinin glikojen birikimi üzerindeki etkisi araştırıldığında ise *Z. bailii*, *Z. rouxii*, *Y. lipolitica*, ve *M. fructicola*’nın glikojen seviyesinde 39 °C’de 25 °C’ye göre azalma gözlenmiştir. Çalışmada kullanılan diğer mayalarda ise 39 °C’de glikojen birikimi daha yüksek olmakla birlikte mayalardaki glikojen birikimi trehaloz birikimi kadar artış göstermemiştir. Çalışılan maya suşları arasında diğer stres koşullarında olduğu gibi *C. rugosa*’da sıcaklık stresinde de yüksek glikojen birikimi belirlenmiştir.

Parrou ve ark. (1997) tarafından yapılmış olan benzer bir çalışmada *TPS1*-LacZ füzyonları ile farklı sıcaklıklarda depo karbonhidratlarının *S. cerevisiae*’daki metabolizmasını incelemişler ve hücreleri 33 °C’ye transfer edildiklerinde *TPS1*’in aktivitesinin arttığı gözlemlenirken 37-38 °C’de maksimuma ulaştığı gözlenmiştir. 40 °C’nin üstünde ise *TPS1* aktivitesi sıfıra düşmüştür. 42 °C’nin üstünde *NTH1* ve glikojen genlerinin aktivitelerinin düşük olduğu

gözlemlenmiştir. Glikojen sentaz aktivitesi 25 °C ile 30 °C arasında aktif iken 42 °C’de % 25 azalmıştır.

Li ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada *S. cerevisiae*’yı 30 °C’den 42 °C’ye aktararak sıcaklık stresine maruz bırakmışlardır. Hücre içi trehaloz miktarının sıcak stresinin ilk 1 saatinde oldukça arttığını belirlemişlerdir. Trehaloz birikimi yüksek sıcaklıklarda proteinlerin doğal konformasyonlarında kalmalarını sağlamaktadır. 1-2 saat sonra trehaloz birikiminin biraz daha düştüğü gözlemlenmiştir. Trehalozun bu degradasyonunun hücreyi sıcak şoktan korumak amacı ile gerçekleştirildiği düşünülmektedir. Başlangıç sıcak şokun uygulanmasından 2-4 saat sonrasında trehaloz miktarının tekrar arttığı ve 4. saatte maksimum seviyesine ulaştığı belirtilmiştir. 6 saatlik gözlemin son iki saatlik periyodunda ise trehaloz miktarında önemli bir düşüş olmuştur ve bu durum ortamdaki glukoz miktarının düşüşüne bağlanmıştır. STRE’ler stres koşullarına karşı hücreye tolerans kazandırmaktadır. Mayalarda bulunan Msn2p/Msn4p transkripsiyon faktörleri *NTH1*, *TPS1* ve *TPS2* genlerinin promotor bölgelerine bağlanarak onların transkripsiyonunu sıcak streste arttırmaktadır (Li ve ark., 2009).

Ribeiro ve ark. (1999) tropikal maya hücrelerinde trehaloz birikimini inceledikleri çalışmada maya hücrelerinin bir serisini 50.5 °C’de 8 dakika diğer serisini ise 40 °C’de 60 dakika ve hemen sonrasında 50.5 °C ‘de 8 dakika sıcaklık stresine maruz bırakmışlardır. Çalışmada *S. cerevisiae*, *Candida*, *Clavispora*, *Kluyveromyces* ve *Torulaspora*’ya ait türler kullanılmıştır. Maya hücreleri habitatları nedeni ile yüksek sıcaklıklarda canlı kalabilmişlerdir. Glukozda gelişim süresince maya hücreleri farklı sıcak şoklarına düşük direnç geliştirmiş olup düşük trehaloz birikimi gözlenmiştir. Durağan fazdaki hücrelerde ise yüksek trehaloz birikimi ve yüksek direnç belirlenmiştir. Mayalar 28 °C’den 50.5 °C’ye transfer edildiklerinde % 8’in altında canlılık göstermişlerdir. Bu hücrelerin trehaloz birikimleri 5 mg/g kuru ağırlığın altındadır ve koruyucu bulunmadığından dolayı hücre ölümleri oldukça yüksektir. Maya hücreleri 40°C’de 60 dakika ön sıcaklık muamelesinde adaptiv cevap geliştirerek bir önceki duruma oranla daha fazla trehaloz biriktirmişlerdir ve koruyucunun yüksek

sentezinden dolayı hücre canlılığı da korunmuştur. Çalışmada kullanılan maya türleri bu sıcaklık değişimlerine farklı trehaloz birikimleri ve canlılık oranları ile cevap vermişlerdir. Bu durumun sıcak şok proteinlerinin (Hsps) termotoleranslığı arttırması ile ilgili olduğunu belirtmişlerdir.

Türkel (2005) yaptığı çalışmada farklı *Pichia* türlerini OD=0.5’de 25 °C’den 37 °C’ye transfer ederek sıcaklık stresi uygulamıştır. *P. anomala*’da sıcaklık stresinden sonra glikojen miktarının ortalama % 40 düştüğünü, trehaloz miktarının ise arttığını belirtmiştir. *P. angusta* için ise sıcak stresinde trehaloz ve glikojen biyosentezi indüklenmemiştir. Beklendiği gibi *S. cerevisiae*’da ve onun gibi *P. farinosa*’da sıcaklık stresi ile trehaloz biyosentezi aktif hale gelmiştir. Glikojen miktarındaki düşüşün glikojenin stresle aktif hale gelen döngüsünden ve tüketiminden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Zahringer ve ark. (1997) yaptıkları çalışmada stres koşulunun trehaloz üzerindeki etkisine *NTH1* geni aracılığı ile incelenerek sıcaklık stresinin trehaloz tüketimindeki rolünü anlamaya çalışmışlardır. Hücreler 40 °C’de sıcak strese maruz bırakılmışlardır ve trehaloz seviyesinde artış gözlenmiştir. Sıcaklık stresi süresince hem nötral trehalazın hemde trehaloz sentez enzimlerinin aktivitelerinde artış gözlenmiştir. Araştırmacılara göre tehalezun bu döngüsü hücrenin glukoz içeriğini sabit tutmaya çalışmasından kaynaklanmaktadır.

Yapılan çalışmada maya hücrelerinin sıcaklık stresinde depo karbonhidratı olarak trehalozu biriktirdiği ve daha önce yapılan çalışmalarda belirtildiği gibi sıcaklık stresinde proteinlerini koruma altına almak için yaptığı söylenebilir (Li ve ark. 2009). Sıcaklık stresinde glikojen miktarı düşen mayaların trehaloz birikimleri 25 °C’ye oranla yüksektir. Bu durumun glikojenin trehalozdan daha önce sentezlenen ve stres koşullarında trehalozdan önce tüketilen depo karbonhidratı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda belirtildiği gibi bizim çalışmamızda da trehaloz birikiminin sentezden sorumlu genlerin transkripsiyonundaki artıştan kaynaklandığı söylenebilir. Nitekim sıcaklık stresinde trehaloz sentez genlerinin promotor bölgelerinde yer alan STRE elementlerinin Msn2p/4p transkripsiyon faktörleri ile aktif hale geldiği çıkan sonuçlarla yorumlanabilir (Li ve ark., 2009).

Bakır ve demir mayalar için temel elementler olup birçok enzimde kofaktör olarak rol oynamaktadırlar. Bu iki metalin asimilasyonu ve sonraki metabolizması mayalarda yakın ilişkilidir. Mayaların bakır ve demir metabolizmalarını anlamak patojenitelerini anlamak açısından önemlidir. Düşük miktarlarda bakır maya için iz element olup yüksek konsantrasyonlarda hücre için toksiktir (Walker, 1998). Bakır toksisitesi bakırın nükleik asit ve enzimlerle olan etkileşimi ile ortaya çıkmaktadır. Fakat en büyük zararı plazma membranının bütünlüğünü bozmasıdır. Mayalarda bakır iyonlarının dengesi birçok alımla, akışla ve dış ortamdaki bakır iyonlarının varlığı ile ayarlanmaktadır. Bakır *CUP1* geni tarafından kodlanan bakır-metallothionein proteinleri ile hücre içinde kontrol edilmektedir. Böyle düşük moleküler ağırlıklı proteinler yüksek miktarda toksik metallerle karşı koruyucu olarak sentezlenmektedir. Bakır iyonlarınca indüklenen toksisiteyi önlemenin yolu bakır mineralizasyonunun kolaylaştırılmasıdır. Süreç hücre yüzeyinde CuS'lerin birikmesine olanak sağlamaktadır. *S. cerevisiae*'da *SLF1* geninin bu süreci kontrol ettiği belirlenmiştir. Bakırın hücre içine transportundan *CTR1* geni tarafından kodlanan plazma membran proteinleri sorumludur ve bu gen hücre 10 μM altında bakır içeren ortamda geliyorsa genin anlatımı artmaktadır (Walker, 1998). Bu transporter, mayalarda Fe(II) alımında da rol oynamaktadır. Hücre içine demir taşınımında siderefor olarak bilinen bileşikler rol oynamaktadırlar. Mayalar çözünmeyen Fe(III) iyonlarını biyolojik olarak aktif ve çözülebilen Fe(II) iyonlarına dönüştürmektedirler. *S. cerevisiae*, *Sch. pombe* ve *C. albicans* plazma membranının demir redüktaz aktivitesi ile hücre dışı indirgemeyi başarmaktadırlar. *S. cerevisiae*'da bu enzim *FRE1* tarafından kodlanmaktadır. Ağır metallerin ise 100 μM 'dan fazlası toksik olarak ifade edilmektedir. *S. cerevisiae* ağır metallerle karşı pasif hücre duvar biyosorpsiyonu sergilemektedir. Birçok mayalarda kadmiyum direncine karşı sentezlenen sitoplazmik Cd^{+2} bağlayan metallothionein kompleksler belirlenmiştir (Walker 1998). Magnezyum ve potasyum gibi metaller mayaların gelişimi için milimolar düzeyinde gerekmektedir. Magnezyum birçok glikolitik enzimin aktivitesi için gerekmektedir. Önemli metabolik enzimleri etkilemesinin yanında metal iyonları hücre membranının stabilitesini ve dinamiğini de etkilemektedir (Walker, 1998).

Bu çalışmada maya hücrelerinde metal stresi oluşturabilmek için son konsantrasyon 0.1 mM olacak şekilde $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, MgSO_4 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CdCl_2 çözeltileri besi ortamına hücre yoğunluğu OD:0.5 olduğunda eklenmiştir. Maya hücreleri için toksik olduğu bilinen bu konsantrasyonun mayalarda depo karbonhidratlarının sentezini tetikleyip tetiklemediği belirlenmeye çalışılmıştır.

Her bir maya türü için farklı metal streslerinde biriktirilen trehaloz miktarının birbirinden farklı olduğu bulunmuştur. Genel olarak incelendiğinde Fe(III) stresinin tüm mayalarda trehaloz birikimini tetiklediği belirlenmiştir. *Z. bailii* için tüm metallerin trehaloz birikimini tetiklediği, sırası ile etkilerinin Fe(III), Cd, Cu, Mg, Co şeklinde giderek azaldığı gözlenmiştir. *Z. rouxii* için Cd ve Fe streslerinin aynı oranlarda etkili olduğu görülmüştür. *P. stipitis* ve *Y. lipolitica* ve *M. fructicola* için ise metal streslerinin trehaloz üzerine etkisinin sınırlı olduğu saptanmıştır. Yapılan değerlendirme sonucu *C. rugosa* için özellikle Fe(III) stresinin trehaloz birikimini arttırdığını, *S. cerevisiae* için Fe(III) ve Cd streslerinin diğerlerine göre biraz daha etkili olduğunu; fakat *S. cerevisiae* (Δreg1) suşunun metal stresinden daha fazla etkilenecek trehaloz biriktirdiğini tespit edilmiştir.

