

***S. cerevisiae*'da Asetil- KoA MİKTARININ ARTTIRILMASINA YÖNELİK  
GEN MODİFİKASYONLARININ GERÇEKLEŞTİRİLMESİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**İpek KISACIK ALKOTB**

**Eskişehir 2022**

***S. cerevisiae*'da ASETİL- KoA MİKTARININ ARTTIRILMASINA  
YÖNELİK GEN MODİFİKASYONLARININ GERÇEKLEŞTİRİLMESİ**

**İPEK KISACIK ALKOTB**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Hülya KARACA**

**Eskişehir**

**Anadolu Üniversitesi**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Haziran 2022**

**ÖZET**

***S. cerevisiae*'da ASETİL- KoA MİKTARININ ARTTIRILMASINA YÖNELİK  
GEN MODİFİKASYONLARININ GERÇEKLEŞTİRİLMESİ**

İpek Kısacık Alkotb

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasotik Mikrobiyoloji

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2022

Danışman: Doç. Dr. Hülya Karaca

Terpenoidler birçok organizma tarafından üretilen sekonder metabolit grubundaki bileşiklerdir.

Sekonder metabolitler mikroorganizmalarda klasik mikrobiyolojik yöntemler ile üretilmediği gibi metabolizma mühendisliği yöntemleri ile de son yıllarda ticari boyutlarda üretilmektedir. Yapılan bu çalışmada arka plan hücresi olarak *S. cerevisiae* kullanılarak birçok terpenoidin üretim yolağı olan asetil-KoA yolağının ana bileşeni olan asetil-KoA'nın miktarının metabolizma mühendisliği yöntemleri ile artırılması hedeflenmiştir. *S. cerevisiae*'den köken alan ve daha önce metabolizma mühendisliği çalışmaları ile sekualen üretiminde kullanılan SCIGS22a suşu arka plan suşu olarak kullanılmış ve bu suş üzerinde genetik modifikasyonlar yapılmıştır.

Yolak üzerinde, terpenoidlerin üretimi neticesinde oluşabilecek toksisiteyi önlemek üzere *ypl062w* uzak bölge geninin arka plan hücresinde silinmesi gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte asetil-KoA oluşumunu azaltan ve yolağın asetil-KoA'dan önceki ürünü asetaldehiti paylaşan etanol üretim sürecinin geri yönde aktivitesi artırılarak asetil-KoA oluşumuna yeni bir destek sağlanmıştır. Yapılan modifikasyonlar sonucu asetil-KoA artırımına yönelik yeni suşlar meydana getirilmiş oluşturulan suşların genetiklerindeki değişiklik doğrulanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *S. cerevisiae*, Metabolizma mühendisliği, asetil-KoA, *ypl062w*.

## ABSTRACT

### MAKING GENETIC MODIFICATIONS AIMED TO INCREASE ACETYL- CoA AMOUNTS IN *S. Cerevisiae*

İpek Kısacık Alkotb

Department of Pharmaceutical Microbiology

Anadolu University, Institute of Health Sciences, June 2022

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hülya KARACA

Terpenoids are compounds in the group of secondary metabolites produced by many organisms.

Secondary metabolites can be produced in microorganisms by classical microbiological methods, as well as by metabolic engineering methods in recent years, they can be produced in commercial sizes. In this study, it was aimed to increase the amount of acetyl-CoA, which is the main component of the acetyl-CoA pathway, which is the production pathway of many terpenoids, by using *S. cerevisiae* as the background cell, by metabolic engineering methods. SCIGS22a strain originating from *S. cerevisiae* and used in the production of squalene by metabolism engineering studies was used as a background strain and genetic modifications were made on this strain.

On the pathway, deletion of the *yp1062w* distant region gene in the background cell was performed to prevent toxicity that may occur as a result of the production of terpenoids. In addition, a new support was provided to the formation of acetyl-CoA by increasing the backward activity of the ethanol production process, which reduces the formation of acetyl-CoA and shares acetaldehyde, the previous product of the pathway before acetyl-CoA. Cells formed during the modification and with those modification new strains for increasing acetyl-CoA amount made. Genetics of new strains are confirmed after all studies were done.

**Keywords:** *S. cerevisiae*, Metabolism engineering, acetyl-CoA, *yp1062w*.

## ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

İpek Kısacık Alkotb

.../.../20....

## **STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES**

I hereby truthfully declare that this thesis is an original work prepared by me; that I have behaved in accordance with the scientific ethical principles and rules throughout the stages of preparation, data collection, analysis and presentation of my work; that I have cited the sources of all the data and information that could be obtained within the scope of this study, and included these sources in the references section; and that this study has been scanned for plagiarism with “scientific plagiarism detection program” used by Anadolu University, and that “it does not have any plagiarism” whatsoever. I also declare that, if a case contrary to my declaration is detected in my work at any time, I hereby express my consent to all the ethical and legal consequences that are involved.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

BAŞLIK SAYFASI.....	i
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	iv
STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES .....	v
TABLolar DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
Simgeler ve kısaltmalar dizini.....	xii
1. GİRİŞ .....	1
1.1 Sentetik Biyoloji.....	2
1.2. Metabolizma Mühendisliği .....	2
1.2.1. Metabolizma mühendisliğinin diğer yöntemlere göre avantajları	4
1.3. Asetil-KoA.....	4
1.4. <i>ADH</i> , <i>yplw062</i> , <i>IDH</i> ve <i>ACL</i> Genleri ve Daha Önce Yapılmış Olan Çalışmalarda Asetil- KoA Miktarının Arttırılması İçin Gerçekleştirilen Modifikasyonlar.....	6
1.4.1. <i>ADH</i> .....	6
1.4.2. <i>ypl062w</i> .....	6
1.4.3. <i>IDH</i> ve <i>ACL</i> genleri .....	7
2. YÖNTEM.....	9
2.1. Çalışmada Kullanılan Suşlar.....	9
2.2. Hücrelerin Büyüme Şartları ve Besiyerleri.....	9
2.3. Plazmit Vektörlerin Hazırlanması.....	10