Glikojen metabolizmasını incelediğimizde ise metal stresinin glikojen birikimini trehaloz birikiminden daha fazla uyardığı saptanmıştır. En yüksek glikojen birikimine *C. rugosa*'da ulaşılmış olup miktarı $12.9 \pm 0.2 \mu\text{g}$ glukoz / mg olarak belirlenmiştir. *Z. bailii*'de glikojen birikiminin trehaloz birikiminden daha düşük olduğu bulunmuştur. *M. fructicola* için ise diğer metal stresleri etkili olmazken Co stresinin glikojen birikimi için oldukça etkili olduğu belirlenmiştir. Kontrol suş olarak kullanılan *S. cerevisiae* ve özellikle yüksek glikojen ürettiği bilinen *S. cerevisiae* (Δreg1)'in glikojen birikiminin ise *Z. rouxii*, *C. albicans*, *P. stipitis*, *C. rugosa*, *Y. lipolitica*'dan oldukça düşük olduğu bulunmuştur.

Yüksek glikojen ve trehaloz üretimi nedeni ile tercih edilen *C. rugosa*'nın farklı stres koşulları altındaki trehaloz ve glikojen üretimi kontrol suş olarak *C. albicans* ve *S. cerevisiae* kullanılarak *TPS1* ve *GSY1* gen bölgeleri ile RT-PZR yöntemi ile analiz edilmiştir. *C. rugosa*'nın *TPS1* geninin gen anlatım oranına

maya suşuna alternatif karbon kaynağı olarak asetik asit verilerek RT-PZR yöntemi ile bakıldığında stressiz koşula göre asetik asit stresinde *TPSI* geninin mRNA düzeyinde 1.40 kat daha fazla ifade edildiği belirlenmiştir. Bunun yanı sıra *C. rugosa*'ya azot stresi uygulandığında, enzimatik yöntem ile her iki alternatif azot kaynağında (prolin, üre) yaklaşık aynı miktarlarda ve düşük trehaloz birikimi elde edilirken; moleküler analizlerde prolin bulunan ortamda *TPSI* geninin ifadesinin stressiz koşula göre 1.30 kat arttığı, üre bulunan ortamda ise stressiz koşula oranla 0.70 kat arttığı gözlenmiştir. *C. rugosa*'da oksidatif stres altında trehaloz üretimi RT-PZR analizi ve enzimatik analiz ile belirlendiği üzere yüksek bulunmuştur. RT-PZR ile *C. rugosa* *TPSI* geninin gen anlatım oranının uygulanan metal stresleri arasında Co stresinde en fazla ifade edildiği belirlenirken enzimatik analizde ise Fe(III) stresinde belirgin bir şekilde trehaloz birikimi gözlenmiştir.

C. albicans *TPSI* geninin farklı stres koşulları altında transkripsiyon düzeyine bakıldığında asetik asit stresinde biyokimyasal analiz ile önemli olmayan miktarda trehaloz birikimi belirlenirken RT-PZR ile stressiz koşula oranla 4.30 kat daha fazla transkripsiyon oranı saptanmıştır. Biyokimyasal analizde olduğu gibi mRNA düzeyinde de üre'nin azot kaynağı olarak bulunduğu ortamda prolinin bulunduğu ortama oranla daha fazla trehaloz ifadesi gözlenmiştir. Sıcaklık stresinde her iki yöntemde stressiz koşula oranla daha fazla trehaloz miktarı belirlenmiştir. Metal stresinde ise biyokimyasal yöntem ile Cd ve Fe(III) streslerinde yüksek trehaloz birikimi belirlenirken transkripsiyon düzeyinde Cu stresinde *TPSI* geninin diğer metal streslerinden daha fazla ifade edildiği tespit edilmiştir.

S. cerevisiae için ise farklı karbon kaynaklarında trehaloz birikiminin biyokimyasal deneyler sonucunda asetik asitte ve gliserolde yakın oranlarda olduğu belirlenirken *TPSI* geninin mRNA düzeyinde ifadesi incelendiğinde asetik asit stresinde gliserole oranla 1.50 kat fazla transkripsiyon belirlenmiştir. Farklı azot kaynaklarının kullanıldığı ortamda *S. cerevisiae*'nin trehaloz birikimi üre bulunan ortamda 0.003 ± 0.00 µg glukoz / mg iken prolin bulunan ortamda ise 1.22 ± 0.02 µg glukoz / mg olarak belirlenirken *TPSI* geninin transkripsiyon oranının ise üre bulunan ortamda prolin bulunan ortama oranla daha fazla olduğu

gözlenmiştir. Sıcaklık stresinde her iki yöntemde de artan *TPSI* mRNA seviyesi belirlenirken aynı şekilde oksidatif stres için her iki yöntemde de kontrole göre daha düşük *TPSI* mRNA seviyesi saptanmıştır. Fe(III) streslerinde diğer metal streslerine oranla daha fazla trehaloz birikimi elde edilirken aynı sonuca RT-PZR deneylerinde de ulaşılmıştır.

Enzimatik yöntem ile maya suşlarının trehaloz birikim oranı ve moleküler analiz ile *TPSI* geninin transkripsiyon oranı karşılaştırıldığında benzer sonuçlar elde edilmekle birlikte her üç maya suşu için enzimatik analiz ile asetik asit stresinde düşük trehaloz birikimi belirlenirken moleküler analizde *TPSI* geninin bu stres ortamında yüksek oranda ifade edildiği gözlenmiştir. Aynı şekilde enzimatik analiz ile karşılaştırıldığında maya suşları için metal streslerinde elde edilen yüksek sonuçlar *TPSI* geninin en yüksek ifade edildiği metal stresi açısından farklılık göstermektedir. Kimyasal yöntem ve moleküler teknik arasındaki bazı farklar kimyasal yöntemin reaksiyon etkinliğine bağlı olmasından kaynaklanabilmektedir. Enzim miktarındaki artış allosterik efektörler ve kovalent modifikasyonlarla enzimatik aktivitede değişime neden olabilmektedir (Ferreira ve ark., 1996; François ve Parrou., 2000). *S. cerevisiae*'da trehaloz sentaz kompleksinin altbirimlerini kodlayan 4 farklı gen bulunmaktadır. Bunlar *TPS1*, *TPS2*, *TPS3* ve *TSI1*'dir. Aynı zamanda trehaloz birikimi *ATH1* ve *NTH1* gibi degradasyondan sorumlu genlerin aktivitesine de bağlıdır. Winderickx ve ark. (1996) farklı trehaloz sentaz kompleksi genlerinin anlatım seviyelerinin besinlerin kullanılabilirliği, stres koşulları ve Ras-cAMP yolu ile kontrol edildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca trehaloz sentaz kompleksinin alt birimlerini kodlayan genlerin promotor dizileri çoklu kopya halinde STRE bağlanma sekansları (CCCCT) bulundurmaktadır. Farklı trehaloz sentaz enzimi alt birimlerini kodlayan genlerinin transkripsiyonal düzenlenmesi STRE ile ilişkilidir. STRE ise transkripsiyon faktörleri Msn2p/Msn4p'nin bağlanma sekansıdır. François ve Parrou. (2000)'in belirttiği gibi maya hücreleri yüksek etanol konsantrasyonuna maruz kaldığında artan trehaloz birikimi gözlenirken *TPSI* gen anlatımının etkilenmediği gözlenmiştir. Araştırmacılara göre depo karbonhidratlarının net birikimi yıkım yolundaki *NTH1* geninin delesyonu ile belirlenebilmektedir. Parrou ve ark (1997) ise stres koşullarının trehaloz ve

glikojen moleküllerinin birikimini değil daha çok döngüsünü uyardığını belirtmişlerdir, yani sentez enzimleri gibi yıkım enzimleride aktif hale gelmektedir. Konu ile ilgili daha önce yapılan çalışmalarda da belirtildiği gibi biyokimyasal analizlerde toplam trehaloz birikimi tayin edilmektedir. Sentez (*TPSI*) ve yıkım enzimlerinin (*NTH1*) aktivasyonlarının ardından net birikim belirlenmektedir. Li ve ark. (2009)'un belirtildiği gibi *TPSI* geninin delesyonu ile trehaloz sentezi düşmektedir; fakat trehalozun sentezi kompleksde yer alan diğer genlere ve yıkım enzimlerinin aktivitesine de bağlıdır.

Zaragoza ve ark. (2003) *C. albicans* ile yaptıkları çalışmada oksidatif stresin *TPSI* mRNA ekspirasyonunu azalttığını belirtmişlerdir. Winderickx ve ark. (1996)'da *S. cerevisiae* ile yaptıkları çalışmada da benzer sonuç elde edildiğini belirtmişlerdir ve bu etkinin enzimin post translasyonel modifikasyonundan kaynaklanabileceğini vurgulamışlardır. Araştırmacılar trehalozun çeşitli streslere karşı koruyucu rolünün trehaloz biyosentezinde yer alan enzimatik kompleksin transkripsiyonel ve muhtemelen post transkripsiyonel düzenlenmesine bağlı olduğunu vurgulamışlardır.

Bu çalışmada transkripsiyon ve biyokimyasal yöntemde elde edilen farklı sonuçlar enzim kompleksinde yer alan alt birimlerin farklı miktarda sentez, yıkım enzimleri, bu genlerin promotor bölgelerinde yer alan *STRE* elementleri ve *Msn2/4* kompleksinin farklı enzimleri ve *Tpsp/Nthp* proteinlerinin post translayonel modifikasyonel düzenlemeleri ile açıklanabilir.

GSY1 geninin anlatımı ve biyokimyasal yöntemle elde edilen glikojen sonuçlarına göre; *C. rugosa*'nın alternatif karbonhidrat kaynaklarında biriktirdiği glikojen miktarı asetik asitte 0.59 ± 0.05 µg glukoz / mg iken gliserolde ise 0.69 ± 0.14 µg glukoz / mg olarak belirlenmiş olup değerlerin birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. *GSY1* geninin anlatımına bakıldığında stressiz koşula oranla asetik asitte 3.99 kez artış belirlenirken gliserolde ise stressiz ortamdan daha az gen anlatımı belirlenmiş olup; yaklaşık 0.20 katıdır ve biyokimyasal analizin aksine asetik asitte transkripsiyon oranı gliserol bulunan ortamdakinden fazladır. *C. albicans*'ın asetik asit bulunan ortamda biriktirdiği glikojen miktarı 6.55 ± 0.08 µg glukoz / mg, gliserolde biriktirdiği

glikojen miktarı ise 0.39 ± 0.08 μg glukoz / mg olarak tesbit edilmiştir. RT-PZR analizlerinde ise asetik asit stresinde stressiz koşula göre 10.28 kat, gliserol stresinde ise 3.15 kat daha fazla gen anlatımı belirlenmiştir. Her iki analizde de asetik asit stresinde elde edilen sonuçların gliserol stresine oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır. *S. cerevisiae*'nın karbonhidrat stresinde biyokimyasal analiz ve moleküler analizdeki sonuçları yakın olup her iki alternatif karbon kaynağında glikojen birikimi ve *GSY1* geninin transkripsiyonunun düşük olduğu gözlenmiştir. Azot kaynakları açısından stres uygulanan maya suşlarından *C. rugosa*'da farklı azot kaynağı olarak üre kullanıldığında 11.78 ± 0.20 μg glukoz / mg glikojen birikimi belirlenirken prolin stresinde ise 1.82 ± 0.07 μg glukoz / mg glikojen birikimi belirlenmiştir. Aynı maya suşunun azot stresinde *GSY1* transkripsiyon düzeyi incelendiğinde üre stresinde stressiz koşullara göre 1.83 kat, prolin stresinde ise stressiz koşullara göre 0.67 kat daha fazla gen anlatımı saptanmıştır. Her iki analizde de üre stresinde daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir. *C. albicans* için üre stresinde 1.28 ± 0.04 μg glukoz / mg, prolin stresinde 0.37 ± 0.02 μg glukoz / mg glikojen birikimi belirlenirken aynı stres koşullarında moleküler analiz sonucu üre stresinde 2.20 kat, prolin stresinde ise 0.91 kat daha fazla transkripsiyon gerçekleşmiştir. Her iki çalışmada elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında ürenin glikojen birikimini tetiklediği ve bunu *GSY1* geninin transkripsiyonunu arttırarak gerçekleştirdiği söylenebilir. *S. cerevisiae*'da ise üre stresinde 0.95 ± 0.09 μg glukoz / mg glikojen birikirken prolin stresinde 2.09 ± 0.10 μg glukoz / mg glikojen biriktiği enzimatik yöntem ile belirlenmiştir. Moleküler analizde elde edilen sonuçlardan farklı olarak üre stresinde 2.82 kat, prolin stresinde ise 0.66 kat daha fazla transkripsiyon saptanmıştır. *C. rugosa*'nın 25 °C'deki glikojen birikimi 6.81 ± 0.09 μg glukoz / mg iken maya suşu sıcaklık stresine maruz kaldığında glikojen birikimi 10.82 ± 0.09 μg glukoz / mg'a yükseldiği enzimatik analiz ile belirlenmiştir. Aynı şekilde moleküler analizde de maya suşunun glikojen birikimi stressiz koşula oranla sıcaklık stresinde 4.17 kat arttığı gözlenmiştir. *C. albicans*'ın 25 °C'deki glikojen birikimi 2.60 ± 0.30 iken maya 39 °C'de sıcaklık stresine maruz bırakıldığında bu oranın çok az artarak 2.79 ± 0.05 μg glukoz / mg olduğu

biyokimyasal metodla belirlenirken aynı stres koşulunda *C. albicans*'ın *GSYI* transkripsiyon oranının stressiz koşula göre 1.45 kat arttığı belirlenmiştir. *S. cerevisiae*'da ise biyokimyasal analizle 25 °C'de 0.74 ± 0.02 µg glukoz / mg, 39 °C'de ise 0.80 ± 0.05 µg glukoz / mg glikojen birikimi elde edilirken moleküler analizde stressiz koşula oranla sıcaklık stresinde *GSYI* geninin transkripsiyon oranının düştüğü belirlenmiştir. Oksidatif stres sonuçlarına göre *C. rugosa*'nın biyokimyasal analizlerinde stressiz koşullarda 8.20 ± 0.20 µg glukoz / mg glikojen birikirken oksidatif stresde bu oranın biraz daha arttığı ve 10.43 ± 0.17 µg glukoz / mg olduğu tespit edilmiştir. Moleküler analizlerde ise *GSYI* geninin ekspirasyon oranının stressiz koşula oranla daha az olduğu gözlenmiştir. *C. albicans* için ise tam tersi durum söz konusu olup enzimatik analizlerde düşen glikojen birikimi belirlenirken; kontrolde 3.01 ± 0.06 µg glukoz / mg, oksidatif stresde 1.94 ± 0.20 µg glukoz / mg; moleküler analizlerde ise 5.43 kat artan transkripsiyon oranı belirlenmiştir. *S. cerevisiae*'nın moleküler analizlerinde 1.08 kat artış belirlenirken enzimatik analizlerde ise kontrol deneyleri ve stres deneyleri arasında fark gözlenmemiştir. Metal streslerinin glikojen birikimine ve *GSYI* geninin transkripsiyon oranına etkisine bakıldığında ise *C. rugosa* metal stresine maruz kaldığında biyokimyasal analizde en yüksek glikojen birikimi Fe(III) stresinde gerçekleşirken aynı şekilde moleküler analizde de en yüksek gen anlatımı Fe(III) stresinde 1.72 kat olarak saptanmıştır. *C. albicans*'ın kimyasal analizde ve moleküler analizde en fazla etkilendiği metal stresi Cd olarak saptanırken glikojen birikimi enzimatik yöntemle 5.84 ± 0.02 µg glukoz / mg olarak bulunmuş ve gen anlatımının 78.13 kat artmış olduğu ve moleküler analizlerde elde edilen en yüksek değer olduğu belirlenmiştir. *S. cerevisiae* için ise Fe(III) ve Cu streslerinde diğer metallere oranla daha fazla glikojen birikimi belirlenirken RT-PZR analizlerinde Mg'da 1.50 kat, Cu'da 1.30 kat artış gözlenmiştir.

Moleküler ve biyokimyasal analiz sonuçları yakın olmakla birlikte, özellikle oksidatif stres sonucunda moleküler analizi ile biyokimyasal analiz arasında diğer stres koşullarına göre biraz daha farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bunun nedeninin ise, Jamieson (1998)'in belirttiği gibi, oksidatif stresin H₂O₂

maruziyetinin glikojen ve trehaloz sentezinde yer alan genlerin anlatımını etkilemediğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Araştırmacı oksidatif strese eşik değerindeki trehalozun ve glikojenin yaşam için gerekli olduğunu belirtmiştir.

RT-PZR analizlerinde glikojen sentezinin artışını belirlemek amacı ile hedef aldığımız gen *GSY1* 'dir. *S. cerevisiae*'da glikojen sentezinden sorumlu 2 gen bulunmaktadır. Bunlar *GSY1* ve *GSY2*'dir. Yapılan çalışmalar glikojen sentezinde *GSY2* geninin *GSY1* kadar rol oynadığını belirtmiştir. Aynı zamanda glikojen yıkımı ise iki farklı gen bölgesi tarafından kontrol edilebilmektedir; bunlar glikojen fosforilaz *GPH1* ve glikojen debranching enzimlerini kodlayan *GDB1*'dir (François ve ark., 2012). Moleküler analizde enzimatik analizden farklı elde edilen sonuçların sebebinin sentez ve yıkım reaksiyonlarının totaline değilde metabolizmanın kontrolünün sadece tek gen üzerinden incelenmesi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Pseudohifsel gelişim ile trehaloz ve glikojen birikimi arasındaki ilişki incelendiğinde *Z. bailii* için 24, 48, ve 72. saatlerde SLAD besi ortamındaki pseudohifsel gelişim YPD besi ortamından yüksek olmasına rağmen her üç saatte YPD besi ortamında trehaloz ve glikojen birikimi SLAD besi ortamına göre daha yüksek olarak belirlenmiştir. *Z. rouxii* için ise SLAD besi ortamında pseudohifsel gelişimin her üç saatte yüksek, 24. ve 48. saatlerde glikojen birikiminin SLAD besi ortamında yüksek, 72. saatte ise trehaloz ve glikojen birikiminin YPD besi ortamında daha yüksek olduğu bulunmuştur. *C. albicans*'da SLAD ortamında pseudohifsel gelişimi YPD ortamından daha yüksek olup trehaloz ve glikojen birikiminin her iki besiyerinde yakın düzeyde olduğu gözlenmiştir. *P. stipitis*'de ise en fazla pseudohifsel gelişim 72. saatte SLAD besi ortamında belirlenirken 48 ve 72. saatlerde glikojen birikiminin trehaloz birikimine oranla oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. *C. rugosa*'nın 72. saatte SLAD besi ortamında pseudohif oluşumu diğer saatlere ve besi ortamına göre daha yüksek olup bu saatlerde SLAD besi ortamında glikojen birikiminin trehaloz birikimine göre oldukça yüksek olduğu saptanmıştır. *Y. lipolitica*'da YPD besi ortamında pseudohifsel gelişim gözlenmezken SLAD besi ortamında 24, 48 ve 72. saatlerde az da olsa

pseudohifsel gelişim gözlenmiş ve bu saatlerde SLAD besi ortamında trehaloz birikiminin glikojen birikimine oranla yüksek olduğu belirlenmiştir. *M. fructicola*'da ise her iki besi ortamında 24, 48 ve 72. saatlerde pseudohifsel gelişim gözlenmemiştir. *S. cerevisiae* için 72. saatte SLAD besi ortamında pseudohifsel farklılaşma belirlenirken; SLAD besi ortamında trehaloz ve glikojen birikimi YPD ortamından daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Kontrol suş olarak kullanılan *S. cerevisiae* $\Sigma 1278$ 'de ise pseudohifsel farklılaşma SLAD besi ortamında gözlenirken YPD besi ortamında gözlenmemiştir. Bu suşun trehaloz birikimi YPD besi ortamında daha yüksek iken glikojen birikiminin ise SLAD ortamında yüksek olduğu belirlenmiştir.

Pseudohifsel gelişimin cAMP bağımlı protein kinaz ve MAPK yolu ile düzenlendiğini daha önce belirtilmiştir (Palecek ve ark., 2002). Hücre içi cAMP seviyesi ve besinsel durum arasındaki ilişki araştırıldığında yüksek hücre içi cAMP seviyesine sahip olan hücrelerin besinsel açlık stresine karşı daha duyarlı olduğu ve düşük miktarda glikojen ve trehaloz biriktirdiği belirlenmiştir (Gagiano, 2002). Filamentli gelişim stres sonucu artan sinyal olaylarının artışından da etkilenmektedir. Azot ve karbon açlığı haploid ve diploidlerde pseudohifsel farklılaşmayı etkileyebilmektedir (Palecek ve ark., 2002). *S. cerevisiae*'da azot açlığında glikojen ve trehaloz metabolizmaları çalışmakta dolayısıyla bu karbonhidratların birikimi olmaktadır. cAMP sentezinin azalması ve buna bağlı olarak PKA'nın inaktifleşmesi ile glikojen ve trehaloz sentezlenmektedir. Bu nedenle pseudohifsel farklılaşma yolu çalışmamakta ve filament oluşumu gözlenmemektedir (Versele ve ark., 2001). Buna paralel olarak yapılan çalışmada *C. rugosa* ve *P. stipitis*'de yüksek glikojen birikimi belirlenirken diğer suşlar *Z. bailii*, *Z. rouxii* ve *C. albicans*'a oranla daha az pseudohif oluşturdukları belirlenmiştir.

Farklı maya suşlarında gözlenen farklı pseudohifsel gelişimi Madhani ve Fink. (1998)'in belirttiği gibi çevresel uyaranlara karşı filamentli gelişim bir organizmadan diğerine önemli derecede değişim göstermektedir. *S. cerevisiae*'da azot açlığı pseudohifsel farklılaşmayı uyarırken *C. albicans*'da serum

pseudohifsel gelişimi uyarmaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlarda YPD ortamında da pseudohifsel farklılaşmanın görölmesi Gancedo (2001)'de belirtilmiştir.

Sağlıklı kişilerin vajenlerinden alınan örneklerden izole edilen ve moleküler identifikasyonları yapılan örneklerin *C. glabrata* olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde Osmanağaoğlu ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada 78 izolattan 39'unu *C. albicans* olarak tanımlarken ikinci sıklıkta rastlanan *Candida* türünün *Candida glabrata* olduğunu belirlemişlerdir. Koçoğlu ve ark. (2005)'in yaptıkları benzer çalışmada da yine vajen örneklerinden elde edilen izolatların tanımlaması yapıldığında % 60 oranında *C. albicans* ikinci sıklıkla % 22.20 oranında *C. glabrata* identifiye edilmiştir. Daha önceleri patojen olmayan saprofit normal flora elamanı olarak bilinen *C. glabrata*'nın *C. albicans*'dan sonra ikinci veya üçüncü yaygın patojen olduğu belirlenmiştir (Fidel ve ark., 1999).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre farklı maya türlerinin farklı streslerde trehaloz ve glikojen metabolizmalarının birbirinden farklı olduğu belirlenmiş olup özellikle sıcaklık stresinin, oksidatif stresin ve bazı metal streslerinin depo karbonhidratlarının birikimini uyardığı belirlenmiştir. Çalışmada daha önce trehaloz ve glikojen metabolizmaları çalışılmamış olan suşlar ile çalışılmıştır. *C. rugosa*'nın, enzimatik yöntem ile belirlenen yüksek trehaloz ve glikojen birikimi nedeni ile trehaloz ve glikojen sentez genleri bilinmeyen ve bu genleri hizalama ile belirlenen bu maya suşunun kontrol maya suşları kullanılarak olası *TPS1* ve *GSY1* genlerinin stres koşulları altında transkripsiyon oranları belirlenmiştir. Aynı zamanda yapılan çalışma ile *TPS1* ve *GSY1* genlerinin tek başlarına trehaloz ve glikojen birikimleri hakkında net bilgi veremeyeceği gözlenmiştir.