2.3.1. <i>E. coli</i> kompetent hücre yapımı ve vektörlerin transformasyon ve saflaştırma aşamaları .....	10
2.4. DNA Kasetinin Oluşturulması .....	10
2.4.1. <i>ypl062w</i> geninin silinmesi için oluşturulan DNA kasedi.....	12
2.4.2. <i>IDH1</i> geninin silinmesi için oluşturulan DNA kasedi.....	14
2.4.3. <i>ACL1</i> ve <i>ACL2</i> genlerinin üretilmesi için oluşturulan DNA kasedi .....	15
2.5. Jel Elektrofrez ve DNA'nın Hazırlanışı .....	17
2.6. Transformasyon.....	17
2.7. Koloni PCR ve Dizileme.....	18
3. BULGULAR.....	19
3.1. Elde Edilen DNA Parçalarının Agaroz Jelde Görüntülenmesi.....	19
3.1.1. <i>ypl062w</i> genin silinmesi ile ilgili jel görüntüleri .....	19
3.1.2. <i>IDH1</i> genin silinmesi ile ilgili jel görüntüleri .....	20
3.1.3. <i>ACL</i> genlerinin hücre içine aktarılması için oluşturulan DNA kasedindeki DNA parçalarının jel görüntüleri.....	21
3.2. Elde Edilen DNA Parçalarının Birleştirilme Reaksiyonları Ardından Agaroz Jelde Görüntülenmesi.....	21
3.2.1. <i>ypl062w</i> genin silinmesi için yapılan birleştirme reaksiyonu sonucunun jelde görüntülenmesi.....	21
3.2.2. <i>IDH1</i> genin silinmesi yapılan birleştirme reaksiyonu sonucunun elde jelde görüntülenmesi.....	22
3.2.3. <i>ACL</i> genlerinin hücreye tanıtılması için yapılan birleştirme reaksiyonu sonucunun jelde görüntülenmesi.....	23
3.3. Transformasyon Sonrası Koloni PZR sonuçları .....	23
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	25
4.1. Sonuç.....	25
4.2. Tartışma .....	25



**Kaynakça ..... 27**

**ÖZGEÇMİŞ**

## TABLULAR DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Tablo 2.1.</b> Çalışmada kullanılan maya suşları.....	9
<b>Tablo 2.2.</b> Genel PCR döngüsü şartları.....	11
<b>Tablo 2.3.</b> Füzyon reaksiyonu birinci aşama reaksiyonu için PCR şartları.....	11
<b>Tablo 2.4.</b> İkinci füzyon için PCR döngüsü şartları.....	12
<b>Tablo 2.5.</b> <i>ypl062w</i> geninin silinmesi için oluşturulan DNA kasetinde yer alan gen ve DNA parçaları.....	13
<b>Tablo 2.6.</b> <i>IDH1</i> geninin silinmesi için oluşturulan DNA kasetinde yer alan gen ve DNA parçaları.....	15
<b>Tablo 2.7.</b> <i>ACL</i> genlerinin hücre içinde ifade edilmesi için oluşturulan DNA kasetinde yer alan gen ve DNA parçaları.....	16
<b>Tablo 2.8.</b> Genel PCR döngüsü şartları.....	18

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Şekil 1.1.</b> Asetil-KoA yolağı, hücre içerisinde nerelerde bulunduğu, oluşumundaki Akış yönü ve oluşmasında etkili genler .....	5
<b>Şekil 1.2.</b> <i>ypl062w</i> geninin silinmesi ile çeşitli terpenoid ürünlerinin miktarında meydana gelen artış şekilde gösterilmiştir.....	7
<b>Şekil 1.3.</b> Mitokondri içerisinde ki TCA döngüsü ,bu döngüde sitrat oluşumu , sitratın sitoplazmik Asetil KoA 'ya dönüşümü ve sitoplazmik Asetil-KoA yolağı.....	8
<b>Şekil 2.1.</b> <i>ypl062w</i> geni silmek üzere oluşturulmuş olan DNA kasetinin tasarımı...	12
<b>Şekil 2.2.</b> <i>IDH1</i> genini silmek üzere oluşturulmuş olan DNA kasetinin tasarımı ...	14
<b>Şekil 2.3.</b> <i>ACL</i> genlerinin hücre içinde ifade edilmesi için oluşturulmuş olan DNA kasetinin tasarımı.....	15
<b>Şekil 3.1.</b> Şekil 4.1. DNA parçalarını büyüklüklerinin karşılaştırıldığı thermo fisher SM0314 katalog numaralı marker.....	19
<b>Şekil 3.2</b> B: Gene up ve Gene down DNA parçaları,C: <i>URA</i> gen bölgesi, agaroz jelde gösterilmesi .....	20
<b>Şekil 3.3.</b> Up ve Down parçalarının agaroz jeldeki görüntüsü.....	20
<b>Şekil 3.4.</b> <i>URA</i> parçasının agaroz jeldeki görüntüsü.....	21
<b>Şekil 3.5.</b> Ölçü olarak kullanılmış olan marker, X3- UP, <i>ACL1</i> , Promotor, <i>ACL2</i> ve X3-DOWN bölgeleri.....	21
<b>Şekil 3.6.</b> D: Gene up ve <i>URA</i> bölgeleri birleştirme reaksiyonu sonucu E: Gene up, <i>URA</i> ve gene down parçalarının birleştirme reaksiyonu sonucu .....	22
<b>Şekil 3.7.</b> <i>IDH1</i> genini silmek üzere oluşturulan DNA kasedi birleştirme reaksiyonu sonucu.....	22

<b>Şekil 3.8.</b> <i>ACL</i> genlerini hücre içine atmak için oluşturulan DNA kasedi	
birleştirme reaksiyonu sonucu.....	23
<b>Şekil 3.9.</b> <i>ypl062w</i> genini silmek adına yapılan transformasyon sonrasındaki koloni	
PZR işlemi ardından agaroz jel fotoğrafında istenilen DNA parçası.	24
<b>Şekil 3.10.</b> <i>IDH1</i> genini silmek adına yapılan transformasyon sonrasındaki koloni	
PZR işlemi ardından agaroz jel fotoğrafında istenilen DNA parçası	24
<b>Şekil 3.11.</b> <i>ACL</i> genleri için yapılan transformasyon sonrasındaki koloni PZR	
işlemi ardından agaroz jel fotoğrafında istenilen DNA parçası.....	24

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<i>ACL</i>	: ATP Sitrat Liyaz
ACS	: Asetil KoA sentaz
ALD	: Asetaldehid dehidrojenaz
DMAPP	: Dimetilalyl Pyrophosphate
DNA	: Deoksiribonükleik asit
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
FPP	: Farnesil Difosfat
GGPPS	: Geranil geranil difosfat sentaz
IPP	: İsoentenyl Pyrophosphate
Mep Yolağı	: The methylerythritol 4-phosphate
<i>M. mycosides</i>	: <i>Mycoplasma mycosides</i>
MVA	: Mevalonat- yolağı
PDH	: Pürivat Dehidrojenaz
RNA	: Ribonükleik asit
<i>S. cerevisiae</i>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TCA döngüsü	: Trikarboksilik Asit Döngüsü
<i>ypl062w</i>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> genomik DNA'sında uzak bir gen bölgesi

## 1. GİRİŞ

Değerli kimyasallar ve bir çok ilacın üretimi bitki kaynaklı olmaktadır. Bitkiler bu kimyasalları sadece kendileri için gerekli olacak küçük bir miktarda sentezlerler. Bu nedenle bitkilerden üretilen kimyasalları elde etmek çok zor ve pahalı bir yöntemdir. Dolayısı ile bu değerli kimyasalları üretmek için farklı metotların kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır [1]. Bu metotlarda istenilen kimyasalın alternatif olarak üretimi için kullanılan konakçı, kararlı, kolay değiştirilebilen aynı zamanda ucuz ve kolay yoldan elde edilebilen özelliklerde olmaktadır [2].