Çalışmada aynı zamanda pseudohifsel farklılaşmanın azot eksikliği sinyalleri ile uyarıldığını SLAD besi ortamında yüksek pseudohifsel gelişim belirlendiğini ve bu ortamda *C. rugosa* ve *P. stipitis* gibi suşlarda yüksek oranda glikojen depolanabildiği belirlenmiştir. Aynı şekilde farklı maya suşlarının pseudohifsel gelişimleri ile trehaloz ve glikojen birikimi arasında farklılıklar olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmanın devamı olarak trehaloz ve glikojen metabolizması ile ilgili literatürde bilgi yetersizliğı olan *C. rugosa* 'nın degradasyonda görev yapan gen bölgeleri de kullanılarak trehaloz ve glikojen birikimlerinin ayrıntılı bir şekilde incelenebileceğı düşünölmektedir. Pseudohifsel farklılaşma ile trehaloz ve glikojen birikimi arasındaki ilişkinin moleküler analizler ile desteklenebileceğı ve pseudohifsel gelişmenin patojen suşlar *C. albicans* ve *C. rugosa* 'nın patojenitesi ile olan ilişkisinin araştırılabileceğı düşünölmektedir.

KAYNAKLAR

- Abacı, Ö. ve Haliki, A., (2004), *Candida albicans*'ın virulans faktörleri, Orlab on-Line Mikrobiyoloji Dergisi, **9**, 1-8.
- Agbogbo, F.K. ve Coward-Kelly, G., (2008), *Cellulose ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, Pichia stipitis*, Biotechnology Letters, **30**, 1515-1524
- Alcoba-Florez, J., Arevalo-Morales, M., Perez-Roth, E., Laich, F., Rivero-Perez, B. ve Mendez-Alvarez, S., (2007), *Yeast molecular identification and typing*, Applied Microbiology, 535-546.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. ve Lipman, D.J., (1997), *Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs*, Nucleic Acids Research, **25**, 3389-3402.
- Argüelles, J.C., (2000), *Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis*, Archives of Microbiology, **174**, 217-224.
- Argüelles, J.C., (1997), *Thermotolerance and trehalose accumulation induced by heat shock in yeast cells of Candida albicans*, FEMS Microbiology, **146**, 65-71.
- Ball, S.G., Tirtiaux, C. ve Wickner, R.B., (1984), *Genetic control of L-A and L-(BC) dsRNA copy number in killer systems of Saccharomyces cerevisiae*, Genetics, **107**, 199-217.
- Barth, G. ve Gaillardin, C., (1996), *Physiology and genetics of the dimorphic fungus Yarrowia lipolytica*, FEMS Microbiology Reviews, **19**, 219-237.
- Basu, A., Bhattacharyya, S., Chaudhuri, P., Sengupta, S. ve Ghosh, A.K., (2006), *Extracellular trehalose utilization by Saccharomyces cerevisiae*, Biochimica et Biophysica Acta, **1760**, 134-140.
- Becker, A., Schloeder, P., Steele, J.E. ve Wegener, G., (1996), *The regulation of trehalose metabolism in insects*, Experientia, **52**, 433-439.
- Beranger, F., Crozet, C., Goldsborough, A. ve Lehmann, S., (2008), *Trehalose impairs aggregation of PrPSc molecules and protects prion-infected cells*

- against oxidative damage, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **374**, 44-48.
- Blazquez, M.A., Lagunas, R., Gancedo, C., Gancedo, J.M., (1993), *Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases*, *FEBS Letters*, **329**, 51-54.
- Boone, C., Bussey, H. ve Andrews, B.J., (2007), *Exploring genetic interaction and networks with yeasts*, *Nature Reviews Genetics*, **8**, 437-449.
- Bustin, S.A., (2002), *Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems*, *Journal of Molecular Endocrinology*, **29**, 23-29.
- Cabib, E. ve Leloir, L.F., (1958), *The biosynthesis of trehalose phosphate. cell to environmental changes*, *Molecular Biology of the Cell*, **11**, 4241-4257.
- Castro, F.A.V., Mariani, D., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., Pereira, M.D., (2008), *Cytotoxicity mechanism of two naphthoquinones (menadione and plumbagin) in Saccharomyces cerevisiae*, *Plos One*, **3**, 1-6.
- Chen, D., Toone, W.M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N. ve Bahler, J., (2003), *Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress*, *Molecular Biology of the Cell*, **14**, 214-119.
- Cheng, L., Moghraby, J. ve Piper, P. W. (1999), *Weak organic acid treatment causes a trehalose accumulation in low-pH cultures of Saccharomyces cerevisiae, not displayed by the more preservative-resistant Zygosaccharomyces bailii*, *FEMS Microbiology Letter*, **170**, 89-95.
- Chi, Z., Liu, J. ve Zhang, W., (2001), *Trehalose accumulation from soluble starch by Saccharomycopsis fibuligera sdu*, *Enzyme and Microbial Technology*, **28**, 240-245.
- Dashnau, J. L., Conlin, L.K., Nelson, H.C.M. ve Vanderkooi, J.M., (2007), *Water structure in vitro and within Saccharomyces cerevisiae yeast cells under conditions of heat shock*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1780**, 41-50.
- Deak, T. ve Beuchat, L.R. (1996). *Evaluation of the MicroScan enzyme-based system for the identification of foodborne yeasts*. *Journal of Applied Bacteriology*, **79**, 439-46.

- Dib, J.C., Dube, M., Kelly, C., Rinaldi, G. ve Patterson, J. E., (1996), *Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a typing system for Candida rugosa: comparison of karyotype and restriction fragment length polymorphisms*, Journal of Clinical Microbiology, **34**, 494-496.
- Dixon, D.M ve Fromtling, R.A. (1995), *Morphology, Taxonomy and Classification of the Fungi*. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 6. ed. Washington DC: ASM press, 699-708.
- El-Bashiti, T., Hamamcı, H., Öktem, H. A. ve Yücel, M., (2005), *Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions*, Plant Science, **169**, 47-54.
- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I., Carroll D., (2003), *New insights on trehalose: A multifunctional molecule*, Glycobiology, **13**(4), 17R-27R.
- Ferreira, J. C., Paschoalin, V. M. F., Panek, A. D., Trugo, L. C., (1997), *Comparison of three different methods for trehalose determination in yeast extracts*, Food Chemistry, **60**, 251-254
- Fidel, P.L., Vazquez, J.A., Sobel, J. D., (1999), *Candida glabrata: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to C. albicans*, Clinical Microbiology Reviews, **12**, 80-96.
- Flores, C-L., Gancedo, C. ve Petit, T., (2011), *Disruption of Yarrowia lipolytica TPS1 gene encoding trehalose-6-P synthase does not affect growth in glucose but impairs growth at high temperature*, Plosone, **6**, 1-11.
- François, J., Blazquez, M.A., Arino J. ve Gancedo, C., (1997), *Storage carbohydrates in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Yeast sugar metabolism biochemistry, genetics, biotechnology and applications*. Chapter 16, 285-303, Technomic Publishing Company, Lancaster, Pennsylvania, A.B.D.
- François, J., ve Parrou J.L., (2000), *Reserve carbohydrates metabolism in the yeast Saccharomyces cerevisiae*, FEMS Microbiology Reviews, **25**, 125-145.

- François, J.M., Walther, T., Parrou, J.L., (2012), *Genetics and regulation of glycogen and trehalose metabolism in Saccharomyces cerevisiae*, Microbial Stress Tolerance for Biofuels, **22**, 30-48.
- 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 Research, **2**, 433-470.
- Gancedo, C., ve Flores, C.L., (2003), *The importance of functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi*, FEMS Yeast Research, **4**, 351-359.
- Gancedo, J.M., (2001), *Control of pseudohyphae formation in Saccharomyces cerevisiae*, FEMS Microbiology, **25**, 107-123.
- Garrels, J. I., (2002), *Yeast genomic databases and the challenge of the post-genomic era*, Functiona and Integrative Genomics, **2**, 212-237.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmen-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D. ve Brown, P.O., (2000), *Genomic expression programs in the response of yeast cell to environmental changes*, Molecular Biology of the Cell, **11**, 4241-4257.
- Gasch, A.P., Werner-Washburne, W., (2002), *The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation*, Functional and Integrative Genomics, **2**, 181-192.
- Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A. ve Fink, G.R., (1992), *Unipolar cell divisions in the yeast S. cerevisiae lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS*. Cell, **68**, 1077-1090.
- Goldstein, A. and Lampen, J.O., (1975). *Beta-D-fructofuranosidefructohydrolase from yeast*. Methods in Enzymology, **42**, 504- 511.
- Gonzalez-Parraga, P., Sanchez-Fresneda, R., Martinez-Esparza, M., Argüelles, J.C., (2008), *Stress responses in yeasts: what rules apply?*, Archives of Microbiology, **189**, 293-296.
- Gueho, E., Kurtzman, C. ve Peterson, S.W., (1990), *Phylogenetic relationships among species of Sterigrnatomyces and Fellomyces determined from partial ribosomal RNA sequences*, International Journal of Systematic Bacteriology, **40**, 60-65.

- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. ve Williams, P.M., (1996), *Real time quantitative PCR*, Genome Research, **6**, 986-994.
- İnci, M., Atalay, M.A., Koç, A.N., Özer, B., Kılınç, Ç. ve Durmaz, S., (2012), *Candida albicans dışı mayaların tanımlanmasında VITEK 2YST kart ile API 20C AUX sisteminin karşılaştırılması*, Dicle Tıp Dergisi, **39(1)**, 80-82.
- Jain, N.K. ve Roy, I., (2008), *Effect of trehalose on protein structure*, Protein Science, **18**, 24-36.
- Jamieson, D., (1998), *Oxidative stress responses of the yeast Saccharomyces cerevisiae*, Yeast, **14**, 1511-1527.
- Jorgensen, H., Olsson, L., Ronnow, B. ve Palmqvist, E.A., (2002), *Fed-batch cultivation of baker's yeast followed by nitrogen or carbon starvation: effects on fermentative capacity and content of trehalose and glycogen*, Applied Microbiology and Biotechnology, **59**, 310-317.
- Jules, M., Guillo, V., François, J., ve Parrou, J-L., (2004), *Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast Saccharomyces cerevisiae*, Applied and Environmental Microbiology, **70**, 2771–2778.
- Kanwal, S., Saharan, R.K., Mahmood, A. ve Sharma, S.C., (2011), *Effect of reserve carbohydrates on oxidative stress in yeast Saccharomyces cerevisiae Y6210*, Current Research Journal of Biological Science, **3**, 633-636.
- Klar, A.J., (2010), *The yeast mating-type switching mechanism: a memoir*, Genetics, **186**, 445-449.
- Koçoğlu, E., Bayram, A. ve Balcı, İ., (2005), *Klinik örneklerden izole edilen Candida türleri ve antifungal duyarlılıkları*, Van Tıp Dergisi, **12**, 195-200.
- Kopp, M., Müller, H. ve Holzer, H., (1993), *Molecular analysis of the neutral trehalase gene from Saccharomyces cerevisiae*, The Journal of Biological Chemistry, **268**, 4766-4774.
- Kurtzman, C.P. ve Droby, S., (2001), *Metschnikowia fructicolai a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots*, Systematic and Applied Microbiology, **24**, 395-399.

- Kurtzman, C.P., (1992), *rRNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships among yeasts*, International Journal of Systemetic Bacteriology, **42**, 1-6.
- Li, L., Ye, Y., Pan, L., Zhu, Y., Zheng, S. ve Lin, Y., (2009), *The induction of trehalose and glycerol in Saccharomyces cerevisiae in response to various stresses*, Biochemical and Biophysical Research Communication, 1-6.
- Lillie, S. ve Pringle, J.R., (1980), *Reserve carbohydrate metabolism in Saccharomyces cerevisiae: responses to nutrient limitation*, Journal of Bacteriology, **143**, 1384-1394.
- Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Tian, S., Hershkovitz, V., Tworkoski, T., (2011), *Effect of heat shock treatment on stress tolerance and biocontrol efficacy of Metschnikowia fructicola*, FEMS Microbiology Ecology, **76**, 145-155.
- Lo, W.S. ve Dranginis, A.M., (1998), *The cell surface flocculin Flo 11 is required for pseudohyphae formation and invasion by Saccharomyces cerevisiae*, Molecular Biology of the Cell, **9**, 161-171.
- Lorenz, M.C., Pan, X., Harashima, T., Cardenas, M.E, Xue, Y., Hirsch, J. P. ve Heitman J., (2000). *The G-protein-coupled receptor Gpr1 is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in Saccharomyces cerevisiae*, Genetics, **154**, 609- 622.
- Loor, G., Kondapalli, K., Schriewer, J.M., Chandel, N.S., Hoek, T.L.V., Schumacher, P.T., (2010), *Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanism involving PARP activation without requiring apoptosis*, Free Radical Biology Medicine, **49**, 1925-1936.
- Madhani, H. Ve Fink, G. R., (1998), *The control of filamentous differentiation and virulence in fungi*, Trends in Cell Biology, **8**, 348-353.
- Mahmud, S.A., Nagahisa, K., Hirasawa, T., Yoshikawa, K., Ashitani, K., Shimizu, H., (2009), *Effect of trehalose accumulation on response to osmotic stress in Saccharomyces cerevisiae*, Yeast, **26**, 17-30.
- Molero, G., Diez-Orejas, R., Navarro-Garcia, F., Monteoliva, L., Pla, J., Gil, C., Sanchez-Perez, M., Nombela, C., (1998), *Candida albicans: genetics, dimorphism and pathogenicity*, International Microbiology, **1**, 95-106.

- Mutlu, G., İmir, T., Cengiz, T.A., Ustaçelebi, Ş., Tümbay, E. ve Mete, Ö., (1999), *Mantarların yapıları, üreme özellikleri ve sınıflandırılması*, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, 1. baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, 1015-1021.
- Mutoh, N., Kawabata, M. ve Kitajima, S., (2005), *Effects of four oxidants, menadione, 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene, hydrogen peroxide and cumene hydroperoxide, on fission yeast Schizosaccharomyces pombe*, The Journal of Biological Chemistry, **138**, 797-804.
- Nery, D., Silva, C., Mariani, D., Frenandes, P., Pereira, M., Panek, A. D., Eleutherio, E., (2008), *The role of trehalose and its transporter in protection against reactive oxygen species*, Biochimica et Biophysica Acta, 1408-1411.
- Noubhani, A., Bunoust, O., Bonini, B.M., Thevelein, J.M., Devin, A., Rigoulet, M., (2009), *The trehalose pathway regulates mitochondrial respiratory chain content through hexokinase 2 and cAMP in Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Biological Chemistry, 1-14.
- Nwaka, S., Mechler, B., Destruelle, M., Holzer, H., (1995), *Phenotypic features of trehalase mutants in Saccharomyces cerevisiae*, FEBS Letters, **360**, 286-290.
- Okur, M. T., (2007), *Ayçiçeği kabuğu hemiselülozik hidrolizatına adapte edilmiş Pichia stipitis mayası ile alkol üretimine zahir giderme ön işlemlerinin etkisi*, Gazi Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Dergisi, **22**, 385-391.
- Osmanağaoğlu, Ö., Altınlar, N., Saçılık, S. C., Akın, A., (1999), *Identification of different species isolated in various hospitals in Ankara by fungichrom test kit and their differentiation by SDS-PAGE*, Turkish journal of Medical Sciences, **30**, 355-358.
- Otero, J.M., Vongsangnak, W., Asadollahi, M.A., Olivares-Hernandes, R., Maury, J., Farinelli, L., Barlocher, L., Osteras, M., Schalk, M., Clark, A. ve Neilsen, J., (2010), *Whole genome sequencing of Saccharomyces cerevisiae: from genotype to phenotype for improved metabolic engineering applications*, BMC Genomics, **11**, 3-17.

- Paalman, J.W.G., Verwaal, R., Slofstra, S.H., Verkleij, A.J., Boonstra, J. ve Verrys, C.T., (2002), *Trehalose and glycogen accumulation is related to the duration of the G1 phase of Saccharomyces cerevisiae*, FEMS Yeast, **1519**, 1-8.
- Palecek, S.P., Parikh, A.S., Kron, S.J., (2002), *Sensing, signalling and integrating physical processes during Saccharomyces cerevisiae invasive and filamentous growth*, Microbiology, **148**, 893-907.
- Pan, X., Harashima, T. ve Heitman, J., (2000), *Signal transduction cascades regulating pseudohyphal differentiation of Saccharomyces cerevisiae*, Current Opinion in Microbiology, **3**, 567-572.
- Parrou, J.L., Teste, M.A. ve François, J., (1997), *Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in Saccharomyces cerevisiae: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose*, Microbiology, **143**, 1891-1900.
- Parrou, J.L., Enjalbert, B., Plourde, L., Bauche, A., (1999), *Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in Saccharomyces cerevisiae*, Yeast, **15**, 191-203.
- Pereira, C.S., Lins, R.D., Chandrasekhar, I., Freitas, L.C. ve Hünenberger, P., (2004), *Interaction of the disaccharide trehalose with a phospholipid bilayer: a molecular dynamics study*, Biophysical Journal, **86**, 2273-2285.
- Pitt, J.I. ve Hocking, A.D., (1997) *Fungi and Food Spoilage*. Cambridge: University Press.
- Plourde-Owobi, L., Durner, S., Goma, G. ve François, J., (2000), *Trehalose reserve in Saccharomyces cerevisiae: Phenomenon of transport, accumulation and role in cell viability*, International Journal of Food Microbiology, **55**, 33-40
- Riberio, M.J.S., Leao, L.S.C., Morais, P.B, Rosa, C.A. ve Panek, A.D., (1999), *Trehalose accumulation by tropical yeast strains submitted to stress conditions*, Antonie van Leeuwenhoek, **75**, 245- 251.
- Richards, A.B., Krakowka, S., Dexter, L.B., Schmid, H., Wolterbeek, A.P.M., Waalkens Berendsen, D.H., Shigoyuki, A. ve Kurimoto, M., (2002), *Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and*

- results of multiple safety studies*, Food and Chemical Toxicology, **40** (7), 871-898.
- Richard, G., Kerrest, A. ve Dujon, B., (2008), *Comparative genomics and molecular Dynamics of DNA repeats in eukaryotes*, Microbiology and Molecular Biology Reviews, **72**, 686-727.
- Rodrigues, F., Ludovico, P., Sousa, M.J., Steensma, H.Y., Corte-Real, M. ve Leao, C., (2003), *The spoilage yeast Zygosaccharomyces bailii forms mitotic spores: a screening method for haploidization*, Applied and Environmental Microbiology, **69**, 649-653.
- Rose, M.D., Winston, F., Hieter, P., (1990), *Methods in yeast genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 34-43.
- Rua, J., Cima, S., Valle, P., Gutierrez-Larrainzar, M., Busto, F. ve Arriaga, D., (2008), *Glycogen and trehalose mobilization by acetic acid in Phycomyces blakesleeanus: dependence on the anion form*, Research in Microbiology, **159**, 200-206.
- Samson, R. A., Hoekstrs, E. S. ve Frisvad, J. C., (2004), *Introduction to food and airborne fungi*, Seven Edition, CBS, The Netherlands.
- Sanz, P., (2007), *Yeast as a modelsystem to study glucose-mediated signalling and response*, Frontiers in Bioscience, **12**, 2358-2371.
- Schiraldi, C., Lerna, I.D., Rosa, M.D., (2002), *Trehalose production: exploiting novel approaches*, Trends in Biotechnology, **20**, 430-425.
- Sherman, F., (1991), *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, Academic Press, NY.
- Sillje, H.H., Paalman, J.W.G., Schure, E.G., Olsthoorn, Q.B., Verkleij, A.J., Boonstra, J. ve Verrips, C.T., (1999), *Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Bacteriology, **181**, 396-400.
- Singer, M. A. ve Linquist, S., (1998), *Thermotolerance in Saccharomyces cerevisiae: the Yin and Yang of trehalose*, TIBTECH, **16**, 460-467.
- Spingola, M., Grate, L., Haussler, D., ve Ares, M., (1999), *Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in Saccharomyces cerevisiae*, RNA Society, **5**, 221-234.

- Sunnaborg, S.W., Miller, S.P., Unnikrishnan, I. ve Laporte, D.C., (2001), *Expression of the yeast glycogen phosphorylase gene is regulated by stress-response elements and by the HOG MAP kinase pathway*, Yeast, **18**, 1505-1514.
- Şenses, Ş. ve Özbaş, Z.Y., (2004), *Yüksek şeker içerikli gıdalarda kserotolerant mayaların önemi*, GIDA, **29** (1), 79-87.
- Thevelein, J. ve Hohman, S., (1995), *Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast*, TIBS, **20**, 3-10.
- Todorova, T.T., Petrova, V.Y., Vuilleumier, S., Kujumdzieva, A.V., (2009), *Response to different oxidants of Saccharomyces cerevisiae ure2Δ mutant*, Archives of Microbiology, **191**, 837-845.
- Tokouka, K., Ishinati, T., Goto, S. ve Komagata, K., (1985). *Identification of yeasts isolated from high-sugar foods*, Journal of General and Applied Microbiology, **31**, 411-427.
- Torija, M.J., Novo, M., Lemassu, A., Wilson, W., Roach, P.J., François, J. ve Parrou, J.L., (2005), *Glycogen synthesis in the absence of glycogenin in the yeast Saccharomyces cerevisiae*, FEBS Letters, **579**, 3999-4004.
- Türkel, S., (2005), *Comparative analysis of glycogen and trehalose accumulation in methylotrophic and nonmethylotrophic yeasts*, Microbiology, **75**, 639-643.
- Uyar, E.O., Hamamcı, H. ve Türkel, S., (2010), *Effect of different stresses on trehalose levels in Rhizopus oryzae*, Journal of Basic Microbiology, **50**, 368-372.
- Uzun, M., Erturan, Z., Anđ, Ö., (2000), *Mycobacterium tuberculosis kompleksi suşlarının erken tanısında kord oluşumunun değeri*, Klimik Dergisi, **13**, 27-29.
- Vakhlu, J., (2006), *Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning*, Electronic Journal of Biotechnology, **9**, 69-85.
- Versele, M., Lemaire, K. ve Thevelein, J.M., (2001), *Sex and sugar in yeast: two distinct GPCR systems*. EMBO Reports, **21**, 574-579.
- Voit, E.O., (2003), *Biochemical and genomic regulation of the trehalose cycle in yeast: Review of observations and canonical model analysis*, **223**, 55-78.