Değerli ürünlerin üretimi için genetik mühendisliği ve metabolizma mühendisliği uygulamaları kullanılmaktadır. Bu uygulamalarda arka plan hücresi olarak bitkiler, mikroorganizmalar kullanılabilir. Kullanılan mikroorganizmalardan biri *Saccharomyces cerevisiae*'dir. *S.cerevisiae* ökaryotik bir mikroorganizmadır ve genellikle güvenli kabul edilen (GRAS) mikroorganizma olarak bilinmektedir. Bu özelliği ile ekmek mayası olarak da kullanılmaktadır [3]. Fermantasyonda güçlü olması ve genetik olarak kontrol edilebilir olması açısından tercih edilmektedir [4]. Ayrıca *S. cerevisiae* yetiştirilmesi kolay bir mikroorganizmadır ve ucuz materyaller ve kolay bulunan besi yerleri ile kültüre edilebilmektedir [3].

İsoprenoidler, terpenoid olarak adlandırılan değerli kimyasallardandır ve sekonder metabolitler grubundadır. Yaşayan organizmaların tamamına yakınında sentezlenebilirler. Yapıları ve fonksiyonel özellikleri son derece farklıdır [5]. Bir karotenoid çeşidi olan likopen; 11 çift bağa sahip birçok besinde renk içeriği olarak kullanılan polienik bir kromofor ve kırmızı bir karotenoid çeşididir ve aynı zamanda bir terpenoiddir [3,6]. Terpenoidler gibi pek çok sekonder molekülün ve endüstriyel anlamda önemli pek çok kimyasal bileşiğin öncü maddesi ise asetil- KoA 'dır. Asetil- KoA mayalarda, mitokondri, sitoplazma, peroksizom ve çekirdekte bulunmaktadır [7]. Asetil- KoA, enerji metabolizması, lipid metabolizması ve amino asit metabolizması gibi temel hücrel fonksiyonlar için istenen, merkezi karbon metabolizması için anahtar moleküldür [8]. Sekonder metabolit yolağı sitozolde bulunmaktadır, zar geçirgenliği farklılığından dolayı diğer organellerde bulunan asetil- KoA sitozole geçememekte ve bu yüzden sitozoldeki asetil- KoA öncül olarak kullanılmaktadır [9].

Verimli ürün elde edebilmek adına sitozoldeki asetil- KoA miktarının artırılması zorunlu bir durumdur ve bunun için çok farklı stratejiler geliştirilmiştir [7].

Yapılan bu çalışma ile, *S. cerevisiae* SCIG22a suşu arka plan suşu olarak kullanılarak sitoplazmadaki asetil-KoA miktarının artırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla asetil-KoA yolağına uzak bir gen bölgesi olan *ypl062w* geni silinerek asetat toksisitesi azaltılmış sitoplazmadaki miktarı ise paralel olarak artırılmıştır. Asetat, asetil-KoA yolağının öncülerinden olduğu için bu yolla asetil- KoA miktarında artışı sağlamak ve aşağı akış yönünde üretilen ticari ürünlerin üretimini desteklemek hedeflenmiştir. Yapılan bu çalışmaya ek olarak, asetil-KoA'yı yüksek seviyede üretmek için, yolak üzerinden üretilen etanolün, istenilen ürün asetaldehid ve asetil- Koa'ya yönlendirilebilmesi için *ADH2* genin ifadesinin artırıldığı laboratuvarımızda daha önce oluşturulmuş 22aÖM suşunda, *ypl062w* geni silinmiş ve asetil- KoA miktarında ki artışın artırılması hedeflenmiştir.

## 1.1 Sentetik Biyoloji

Sentetik biyoloji; mühendislik ve biyolojinin birleştirildiği bir bilim alanıdır. Sentetik biyoloji çalışmalarında amaç sistemleri modelleyip yapılandırarak daha anlaşılır hale getirmek ve biyolojik problemleri ve zorlukları daha kolay bir biçimde çözebilmektir [10].

Sentetik biyolojinin pek çok uygulama alanı bulunmaktadır. Toksinler ve ağır metaller gibi çeşitli elementlerin varlığını tespit etmek için yaşayan biyolojik işleyişe ihtiyaç duyan biyosensörlerin kullanılması, tüm bakteriyel kromozomun sentetik olarak oluşturulması gibi birçok araştırma sentetik biyolojinin çalışma alanı içerisine girmektedir. Sentetik biyoloji en fazla metabolizma mühendisliği ve hücre transformasyonunda kullanılmaktadır. Bu ise; mikroorganizmalarda heterojen bileşiklerin üretiminde ekonomik açıdan bakıldığında bir devrim niteliğindedir [11].

## 1.2. Metabolizma Mühendisliği

Metabolizma mühendisliği, mikroorganizmalara ait metabolik yollarda bulunan metabolitlerin rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak artırıldığı alandır.

Metabolik yollar pek çok enzimatik adımlar içermektedir bu nedenle metabolizma mühendisliği bu enzimlerin üretiminden sorumlu genlerin yüksek ifadesi ve yeni genlerin hücreye tanıtılması üzerine odaklanmıştır. Odaklanılan ürün hücrenin doğal üretebildiği metabolitleri olabileceği gibi [12,13] ev sahibi organizmada bulunmayan tamamen yeni bir ürün de olabilir [14]. Doğal ürünlerin mikrobiyal olarak üretilmesi ürüne spesifik enzimlerin ya da tüm metabolik yolağın mikroorganizmaya tanıtılması ile sağlanmaktadır [15]. Metabolizma mühendisliği ile aynı zamanda aktarılabilecek yeni yollar ile kullanılan hücrenin özelliklerinde birtakım değişiklikler yapılabileceği gibi istenilen ürünün yapısında da değişiklikler yapılabilmektedir [16].