- Walker, G.M., (1998), *Yeast physiology and biotechnology*, Wiley, New York, A.B.D., 1998.
- Warren, N.G. ve Hazen, K.C., (1995), *Candida, Cryptococcus and other yeast of medical importance*. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 6. ed. Washington Dc: ASM Pres, 1995, 723-737.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., (1990), *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, PCR protocols, A guide to Methods and applications*, Academic Press USA.
- Wiggers, H. A. L.,(1832), *Untersuchung uber das mutterkorn, Secale cornutum*, Justus Liebigs Annalen. Chemistry. **1**, 129–182.
- Wilson, W.A., Wang, Z. ve Roach, P.J., (2002), *Systematic identification of genes affecting glycogen storage in the yeast Saccharomyces cerevisiae*, Molecular-Cellular Proteomics, 232-242.
- Winderickx, J., Winde, J.H., Crauwels, M., Hino, A., Hohman, S., Dijck, P., Thevelein, J.M., (1996), *Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in Saccharomyces cerevisiae: novel variations of STRE- mediated transcription control*, Molecular and General Genetics MGG, **252**, 470-482.
- Witt, S.N. ve Flower, T.R., (2006), *α -Synuclein, oxidative stress and apoptosis from the perspective of a yeast model of Parkinson's disease*, FEMS Yeast Research, **6**, 1107-1116.
- Wodicka, L., Dong, H., Mittmann, M., Ho, M.H. ve Lockhart, D.J., (1997), *Genome-wide expression monitoring in Saccharomyces cerevisiae*, Nature Biotechnology, **15**, 1359-1367.
- Yalçın, S., Ergül, Ş.Ş., Özbaş, Z.Y., (2010), *Moleküler esaslı yöntemlerin gıda kaynaklı mayaların tanımlanmalarında kullanılmaları*, **35**, 379-386.
- Yıldız, M., Terzi, H., Cenkci, S., Terzi, S.A., Uruşak, B., (2010), *Bitkilerde tuzluluğa toleransın fizyolojik ve biyokimyasal markörleri*, Anadolu University Journal of Science Technology-C, **1**, 1-33.
- Yiğit, N. ve Benli, M., (2005), *Maya hücre duvar yapısının dinamikleri*, Orlab-On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, **3**, 11-17.

- Zahringer, H., Burgert, M., Holzer, H. ve Nwaka, S., (1997), *Neutral trehalase Nth1p of Saccharomyces cerevisiae encoded by the NTH1 gene is a multiple stress responsive protein*, FEBS Letters, **412**, 615-620.
- Zaragoza, O., Gonzalez-Parraga, P., Pedreno, Y., Alvarez-Peral, F.J., Argüelles, J-C., (2003), *Trehalose accumulation induced during the oxidative stress response is independent of TPS1 mRNA levels in Candida albicans*, International Microbiology, **6**, 121-125.

EK1.S. *cerevisiae*'ya ait *TPS1* ve *GSY1* gen bölgeleri, erişim numaraları, primer setleri

GENİN İSMİ: *TPS1* mRNA for alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase

NCBI Erişim Numarası: X68214.1

İleri primer dizisi: 5' -aggctaacaactaggtactcaca -3'

Geri primer dizisi: 5' -tcttctcaacccttccaac -3'

RT-PZR ile çoğaltılacak gen bölgesi büyüklüğü: 174

```
1   ttcttgaaca agcacgcagc taagtaagca acaaagcagg ctaacaaact aggtactcac
61  atacagactt attaagacat agacctatga ctacggataa cgctaaggcg caactgacct
121 cgtcttcagg gggtaacatt attgtggtgt ccaacaggct tcccgtagaca atcactaaaa
181 acagcagtagc gggacagtagc gtagtagcaa tgctggtccg agggctgggtc acggcggttg
241 aaggggttgaa gaagacgtac actttcaagt gggtcggatg gcctgggcta gagattcctg
301 acgatgagat ggatcagggtg aggaaggact tgctggaaaa gtttaatgcc gtacccatct
361 tcctgagcga tgaaatcgca gacttactct acaactgggt cagtaattct attctatggc
421 cgttattcca ttaccatcct ggtgagatca atttcgacga gaatgcgtgg ttggcataca
481 acgaggcaaa ccagacgttc accaacgaga ttgctaagac tatgaaccat aacgatttaa
541 tctgggtgca tgattaccat ttgatgttgg ttccggaaat gttgagagtc aagattcacg
601 agaagcaact gcaaaacgtt aaggctcgggt gggttcctgca cacaccattc ccttcgagtg
661 aaatttacag aatcttacct gtcagacaag agattttgaa ggggtgtttg agttgtgatt
721 tagtcgggtt ccactcatat gattatgcaa gacatttctt gtcttccgtg caaagagtgc
781 ttaacgtgaa cacattgcct aatggggtgg aataccaggg cagattcgtt aacgtagggg
841 ccttccttat cggtagtagc gtggacaagt tcaccgatgg gttgaaaaag gaatccgtac
901 aaaagagaat ccaacaattg aaggaaactt tcaagggtcg caagatctta gttggtgtcg
961 acaggctgga ttacatcaaa ggtgtgcctc agaagttgca cgccatggaa gtgtttctga
1021 acgagcatcc agaatggagg ggcaagggtg ttctggtaca ggttgtagtg ccaagtcgtg
1081 gagatgtgga agagtaccaa tatttaagat ctgtggtcaa tgagttgggtc ggtagaatca
1141 acggtcagtt cggtagtagt gaattcgtcc ccatccattt catgcacaag tctataccat
1201 ttgaagagct gatttcgtta tatgctgtga gcgatgtttg tttggtctcg tccaccctg
1261 atggtatgaa cttggtttcc tacgaatata ttgcttgcca agaagaaaag aaaggttcct
1321 taatcctgag tgagttcaca ggtgccgcac aatccttgaa tgggtgctatt attgtaaate
1381 cttggaacac cgatgatctt tctgatgcca tcaacgaggc cttgactttg cccgatgtaa
1441 agaaagaagt taactgggaa aaactttaca aatacatctc taaatacact tctgccttct
1501 ggggtgaaaa tttcgtccat gaattataca gtacatcatc aagctcaaca agctcctctg
1561 ccacaaaaaa ctgatgaacc cgatgcaaat gagacgatcg tctattcctg gtccggtttt
1621 ctctgccctc tcttctattc acttttttta tactttatat aaaattatat aaatgacata
1681 actgaaacgc cacacgtcct ctctaaaaa aaaaaaaaa
```

GENİN İSMİ: *Saccharomyces cerevisiae* S288c Gsy1p (*GSY1*) mRNA

NCBI Erişim Numarası: NM_001179980.1

İleri primer dizisi: 5' -acgaaacaacgatgccata -3'

Geri primer dizisi: 5' -tctacacaatggcagggcta -3'

RT-PZR ile çoğaltılacak gen bölgesi büyüklüğü: 97

```
1   atggctcgtg acttacaaaa tcatctactg ttcgaagtag caacagaagt aactaacagg
61  gttggtggta tttactctgt cttgaagtcc aaggctccag tcaactgtggc acaatacggg
121 gacaactata cgctgcttgg acctttgaac aaggcgactt atgaaagtga ggttgaaaaa
181 cttgactggg aagatgaaag tatctttcct gaagagctgt taccgatcca aaaaactttg
241 atgtccatgc gggaaaaggg tgtgaacttt gtctacggta actggttgat tgaggagga
301 ccacgtgtca ttttatttga gctggattct gtaagacact ttttgaacga atggaaggct
361 gacctatggt ctctcgtcgg aattccatca ccagagcatg atcacgaaac aaacgatgcc
421 atattgttgg gttatgttgt tgtgtggttt ttgggagaag tttcaaaact ggacagtagc
481 catgccatca ttggccattt ccatgaatgg ctagctgggt tagccctgcc attgtgtaga
541 aagaaaagaa ttgatgttgt aacgattttc accacgcacg caactttatt gggtagatac
601 ttgtgtgccg ctggtgatgt agatttttat aacaatctac agtattttga tgtggaccaa
661 gaagctggta agagaggcat atatcatagg tactgcattg agcgcgctgc ggctcatact
721 gccgatgttt ttacgactgt gtcgcaaadc actgcattag aagcggagca tttgttgaag
781 aggaaaccgg atggcatttt gcccaatggt ttgaacgttg ttaagtttca agcagtacat
841 gaattttcaa atctgcatgc cctgaaaaag gacaaaatta atgatttcgt cagaggccat
901 ttccatgggt gttttgattt cgatctagac aacacagttt atttctttat cgctggtaga
961 tatgaataca aaaacaaagg tgctgacatg ttcatgaaat cattggctcg tctcaattac
1021 agattgaagg tttctggatc caagaagacg gtggtagcgt ttttgatcat gcctgccaaa
1081 accaattcct tcaactgtga ggcactgaaa agccaagcca ttgtaaaatc tttggaaaat
1141 actgttaatg aggtcaccgc atccattggg aagagaattt tcgagcatac gatgagatac
1201 cctcataatg gcctagaatc agagttgccc actaatttag atgagctgtt gaagagttct
1261 gaaaagggtt tgctgaagaa aagggtattg gcgctgagaa gaccttacgg ggaattgcct
1321 ccggtagtca cacataacat gtgcgatgat gctaacgatc caattttaaa ccaaataga
1381 catgttagat tattcaatga ttcgagtgat cgtgtaaaag tgattttcca tctgaattc
1441 ttaaacgcca ataaccctat ccttggtttg gattatgacg agtttgttcg cggctgtcac
1501 ttgggtgttt ttccatccta ttacgaacca tgggggtaca cgccagcaga atgtaccgtc
1561 atgggtgtcc catctatcac aacaaacgtt tctgggttcg gtgcctacat ggaagacttg
1621 attgaaacag accaagcgaa agactatggt atttatattg tagaccgtcg tttcaagagc
1681 cctgatgaat ctgtcgagca attagcagac tacatggaag agtttgtaaa caagaccaga
1741 agacaaagaa tcaaccaaag aaacagaacc gaaagactat cagacttggt agattggaag
1801 agaatgggtt tggaatacgt taaggctaga cagttgggtc ttcgtagggc ctatccagag
1861 cagttcaagc aactgggtgg tgaaacaatt agtgacgcca atatgaatac tcttgccggt
1921 ggcaagaaat tcaagattgc caggcctttg agtgtaccg gatcccccac agtaagggtc
1981 aatagtactg tttacatgac tccgggcgat ttaggtaccc ttcaagatgc taataatgca
```

2041 gatgactatt ttaatttgag cacgaatgga gccatcgaca atgacgatga tgacaacgat
2101 acgtctgcat actacgagga taattaa

EK2.*Candida albicans*, *Candida rugosa*’ ya ait *TPS1* ve *GSY1* gen bölgelerinin *Candida albicans*, *Candida dubliensis*, *Candida tropicalis* ‘ e ait *TPS1* ve *GSY1* gen bölgeleri hizalanarak belirlenmesi, erişim numaraları, primer setleri

GENİN İSMİ: *Candida albicans* SC5314 hypothetical protein (*TPS1*) mRNA

NCBI Erişim Numarası: XM_706614.1

İleri primer dizisi: 5’ -tgccacttttcattatca -3’

Geri primer dizisi: 5’-cattaaatgrtaatcatgaaccca -3’

RT-PZR ile çoğaltılacak gen bölgesi büyüklüğü: 106

```
1   atggttcaag gaaaagtctt ggtagtttca aatagaatac ctgttacaat caaaagattg
61  gataatgggt catcacgatta ttccatgtcc tccggtggac tcgttacagc attacaaggt
121 ttgaaaaaaa caaccgagtt tcaatgggat ggatggcctg gattggaaat tccagaagat
181 gagcaaaacta aagtaaatga cgaattgaaa tccaaattca attgtacagc catattttta
241 agtgatacga ttgctgattt acattataat gggttttcaa atagtatttt atggccactt
301 ttccattatc atcctgggga aatgaacttt gacgaaaatg catgggcagc atatatattgaa
361 gccaaataaga aatttgcatt ggaaatagtc aaacaagtca atgatgatga tatgatttgg
421 gttcatgatt atcatttaat gcttttgcca gaaatgttaa gacaagaaat tggtaacaag
481 aagaaaaaca ttaaatttgg attcttcttg cacacaccat tcccatcatc agaaatttat
541 cgtattttgc ccgttcgtaa agaaattctt gaagggtgtg tgagttgtga tttaattgga
601 ttccatacct atgattacgc ccgtcatttc atcagttcgg tttcaagaat tgtgccaac
661 gtcagtactt tacctaattg tataaagtac cagggacggt cgatcagcat cggggccttc
721 cccattggga ttgatgttga taactttatt gacggtttga aaaaagatag tgttgtggaa
781 cgtattaaac aattgaaatc taaattcaaa gacgttaagg ttattgttgg tgttgataga
841 ttagactata tcaaagggtg tccgcaaaaa ttacatgcat ttgaagtctt tttgaatgaa
901 aatcccgaat ggattggcaa agtagttttg gtccaagttg ctgttccatc cagagggtgat
961 gttgaagaat atcaaagttt aagaagtaca gtgagtgaat tggttggaag gatcaatggt
1021 gaatttggtg ctgttgaatt tgtccctata cttacttgc acaaattcat cccctttgat
1081 gaattgatca gtttatacaa tatcagtgat gtttgtttgg ttagttctac tcgagatggt
1141 atgaatttgg ttagttacga gtatattgct tgtcaacaag atcgcaaggg tgtcttgatc
1201 ttatctgaat ttgctggtgc agcacaatca cttaatggtg ccttgattgt taacccatgg
1261 aacactgaag atttaagtga agcaatcaaa gaaagtttaa cattaccaga agaaaagagg
1321 gaattttaatt tcaagaaatt gttcacctac atttcgaaat acacttcagg attttggggg
1381 gaaagttttg ttaaagaatt gtacaaatgt aaccacaaaa agagtttgag ggactag
```

GENİN İSMİ: *Candida tropicalis* MYA-3404 alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase, (*TPSI*) mRNA

NCBI Erişim Numarası: XM_002545822.1

İleri primer dizisi: 5' -tgccactttccattatca -3'

Geri primer dizisi: 5' -cattaaatgrtaatcatgaacca -3'

RT-PZR ile çoğaltılacak gen bölgesi büyüklüğü: 106

```
1   atgggtccaag gaaaagtttt agttgtctct aacagattac cagtaacaat taagagatct
61  gaagatgggtt catatgatta ttcaatgtct tctgggtggt tagttaccgc gttacaaggt
121 ttgaagaaaa ccactgaatt tcaatggat gggtggccag gtttgaaat tcctgatgat
181 gaacaaaaaa gagttaataa tgatttaaaa acaaaattca attgtactgc tatatattta
241 actgatacaa ttgctgattt acattataat gggttttcaa atagtatttt atggccactt
300 ttccattatc atcctgggtga aatgaatttt gatgaaaatg cttgggctgc ttatatcgaa
361 gcaataaaga aatttgctgt tgaaattgct aaacaagttg atgatgatga tatgatttgg
421 gttcatgatt atcatttaaat gttattacca gaaatggtga gacaagaaat tggtaatcgt
481 aaaaaaaata taaaattgg atttttctta catactcctt tcccatcatc tgaaatttat
541 agaattttac ctgttcgtaa agaaattttg gaagggtgtt taagttgtga ttttaattgga
601 ttccatactt atgattatgc ccgtcatttt attagtctg tttcaagaat tggttcctaat
661 gttagtacat taccaaatgg tatcaaatat caaggaagat caattagtag tgggtgcattc
721 ccaattggta tagatgttga taatttcatt gaaggattac aaaaagatag tggtgttgaa
781 cgtattaaac aattgaaatc caaatttaaa gacgttaaag ttattgttgg tgtcgataga
841 ttggattata tcaaagggtg tccacaaaaa ttgcatgctt ttgaagtttt cttgaatgaa
901 aatcctgaat ggattggtaa agttgtttta gttcaagttg ctgttccatc tagagggtgat
961 gttgaagaat atcaaagttt aagaagtacg gtcaatgaat tagttggtag aattaatggt
1021 caatttggta ctgttgaatt tgttccaatc cattattttac ataaatctat tccttttgat
1081 gaattaatta gtttatacaa tgttagttag gtttgtttgg ttagttccac tagagatggt
1141 atgaatttag tcagttatga atatatgtca tgtcaacaag atcgtaaagg tgttttgatc
1201 ttgtcagaat ttgctgggtc tgcccaatca ttaaattggtg cattaattgt taatccttgg
1261 aatactgaag atctaagtga tgctattaaa gaaagttaa ctttacctca agaaaagaga
1321 gaatttaatt tccaaaaact attcaattat atttccaagt acatttcagg attctgggga
1381 gaaagttttg ttaaagaatt atacaaatgt aatcctcaaa agaacttaag aagctaa
```

GENİN İSMİ: *Candida dubliniensis CD36 UDP-glucose-glucosephosphate glucosyltransferase, putative (TPS1) mRNA*

NCBI Erişim Numarası: XM_002422060.1

İleri primer dizisi: 5' -tgccactttccattatca -3'

Geri primer dizisi: 5' -cattaaatgrtaatcatgaacca -3'

RT-PZR ile çoğaltılacak gen bölgesi büyüklüğü: 106

```
1   atggttcaag gaaaagtctt ggtggtttca aatagaatac ctgttacaat caaaagattg
61  gacaatggtt cctatgatta ctcaatgtcc tctggtggac ttgttacggc attgcaaggt
121 ttgaaaaaga caaccgagtt ccaatggtat ggatggcccg gattggaaat tcctgatgac
181 gaacaagcca aagtaaacga agaattgaaa tccaaattta attgtacagc catattttta
241 agtgacacaa ttgctgattt gcattataat gggttctcta atagcatctt atggccactt
301 ttccattatc atcctgggga aatgaatttt gatgaaaatg cctgggcagc atacattgaa
361 gccacaaga aatttgcggt ggaaatagtc aagcaagtca atgatgatga catgatttgg
421 gttcatgatt accatttaat gcttttgccg gaaatgttga gacaagaaat cggtaacaag
481 aagaaaaaca tcaaaattgg attcttcttg catacgccat tcccatcatc ggagatttat
541 cgtattttgc ccgtccgtaa agaaattctc gaaggggtgt tgagttgtga tttgattgga
601 ttccacactt atgattatgc ccgtcatttt atcagttctg tttcaagaat tgtgccaaat
661 gtcagcacat tacctaattg tataaagtac cagggacggt cgatcagcat tggggctttc
721 cccattggga ttgatgttga taactttatt gacggtttga aaaaagacag tgttgtggaa
781 cgtattaaac aattgaaatc taaattcaaa gacgttaaag ttattgttgg tgttgataga
841 ttagactata tcaaagggtg tcctcagaaa ttacatgcat ttgaagtgtt tttgaatgag
901 aatccggaat ggattgggaa agtcgttttg gtccaagttg ctgttccatc tagagggtgat
961 gttgaagagt atcaaagttt aagaagtact gtgagtgaat tggttggaag gatcaatggt
1021 gaatttggtg ctgttgaatt cgtgccata cattacttgc acaaatccat cccctttgat
1081 gaattgatca gtttgtacaa tgtaagtgat gtttgttttg ttagttctac tagagatggt
1141 atgaatttgg ttagttatga atacattgct tgtcaacaag atcgcaaggg ggtcttgatc
1201 ttatccgaat ttgctggtgc agcacagtca cttaacggtg ccttgattgt taacccatgg
1261 aacactgaag atttaagtga agcaatcaaa gagagtttga cattaccaga agagaaaagg
1321 gaattcaatt tcaaaaagtt gttcacctat atttcgaagt atacttcggg attttggggg
1381 gaaagttttg ttaaagaatt gtacaaatgt aaccacaaa agagtttgag ggactaa
```

GENİN İSMİ: *Candida albicans SC5314 hypothetical protein (GSY1) mRNA,*

NCBI Erişim Numarası: XM_712875.1

İleri primer dizisi: 5'-cttggggttacackccwgc -3'

Geri primer dizisi: 5'-ttgrttgattctttgtcttctgg -3'

RT-PZR ile çoğaltılacak gen bölgesi büyüklüğü: 179

```
1   atggctagag atattgataa tcatttatta tttgaggttg ctactgaggt agctcataaa
61  gttggaggta tttactccgt tttaaaatca aaagccccag tcactgtagc tgaatatcgt
121 gaacgttaca ctttattggg tccattacat tatgactcag cacaaattga agttgaagaa
181 ttgccagtta ccgaccctca tatcaaacaa acccttgatt ctatgtcttc caaagggtatt
241 agatggcttt atggtagatg gttgattgaa ggtgcaccaa gagtattatt gtttgacatt
301 tggctctgccg gccattatgt gaatgaatgg aaagctgatt tgtggaatgt tgctgggtatc
361 cctacccttg atcatgacct ggaaaccaat gatgctatgt tgttgggtta tttggttgct
421 tggtttttgg gtgaattggg ttataacgac cgtgatcgtg ctgttatttg tcaatgtcat
481 gaatggttag cagggtattgc cttgccatta tgtagaaaaa gaagaattga cgttaccact
541 attttacta cccatgaac attattggga agatacttgt gtgctggtag taccgatttc
601 tacaacaatt tggacaagtt tgatgttgat gctgaagctg gtaaaagagg tatttatcac
661 cgttactgta tcgaaagatc tgctacgcat tcagctgatg tgttcactac agtttctgat
721 attactgcct atgaagccga acatttggtg aaaagaaaac cagatgggtg tttacctaat
781 gggttgaatg ttgtcaagtt ccaagcagtt catgaattcc aaaatttgca tgctatcaaa
841 aaggccaaga tcaatgaatt tgtcaaagga catttctatg ggaactatga ttttgattta
901 gacaatacct tatatttctt catcgccggg agatacgagt ttagaaataa aggggtgtgat
961 ttctttattg aatcgttagc aagattgaat cataaattga aagaggcagg ttccaaaacc
1021 acagttgtgg ctttcattat tatgccggga aaaactcaat cctacactgt tgagactttg
1081 aaaggtcagg ctgttggtta acaattagaa tcaactattg gtgaagtga aaagaaagtt
1141 ggtgaaagat tatttgagta ttgtgctaga taccctaata ctgatcatca cggaaacgat
1201 gaagttccaa ctattgatga gttgattaaa ccagccgata gagttttgtt gaaaagacgt
1261 atatttgcac tgaagagaga tggtttgcca ccaattgtca ctcacaacat ggttgatgac
1321 agtactgatc cagtcttgaa tcatattaga agagttcaat tatttaacaa accagaagat
1381 agagttaaga ttattttcca tccagagttc ttgaatgcta acaaccctat tttgtcatta
1441 gattatgatg aatttggttag aggggtgtcat ttgggtgtgt tccatccta ctacgaacct
1501 tgggggttaca ctccctgccga gtgtaccggt atgggtatac cttctattac caccaatttg
1561 tctggatttg ggtgttacat gaatgatttg gttgaaaacc caactgatta cgggtatttat
1621 attgttgaca gaagaatgaa atctgtcgat gagtctatca atcaattgac tgattacatg
1681 tttgatttct gtgcgaaatc cagaagacaa agaatacaacc aaagaaatag aactgaaaga
1741 ttgagtgttc ttttggattg gagatcagtt cattccgaat attctaaggc tcgtttgttg
1801 gcacttaaaa gagcttatcc tgattatggt ggtgagaagg tagttgaatc caagatgaaa
1861 atcactcgac caatgtcagt tccaggttct ccaagaagtt tgttactcac gccagggtgat
1921 cttggctcat tacaagacgc taaccaagac attagttatt ttgaattggg tgaagaagaa
1981 acttaa
```