Metabolizma mühendisliği, klasik mikrobiyal genetik ve seçim, hücre biyolojisi ve genetik mühendisliği bilgisinin sentezi ile oluşan bir alandır [17]. DNA sekanslama tekniklerindeki ilerlemeler sayesinde yeni genetik materyallerin ortaya çıkması metabolik yolların daha iyi kontrol edilmesine olanak sağlamıştır. Bununla birlikte yolların tanımlanmış olması ve biyolojik modellerin detaylandırılması da enzimlerin ve metabolik yolların dizayn edilmesine destek olmaktadır [18].

Metabolik mühendisliği ile doğal ürünlerin üretiminde iki temel hedef vardır; 1) hedef ürünün miktarını artırmak, 2) farmakolojik özellikleri geliştirmek için doğal ürünlerin yapısında düzenlemeler yapmaktır [16]. Anahtar ürünün miktarında artış sağlamak için farklı bir çok yol kullanılmaktadır, örneğin;

1. Metabolik yolda sınırlayıcı olan adımları katalizleyen genlerin yüksek oranda ekspres edilmesi
2. Mikroorganizma içerisinde aktive edilmesi düşünülen yolak ile yarış halinde ve sınırlamaya neden olan veya diğer yolağı katalizleyen enzimlerin silinmesi
3. Organizma anahtar ürünü doğal olarak üretemiyorsa dışarıdan heterolog genlerin organizmaya tanıtılması [8].

Birçok kimyasalın ve sekonder metabolitlerin üretimi metabolizma mühendisliği ile kolay, hızlı ve ucuz bir şekilde sağlanabildiği için ve aynı zamanda yenilenemeyen kaynaklardan veya sınırlı doğal kaynaklardan türetilen kimyasalların üretimine olanak sağladığı için metabolizma mühendisliği çok büyük bir potansiyel taşımaktadır [15,17,19].



### 1.2.1. Metabolizma mühendisliğinin diğer yöntemlere göre avantajları

Metabolizma mühendisliği doğal ürünlerin üretilmesinde sentetik organik kimyaya göre özellikle farmasötik içerikler (APIs) için daha avantajlıdır. Çünkü bazı içerikler kimyasal olarak sentezlemek için çok karmaşık yapıdadırlar, mikroorganizmaları geliştirme esnasında belirli bir bütçe harcanacak olsada bu oran diğer yöntemler ile üretime göre daha düşük kalmaktadır.

Örneğin; likopenin domatesten üretimi sırasında tonlarca domates kabuğuna ihtiyaç vardır [20] ya da antikanser ilaç taksolün orjinal kaynağı olan *Taxus brevifolia*' dan eldesi çok sayıda *Taxus sp.* bitkisine ihtiyaç duyması nedeni ile yıkıcı olup ürünün saflaştırması bir o kadar karmaşıktır ve bunun neticesinde elde edilen miktar oldukça düşük olmaktadır [21]. Bu ürünlerin, bir kez mühendisliği iyi yapılmış bir organizmada üretimi ise 72 saat gibi kısa sürelerde ve az maliyetlerle gerçekleştirilmektedir [18].

### 1.3. Asetil-KoA

Asetil- KoA; enerji metabolizması, lipid metabolizması ve amino asit metabolizması gibi temel hücresel fonksiyonlar için gerekli olan merkezi karbon metabolizması için anahtar moleküldür [7]. Aynı zamanda yağlar (diyet takviyeleri ve biodieller), poliketidler (antibiyotikler ve antikanser ilaçlar), polihidroksialkonatlar (çözünebilir polimerler) ve izoprenoidler gibi birçok endüstriyel kimyasalların biyosentezi için öncül madde görevindedir [8]. Asetil KoA *S. cerevisiae*'da mitokondri, peroksizom, çekirdek ve sitoplazmada sentezlenmektedir. *S. cerevisiae* ökaryotik bir mikroorganizma olarak bölümlere ayrılmış bir hücresel sisteme sahiptir. Bu da hücrede farklı bölümlerde sentezlenen asetil- KoA'nın farklı membran geçirimsizliklerinden dolayı kompartmanlar arası geçişini engellemektedir. Sitozolda sentezlenen asetil-KoA burada yer alan ve birçok sekonder metabolitin sentezlendiği yolağa öncülük etmektedir [9].

Sitozolda bulunan ve asetaldehitten meydana gelen asetil - KoA genellikle çok fazla miktarda üretilmemektedir. Bununla birlikte bir çok biyokimyasal reaksiyon tarafından tüketilmektedir ve asetat, malonil KoA, sitrat gibi maddelere dönüştürülerek taşınmaktadır. Asetil- KoA'nın tüketiminde her zaman bir denge vardır ve bu denge birincil hücresel fonksiyonlar ve sekonder metabolizma için gereklidir [7]. Bu yüzden asetil-KoA yolağı üzerinden verimli ürün elde edebilmek adına asetil- KoA miktarının artırılması zorunlu bir durumdur ve bunun için çok farklı stratejiler geliştirilmiştir.



## **1.4. *ADH*, *yplw062*, *IDH* ve *ACL* Genleri ve Daha Önce Yapılmış Olan Çalışmalarda Asetil- KoA Miktarının Arttırılması İçin Gerçekleştirilen Modifikasyonlar**

### **1.4.1. *ADH***

Asetil – KoA, mayalarda sitoplazmada, asetaldehitten türemiş olan asetattan üretilmektedir bu ise pürivatın dekarboksilasyonu sonucu olmaktadır. Asetaldehid ayrıca alkol dehidrojenaz enzimi ile etanole çevrilebilmektedir. Crebtree etkisi adı verilen durumdan kaynaklı olarak yüksek glikozun bulunduğu evrede glikolitik akış etanole doğru olmaktadır [2]. Crebtree etkisi oksijen varlığında dahi organizmanın fermantasyonu tercih etme durumudur ve *S. cerevisiae*'de bir Crebtree organizmadır. Yüksek oranda glikoz varlığında *ADH1* geni aktif olmaktadır ve asetaldehit etanole çevrilmektedir. Ancak hücre içerisindeki şeker oranı düştüğünde *ADH2* geni aktive olmakta ve etanolün asetaldehite oksitlenmesini sağlamaktadır. Ancak yinede etanole geri dönüşüm olabilmekte ve bu yüzden yapılan çalışmalarda düşük konsantrasyonlarda etkili promotorlar kullanılarak *ADH2* geninin ifadesi arttırmakta ve Asetil- KoA akış yönü güçlendirilmektedir [2, 28, 29].

Yapılan bir çalışmada etanolün asetaldehite dönüşümünü sağlayan *ADH2* genin yüksek ifadesi gösterilmiştir. Bu çalışmada , asetil- KoA'nın glioksilat döngüsüne girişine engel olmak için yapılan *CIT2* veya *MLS1* genlerinin delesyonu sağlanmıştır ve sesquiterpen, üretiminde artış görülmüştür. Yine aynı strateji kullanılarak yapılan diğer çalışmalarda 1- büthanol, polihidroksibütirat, 3- hidroksi propiyonik asit miktarında artışlar görülmüştür [28]. Yapılan bir başka çalışmada düşük dozda etkili olan HXTY promotoru kullanılarak *ADH-2*' nin yüksek ifadesi sağlanmış ve *ERG 10* 'un da yüksek ifadesi ile karbon atomunun sitozolde asetil- KoA'ya akışı sağlanmıştır ve  $\alpha$  sentalen üretiminde %25 artış sağlandığı gözlemlenmiştir [2].

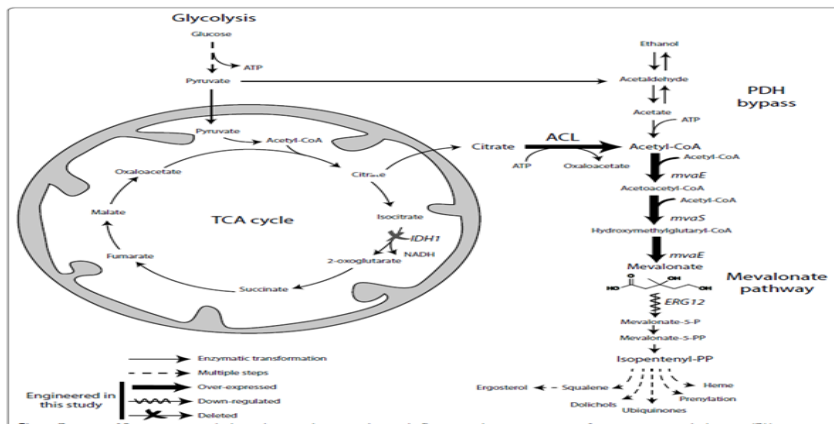
### **1.4.2. *ypl062w***

*ypl062w* uzak gen bölgesi daha önce yapılan bir çalışmada silinmiş bu durumun karotenoid üretiminde sitoplazmik mevalonat seviyesi artışına neden olduğu raporlanmıştır [30]. Bu genin silinmesi hücre dışında asetat birikimini engellemiştir. Asetat birikimi önlenmesinin ürün eldesi için çok önemli olduğundan genin silinmesinin kritik etkisi ortaya konulmuştur. *ypl062w* geninin silinmesi asetattan karbon tutularak, sitoplazmik asetil-KoA miktarında %100 bir artış sağlamış olduğu



Genomik açıdan bakıldığında yağ mayalarının ATP sitrat liyaz (*ACL*)'ı kodlayan genlere sahip oldukları görülmektedir. Fakat *S. cerevisiae* gibi diğer mayalarda bu gen bulunmamaktadır. Düşük miktarda nitrojen bulunduran ortamlarda izositrat dehidrogenazın (*ICDH*) sitrat birikmesine neden olduğu ve sitratın sitoplazmaya taşınıp *ACL* enzimi ile parçalanması sonucu sitoplazmik asetil- KoA miktarında artış olduğu gösterilmiştir (**Şekil 1.3**) [23].

Genetik mühendisliği ve besiyeri optimizasyonu kullanılarak belirgin özelliklere sahip *ACL* yolağı *S. cerevisiae* için tekrardan yapılandırılabilir. *ACL* yolağının heterolog olarak *S. cerevisiae*'de kullanılması için maya kodon optimize edilmiş *ACL* genleri kullanılmaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda en yüksek aktivite ise *A. nidulans*'tan alınan *ACL* geni ile gözlemlenmiştir. Ancak bu tek başına yeterli olmamaktadır. *S. cerevisiae* NAD<sup>+</sup>- NADP<sup>+</sup>- bağımlı olmak üzere mitokondriyal *ICDH* içermektedir. *IDH* enzimi izositrattan oksoglutarat sentezlenmesinde görevli bir enzimdir ve bu NAD<sup>+</sup>- bağımlı mitokondriyal *ICDH*'ı kodlamaktadır, bu genin silinmesi sitrat konsantrasyonunda artış meydana getirmiştir. *ACL*'nin yüksek ekspresyonu ile *IDH1*'in silinmesi sitratta hep azalma göstermiş ancak bunun sitratın çevrimi ile ilgili olduğu anlaşılmış çünkü mevalonat miktarında belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Ayrıca ek olarak *IDH 1*'in silinmesi ile malat, fumarat ve süksinat miktarında belirgin bir artış meydana gelmiştir bu ürünler ise glioksilat döngüsünün anahtar ürünlerini oluşturmaktadır. Ayrıca 2 oksoglutarat miktarında da yüksek bir artış meydana gelmiştir. Sonuç olarak yüksek miktarda mevalonat eldesine ulaşılmıştır [23].



**Şekil 1.3.** Mitokondri içerisinde ki TCA döngüsü, bu döngüde sitrat oluşumu, sitratın sitoplazmik Asetil KoA 'ya dönüşümü ve sitoplazmik Asetil KoA yolağı [23].

## 2. YÖNTEM

### 2.1. Çalışmada Kullanılan Suşlar

Ticari bir suş olan *Escherichia coli* DH5α hücreleri üretilmek istenilen parçaların eldesi için kullanılacak plazmitlerin transformasyonu ve izolasyonu için kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılmış olan maya suşları ve genotipleri **Tablo 2.1**'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.1.** Çalışmada kullanılan maya suşları

Suşlar	Genotipleri
SCIG22a	( <i>MATa MAL2-8c SUC 2ura3-52 lpp1Δ::loxP dpp1Δ::loxP PERG9Δ::loxP-PHXT1gdh1Δ::loxP PTEF1-ERG20 PPGK1-GDH2 PTEF1-tHMG1</i> )
22aÖM	( <i>MATa MAL2-8c SUC 2ura3-52 lpp1Δ::loxP dpp1Δ::loxP PERG9Δ::loxP-PHXT1gdh1Δ::loxP PTEF1-ERG20 PPGK1-GDH2 PTEF1-tHMG1</i> )

*S. cerevisiae*'de **Tablo 2.1**'de genotipi gösterilmiş olan SCIG22a suşunda *ypl062w* geni susturularak ve İPK1 suşu elde edilmiştir. Ayrıca **Tablo 2.1**'de genotipi verilmiş olan 22aÖM suşunda *ypl062w* suşu susturularak İPK2 suşu elde edilmiştir. *ypl062w* geni susturularak elde edilmiş olan İPK1 suşunda *IDH1* geni susturularak İPK3 suşu elde edilmiştir. *ACL1* ve *ACL2* genleri heterolog kodon optimize olarak alınmıştır. Bu genler İPK3 suşuna transforme edilerek İPK4 suşu elde edilmiştir.