GENİN İSMİ: *Candida dubliniensis CD36 glycogen [starch] synthase, putative (CD36_25850) mRNA (GSY1)*

NCBI Erişim Numarası: XM_002421637.1

İleri primer dizisi: 5'-cttggggttacackccwgc -3'

Geri primer dizisi: 5'-ttgrttgattctttgtcttctgg -3'

RT-PZR ile çoğaltılacak gen bölgesi büyüklüğü: 179

```
1   atggctagag atattgataa tcatttatta tttgaagttg ccactgaagt agctcataaa
61  gttggaggta tttactccgt tttgaaatca aaagcccctg tcaactgtagc tgaatatcgt
121 gaacgttaca ctttgttggg tcccttacac tatgactcag cacaaattga agttgaagaa
181 ttgccagtta ccgaccctca tattaaacia acccttgatt ctatgtcttc taaaggtatt
241 agatggcttt atggtagatg gttaattgaa ggtgcgcaa gagtggtatt atttgatatt
301 tggtcagctg gtcattatct gaatgaatgg aaagccgatt tatggaatgt tgcagggtatt
361 cctacccttg accatgacct ggaaaccaat gatgctatct tggttgggata tttggttgct
421 tggtttttag gtgagttggt ttacaatgac cgtgatcgtg ctggtatttg tcaatgtcat
481 gaatggttag cagggtattgc gttgccatta tgtagaaaaga gaagaattga tgttaccacc
541 attttcacca cccatgcaac attattggga agatatttgt gtgctggtag taccgatttc
601 tacaacaatt tagacaagtt tgatgttgat gctgaagctg gtaaaagggg tatttatcac
661 cgttactgta ttgaaaggtc tgctacacat tcggctgatg tcttcaccac cgtttccgat
721 attactgcct atgaggcaga gcatttggtg aaaagaaaac cagacggggg tttgcccaat
781 gggttgaatg tcgtgaaatt ccaagcgggt cactgattcc aaaatttgca tgccattaaa
841 aaggccaaga ttaacgaatt tgtcaaagga catttctatg gtaactacga ttttgattta
901 gataatactt tatatttctt cattgctggt agatatgagt ttagaaataa ggggtgtgat
961 ttctttattg aatccttggc tagattgaat cataagttga aagaggcagg ttccaaaacc
1021 acagttgttg ctttcattat tatgccagga aaaactcaat cttacaccgt tgagactttg
1081 aaaggccaag ctggtgttaa acaattggag tcaaccattg gagaagtaca aaagaaagtt
1141 ggtgaaagat tatttgaata ttgtgctaga tatcctaata ctgaccatca aggaaacgat
1201 gaagtgccaa ctattgatga gttgattaaa ccagctgaca gagttttggt gaaaagacgt
1261 atatttgcac tgaagagaga cggtttgcca ccaatcgtca cccacaacat ggttgacgac
1321 agtactgatc cagtcttgaa ccatatcaga agagtccagt tatttaacia accagaggat
1381 agagtaaaga ttattttcca tccagaattc ttgaatgcta acaaccctat tttatcatta
1441 gattacgatg aatttgttag aggggtgcat ttgggtgtgt tcccgtccta ctatgaacct
1501 tgggggttaca ctccagctga gtgtactgtc atgggtatac cttctatcac caccaattta
1561 tctggatttg ggtgctacat gaatgatttg gttgaaaacc caaccgatta tgggtatttac
1621 attgttgaca gaagaatgaa gtctgtcgat gaatctatca atcaattgac tgattacatg
1681 tttgatttct gtgcgaaatc cagaagacaa agaatacaacc aaagaaatag aactgagaga
1741 ttgagtgttc ttttgattg gagatcagtt cattcggaat attccaaggc tcgtttgttg
1801 gcacttaaaa gagcttatcc tgattatggt ggtgagaaaag tagtcgagtc aaagatgaaa
1861 atcactagac caatgtcagt tcccggttct ccaagaagtt tgttactcac gccagggtgat
```

1921 cttggctcat tgcaagacgc taatcaagac attagttatt ttgaattagg cgaagaagaa
1981 tcctaa

EK3.S. *cerevisiae*' ye ait ACT1 gen bölgesi, erişim numarası, primer seti

GENİN İSMİ: *Saccharomyces cerevisiae* S288c Act1p (*ACT1*) mRNA NCBI

Erişim Numarası: NM_001179927.1

İleri primer dizisi: 5'-tgacgacgctcctcgtgctgtctt -3'

Geri primer dizisi: 5'-caattcggttagaaggtatgatgcc -3'

RT-PZR ile çoğaltılacak gen bölgesi büyüklüğü: 164

```
1   atggattctg aggttgctgc tttggttatt gataacggtt ctggtatgtg taaagccggt
61   tttgccggtg acgacgctcc tcgtgctgtc ttcccatcta tcgtcggtag accaagacac
121  caaggtatca tggtcggtat gggtaaaaa gactcctacg ttggtgatga agctcaatcc
181  aagagaggta tcttgacttt acgttaccca attgaacacg gtattgtcac caactgggac
241  gatatggaaa agatctggca tcataccttc tacaacgaat tgagagttgc cccagaagaa
301  caccctgttc ttttgactga agctccaatg aaccctaaat caaacagaga aaagatgact
361  caaattatgt ttgaaacttt caacgttcca gccttctacg tttccatcca agccgttttg
421  tccttgactt cttccggtag aactactggt attgttttgg attccggtga tgggtgttact
481  cacgtcgttc caatttacgc tggtttctct ctacctcacg ccattttgag aatcgatttg
541  gccggtagag atttgactga ctacttgatg aagatcttga gtgaacgtgg ttactctttc
601  tccaccactg ctgaaagaga aattgtccgt gacatcaagg aaaaactatg ttacgtcgcc
661  ttggacttcg aacaagaaat gcaaaccgct gctcaatctt cttcaattga aaaatcctac
721  gaacttccag atgggtcaagt catcactatt ggtaacgaaa gattcagagc cccagaagct
781  ttgttccatc cttctgtttt gggtttgtaa tctgccggtg ttgaccaaac tacttacaac
841  tccatcatga agtgtgatgt cgatgtccgt aaggaattat acggtaacat cgttatgtcc
901  ggtggtacca ccatgttccc aggtattgcc gaaagaatgc aaaaggaaat caccgctttg
961  gctccatctt ccatgaaggt caagatcatt gtcctccag aaagaaagta ctccgtctgg
1021 attggtgggt ctatcttggc ttctttgact accttccaac aaatgtggat ctcaaaacaa
1081 gaatacgacg aaagtgggtc atctatcggt caccacaagt gtttctaa
```

EK4.*Candida rugosa* ve *Candida albicans*' ait *ACT1* gen bölgesine ait primerlerin *C. albicans*, *C. dubliensis*, *C. tropicalis* kullanılarak belirlenmesi, ACT1 gen bölgeleri, erişim numaraları, primer dizileri

GENİN İSMİ: *Candida albicans* SC5314 hypothetical protein (ACT1) mRNA

NCBI Erişim Numarası: XM_717232.1

İleri primer dizisi: 5'-atgtgtaaagccggttttgccg -3'

Geri primer dizisi: 5'-ccatategtcccagttggaaac -3'

RT-PZR ile çoğaltılacak gen bölgesi büyüklüğü: 158

```
1 atgtgtaaag ccggttttgc cgtgacgac gctccaagag ctgttttccc atctcttgtt
61 ggtagaccaa gacatcaagg tatcatgggtt ggtatgggtc aaaaagattc ttatgttgg
121 gatgaagccc aatccaaaag aggtattttg accttgagat acccaattga acacggtatt
181 gtttccaact gggacgatat ggaaaaaatc tggcatcaca ctttttaca tgaattgaga
241 gttgctccag aagaacatcc agttttgttg accgaagctc caatgaatcc aaaatccaac
301 agagaaaaga tgactcaaat tatgtttgaa acttttaatg ttccagcttt ctacgtttcc
361 attcaagctg ttttgtcttt gtactcttct ggtagaacca ccggtattgt tttggattct
421 ggtgatggtg ttactcacgt tgttccaatt tacgctgggt tctctttacc acatggtatt
481 ttaagaattg atttggctgg tagagacttg accaaccatt tgtccaagat tttgtctgaa
541 cgtgggttaca gtttcactac tagtgctgaa agagaaattg tcagagacat taaagaaaga
601 ttgtgttacg ttgctttgga tttcgaacaa gaaatgcaaa cttcttctca atcttctgcc
661 attgaaaaat cttatgaatt accagatggt caagttatca ctattggtaa cgaaagattc
721 agagctccag aagctttgtt cagaccagct gatttaggtt tggaagctgc tggattgac
781 caaaccactt tcaactccat catgaagtgt gacatggatg ttagaaaaga attatacggt
841 aacattgtta tgtctgggtg tactaccatg ttcccaggta ttgctgaacg tatgcaaaag
901 gaaattactg ctttggctcc atcttctatg aaagttaaga ttattgctcc accagaaaga
961 aaatactctg tctggattgg tggttctatc ttggcttcat tgtctacttt ccaacaaatg
1021 tggatttcaa aacaagaata cgacgaatct ggtccatcca ttgttcacca caaatgtttc
```

1081 taa

GENİN İSMİ: *Candida dubliniensis* CD36 actin (ACT1) mRNA

NCBI Erişim Numarası: XM_002417863.1

İleri primer dizisi: 5'-atgtgtaaagccggtttgccg-3'

Geri primer dizisi: 5'-ccatategtcccagttggaac-3'

RT-PZR ile çoğaltılacak gen bölgesi büyüklüğü: 158

```
1   atggacggtg aagaagttgc tgctttagtt atcgataacg gttctggtat gtgtaaagcc
61   ggttttgccg gtgatgacgc tccaagagct gtgttcccat ctctcggttg tagaccaaga
121  catcaaggta tcatggtttg tatgggtcaa aaagattctt acgtcgggta cgaagcccaa
181  tccaaaagag gtattttgac cttgagatac ccaattgaac acggtattgt ttccaactgg
241  gacgatattg aaaaaatctg gcatcacact ttctacaacg aattgagagt tgctccagaa
301  gaacatccag ttttgttgac cgaagctcca atgaatccaa aatctaacag agaaaagatg
361  actcaaatac tgtttgaaac attcaatggt ccagctttct acgtttccat tcaagctggt
421  ttgtctttgt actcttctgg tagaaccacc ggtattgttt tggattctgg tgatgggtgt
481  actcacgttg ttccaattta cgctgggttc tccttaccac atgggtatttt gagaattgat
54   ttggctggta gagacttgac caaccacttg tccaagattt tgtctgaacg tggttacagt
601  ttcactacta gtgctgaaag agaaattgtc agagacatta aagaaagatt atgttacgtt
661  gctttggatt tcgaacaaga aatgcaaact tcttctcaat cttctgctat tgaaaaatct
721  tatgaattgc cagatgggtc agttatcact attggtaacg aaagattcag agctccagaa
781  gctttgttca gaccagctga tttgggtttg gaagctgctg gtattgacca aaccactttc
841  aactccatca tgaagtgtga catggatggt agaaaggaat tatacggtaa cattgttatg
901  tctggtggta ctaccatggt cccaggtatt gctgaacgta tgcaaaagga aattactgct
961  ttgggtccat cttctatgaa agttaagatt attgctcctc cagaaagaaa atactctgtc
1021 tggattgggt gttctatctt ggcttcattg tctactttcc aacaaatgtg gatttcaaaa
1081 caagaatacg acgaatctgg tccatctatt gttcatcaca aatgtttcta aa
```