### 2.2. Hücrelerin Büyüme Şartları ve Besiyerleri

Tüm maya kültürleri standart sıcaklık olan 30°C'de kültüre edilmişlerdir. Sıvı maya kültürleri 200 rpm hızda kültüre edilmişlerdir.

Transformasyon öncesinde, arka plan suşları Yeast- Peptone- Dextrose Agar (YPD agar) (Yeast Extract 10 g/L; peptone from animal tissue 20g/L; glukoz 20 g/L ve 20 g/L agar ) besiyerine ekilmişlerdir.

Transformasyon sonrasında URA seçici belirtecini içeren suş, Urasil içermeyen sentetik SDA- URA besiyerine (20 g/L agar ve glikoza eklenmiş CSM-URA DOB 0,77g/L , YNB without amino acids 6,9 g/L) ekim yapılarak seçilmiştir.

SDA- URA besiyerinde oluşan kolonilerden tek koloni seçimi yapılmıştır. Koloni PCR ve dizileme işlemleri ile doğrulama yapılmış ve pozitif olan koloniler SD-URA 5- FOA (20 g/L agar ve glukozaya eklenmiş YNB without aminoacids 6,9 g/L , CSM- URA DOB 0,77 g/L, uracil 50 mg/L, 5- FOA 750 mg/L) besiyerine ekilmiştir ve URA belirtecini uzaklaştırılması sağlanmıştır [31].

Besiyerleri gösterilen miktarlara göre hazırlanıp 121° C' de 15 dak. 1.5 atm basınçta steril edilmiştir.

### **2.3. Plazmit Vektörlerin Hazırlanması**

#### **2.3.1. *E. coli* kompetent hücre yapımı ve vektörlerin transformasyon ve saflaştırma aşamaları**

Ticari *E. coli* DH5 $\alpha$  hücreleri CaCl<sub>2</sub> protokolü kullanılarak kimyasal olarak kompetent hale getirilmişlerdir. 42°C'de iki dakika ısı şokuna maruz bırakılan hücreler daha sonra antibiyotik içeren besiyerine ekilmiştir. Pozitif olan koloniler seçilmiş ve antibiyotik içeren LB sıvı besiyerine ekilmişlerdir ve 37°C'de inkübe edilmişlerdir. 12-16 saat sonunda plazmitler GeneJet Plasmid Purification Kit kullanılarak saflaştırılmıştır. Yapılan çalışmada X1-1 plazmidi URA parçasının üretimi için kullanılmıştır. X1-1 plazmidi ilgili integrasyon bölgeleri URA3 için seçici bir belirteçtir. GM1 plazmiti *ACL* genlerinin hücreye tanıtılması için oluşturulan kasette promotor bölgesinin eldesi için Px3 plazmiti ise *ACL* genlerinin hücreye transformasyonu için oluşturulan kasette integrasyon bölgelerini ve URA seçici genini içerdiğinden kullanılmıştır.

### **2.4. DNA Kasetinin Oluşturulması**

PZR'ler PrimeStar HS DNA Polymerase (Takara) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon DNA büyüklüğü, kalıp DNA konsantrasyonu, primer konsantrasyonu ve DNTP konsantrasyonu gibi minimal düzeyde yapılan farklılıklar ile genel olarak protokole uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

Genel PCR döngüsü şartları **Tablo 2.2**'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.2.** Genel PCR döngüsü şartları

98°C	45 sn	
98°C	10 sn	X30
58°C	20sn	
72°C	60 sn /1000 baz	
72°C	5 dakika	
+4°C	∞	

Birleştirme reaksiyonları iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada, ayrı ayrı elde edilmiş olan DNA parçaları konsantrasyonları ve büyüklüklerine göre hesaplanıp kalıp olarak eklenerek 15 döngü olacak şekilde, örtüşen uçların birleştirilmesini kolaylaştırmak için primerler eklenmeden gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon şartları **Tablo 2.3**'de gösterilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon gerçekleştirildikten sonra ilk reaksiyon ürünü, ikinci aşamada kalıp DNA olarak kullanılmış, DNA kasetindeki ilk genin ileri primeri ve son genin geri primerleri eklenerek reaksiyon gerçekleştirilmiştir. İkinci aşama PCR reaksiyonu **Tablo 2.4**'te gösterilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Yapılan birleştirme reaksiyonları PrimeStar HS DNA Polymerase (Takara) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 2.3.** Füzyon reaksiyonu birinci aşama reaksiyonu için PCR şartları

95°C	3 dk	
98°C	10 sn	x15
58°C	15 sn	
72°C	DNA büyüklüğüne göre 60 sn/1000 baz	
72°C	10 dak.	
+4	∞	

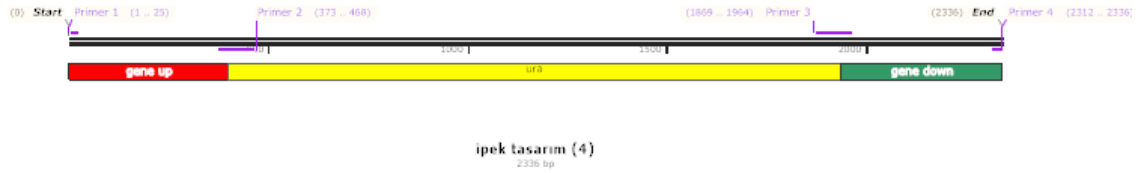


**Tablo 2.4.** İkinci füzyon için PCR döngüsü şartları

98°C	3 dk	
98°C	10 sn	X30
56°C	15 sn	
72°C	1.12 sn	
72°C	10 dk	
+4	∞	

### 2.4.1. *ypl062w* geninin silinmesi için oluşturulan DNA kasedi

*ypl062w* geni NCBI’da taranmıştır.



**Şekil 2.1.** *ypl062w* geni silmek üzere oluşturulmuş olan DNA kasetinin tasarımı

*ypl062w* genini silmek için Gene up, URA ve Gene down olarak adlandırılan 3 DNA parçası; ayrı ayrı **Tablo 2.2**'de gösterilen reaksiyon ile PrimeStar HS DNA Polymerase (Takara) kullanarak bir PZR kurulup birleştirilmiştir. Silmek istenilen *ypl062w* geni maya genomunda Gene up ve Gene down parçaları arasında kalmaktadır. URA parçası ise transformasyondan sonra kullanılacak besiyerinde (SDA-URA) bir belirteç olarak kullanılmak ve Gene up Gene down DNA parçalarının arasında birleştirilmek üzere üretilmiştir.

Gene up ve Gene down bölgelerinin her ikisinde 400 bç uzunluğundadır ve genomik DNA’dan Genomic DNA purification kit (Thermo scientific) kullanılarak elde edilmişlerdir. URA gen dizisi 1536 bç uzunluğundadır ve X1-1 plazmitinden elde edilmiştir. DNA parçalarının üretiminden sonra PrimeStar HS DNA Polymerase (Takara) kullanarak birleştirme PZR reaksiyonu kurulmuştur.

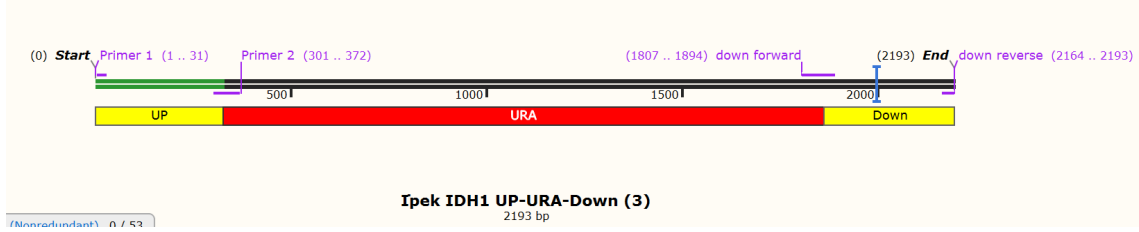
Reaksiyonda kullanılan primer dizileri **Tablo 2.5**'te gösterilmiştir.

**Tablo 2.5.** *yp1062w* geninin silinmesi için oluşturulan DNA kasetinde yer alan gen ve DNA parçaları

Gen / DNA parçalarının adı	Gen / DNA parçalarının saflaştırılması	Primer Dizileri	Büyüklikler
Gene up	<i>S. cerevisiae</i> genomik DNA'sı	<b>Primer 1:</b> ACTACCACTGCACCTCCTAACATCA <b>Primer2:</b> GCAAGTAATGTGTGTAAAAAATGCGTTA CCACCATCCAATGCAGACCGATCTTCTAC CCAGAATCACGCCCTTACGTGAGGGGCAG TGTCGTATG	400bç
URA	X1-1	<b>Primer2:</b> GCAAGTAATGTGTGTAAAAAATGCGTTA CCACCATCCAATGCAGACCGATCTTCTAC CCAGAATCACGCCCTTACGTGAGGGGCAG TGTCGTATG <b>Primer3:</b> ATCAAATGGTGGTTATTCGTGGATCTATAT CACGTGATTTGCTTAAGAATTGTCGTTCAT GGTGACACCACCGACCATGTGGGCAAATT CGTAATA	1536 bç
Gene down	<i>S. cerevisiae</i> genomik DNA'sı	<b>Primer3:</b> ATCAAATGGTGGTTATTCGTGGATCTATAT CACGTGATTTGCTTAAGAATTGTCGTTCAT GGTGACACCACCGACCATGTGGGCAAATT CGTAATA <b>Primer 4:</b> GAGCTTTCATAAACTTGTTGTTAAT	400 bç

## 2.4.2. *IDH1* geninin silinmesi için oluşturulan DNA kasedi

*IDH1* geni NCBI'da taranmıştır.



Şekil 2.2 *IDH1* genini silmek üzere oluşturulmuş olan DNA kasetinin tasarımı

*IDH1* genini silmek için Up, URA ve Down olarak adlandırılan 3 DNA parçası; ayrı ayrı **Tablo 2.2**'de gösterilen reaksiyon ile PrimeStar HS DNA Polymerase (Takara) kullanarak bir PZR kurulup birleştirilmiştir. Silmek istenilen *IDH1* geni maya genomunda Up ve Down parçaları arasında kalmaktadır. Ura parçası ise transformasyondan sonra kullanılacak besiyerinde (SDA-URA) bir belirteç olarak kullanılmak ve Up ve Down DNA parçalarının arasında birleştirilmek üzere üretilmiştir.

Up ve Down bölgelerinden Up parçası 328, Down parçası ise 329 bç uzunluğundadır ve genomik DNA'dan Genomic DNA purification kit (Thermo scientific) kullanılarak elde edilmişlerdir. Ura gen dizisi 1536 bç uzunluğundadır ve X1-1 plazmitinden elde edilmiştir.

DNA parçalarının üretiminden sonra PrimeStar HS DNA Polymerase (Takara) kullanarak birleştirme PZR reaksiyonu kurulmuştur. Reaksiyon şartları **Tablo 2.3.** ve **Tablo 2.4.**'de gösterildiği şekilde oluşturulmuştur. DNA parçalarının üretiminden sonra PrimeStar HS DNA Polymerase (Takara) kullanarak birleştirme PZR reaksiyonu kurulmuştur.

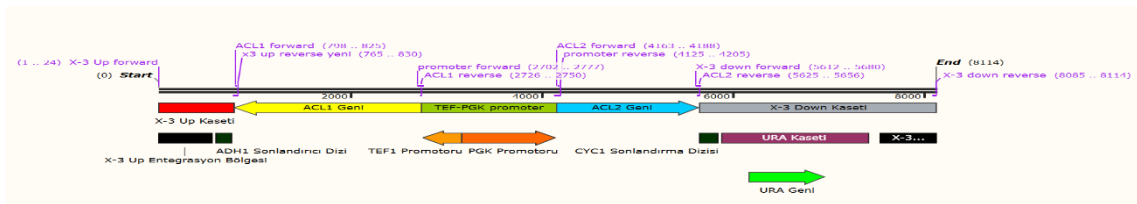
Reaksiyonda kullanılan primer dizileri **Tablo 2.6**'da gösterilmiştir.

**Tablo 2.6.** *IDH1* geninin silinmesi için oluşturulan DNA kasetinde yer alan gen ve DNA parçaları

Gen/DNA parçalarının adı	Gen/ DNA parçalarının saflaştırılması	Primer Dizileri	Büyüklikler
UP kaseti	<i>S. cerevisiae</i> genomik DNA'sı	<b>Primer 1</b> AAACCTTCTTTATTTTTTTTGGTAGCTCG G <b>Primer 2</b> CGTTACCACCATCCAATGCAGACCGATCT TCTACCCAGAATCACTTTTCTTTACAATT ATGGAGGAAAAGG	328 bç
URA	X1-1 plazmiti	<b>Ura forward:</b> GTGATTCTGGGTAGAAGATCGGTCTGCAT TGG <b>Ura reverse :</b> GTGTCACCATGAACGACAATTCTTAAGC	1536 bç
Down kaseti	<i>S. cerevisiae</i> genomik DNA'sı	<b>down forward</b> GGTTATTCGTGGATCTATATCACGTGATTT GCTTAAGAATTGTCGTTTCATGGTGACACT GAAAACAATTCCCCTTTTTTTTGTTCTGC <b>down reverse</b> CGCTTAAGCTATTATTCCAGTATGTATTC	329 bç

### 2.4.3. *ACL1* ve *ACL2* genlerinin üretilmesi için oluşturulan DNA kaseti

*ACL* genleri NCBI'da taranmıştır



**Şekil 2.3.** *ACL* genlerinin hücre içinde ifade edilmesi için oluşturulmuş olan DNA kasetinin tasarımı

*ACL1* ve *ACL2* genlerini silmek için 5 parçadan oluşan bir DNA kaseti oluşturulmuştur. Bu parçalardan, Promotor kısmında TEF ve PGK promotorları bulunmaktadır. Bu promotorlar *ACL1* ve *ACL2* genlerinin sentezlerini başlatacak olan bölgelerdir ve kasette her iki genin ortasında bulunmaktadır. X-3 down adı verilmiş

olan DNA parçasında ise URA bölgesi vardır. Her iki X-3 bölgesi de integrasyon parçaları içermektedir. Bu sayede genomik DNA ve elde edilen DNA kasedi transformasyondan sonra birleşeceklerdir. Ve kasette bulunan URA parçası ise transformasyondan sonra kullanılacak besiyerinde ( SDA-URA) bir belirteç olarak görev almaktadır.

*ACL* genleri heterolog olarak *Yarrowia lipolytica* organizmasından kodon optimize olarak alınmış ve 2 parça halinde uygun primerler ile, promotor bölgesi ise GM1 plazmitinden uygun primerler kullanılarak ve X-3 Up ve X-3 Down kasetleri ise pX-3 plazmitinden uygun primerler ile **Tablo 2.2**'de gösterilen reaksiyon ile PrimeStar HS DNA Polymerase (Takara) kullanarak ayrı ayrı elde edilmiştir. DNA parçalarının üretiminden sonra PrimeStar HS DNA Polymerase (Takara) kullanarak birleştirme PZR reaksiyonu kurulmuştur. Reaksiyon şartları **Tablo 2.3** ve **Tablo 2.4** 'de gösterildiği şekilde oluşturulmuştur. Reaksiyonda kullanılan primer dizileri **Tablo 2.7**'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.7.** *ACL* genlerinin hücre içinde ifade edilmesi için oluşturulan DNA kasetinde yer alan gen ve DNA parçaları

Gen/DNA parçalarının adı	Gen/ DNA parçalarının saflaştırılması	Primer Dizileri	Büyükklükler
X-3 Up Kaseti	PX <sub>3</sub> plazmiti	<b>X-3 Up forward</b> CGAGATCTTTGTGTTCCGGTTACCC <b>X-3 Up reverse</b> GGAGACGTGAGTAAGGCCAAGACGAGGT CTTAGGTAGATACGTTGTTGACACTTCTAA ATAAGCGA	797 bç
<i>ACL1</i> Geni	Hazır olarak satın alınmıştır	<b>ACL1 forward</b> CTAAGACCTCGTCTTCGCCTTACTCACG <b>ACL1 reverse</b> ATGTCAGCGAATGAGAACATATCCC	1953 bç
TEF-PGK promotor	GM1 plazmiti	<b>promoter forward</b> CCTTGCCGACTGGGGCATCAAAACGGGAT ATGTTCTCATTCGCTGACATTTGTAATTAA AACTTAGATTAGATTGC <b>promoter reverse</b> GCAGTGCCTTGCCGTCGGCTTCGTGAATG CTCTCGCTGACATTGTTTATATTTGTTG TAAAAGTAGATAATTACTTCC	1412 bç
<i>ACL2</i> Geni	Hazır olarak satın alınmıştır	<b>ACL2 forward</b> ATGTCAGCGAAGAGCATTACGAAGC <b>ACL2 reverse</b> TTATACACCTAGAGGTGTAGACGCTTCTG TAC	1494 bç
X-3 Down Kaseti	PX <sub>3</sub> plazmiti	<b>X-3 down forward</b> GGGACGGGGCCGAGTACAGAAGCGTCTA	2458 bç

		CACCTCTAGGTGTATAAATCCGCTCTAAC CGAAAAGGAAGG <b>X-3 down reverse</b> GAGGTGGTTATTGATCACCGGAAAGTTTG G	
--	--	--	--

[Tablo 2.7 (Devam) *ACL* genlerinin hücre içinde ifade edilmesi için oluşturulan DNA kasetinde yer alan gen ve DNA parçaları]

## 2.5. Jel Elektroforezi ve DNA'nın Hazırlanışı

50X TAE Buffer (40mM Tris, 20 mM Asetat ve 1mM EDTA ph :8 , elektroforezi 1X konsantrasyonda çalıştırmak üzere dilüe edilmiştir. DNA örnekleri 80/85 voltajda DNA parçalarının açılma durumlarına bakılarak 1 kb'lık marker ile birlikte 30-40 dakika yürütülmüştür.

Yürütülme işleminden sonra saflaştırma Gene Jet PCR purification kit (Thermo Scientific) ile gerçekleştirilmiştir.

DNA miktarı nanodrop kullanılarak belirlenmiştir. Ölçülen DNA'dan 5 µL içerisinde en az 2000 ng DNA olacak şekilde transformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

## 2.6. Transformasyon

Kullanılan transformasyon yöntemi elektroporasyon ile transformasyon yöntemidir [32, 33]. Daha sonra hücreler lityum asetat/PEG transformasyon yöntemine de uygun olarak kompetent hale getirilmiştir [34, 35].

Transformasyon öncesinde hücreler YPD agara ekim yapılarak tazelenmiştir ve oluşan kolonilerden tek koloni alınarak gecelik kültür yapmak için YPD sıvı besiyerine ekilmiştir. Daha sonra gecelik kültür transformasyon öncesinde, 5 mL sıvı YPD besiyeri ile yapılan gecelik kültür 50 mL taze sıvı YPD besiyerine OD<sub>600</sub>'de 0,05- 0,1 olacak şekilde inoküle edilmiştir ve transformasyon OD 600 0,5- 1,2 arasında gerçekleştirilmiştir [34].

*ypl062w* ve *IDH1* genini silmek amacı ile oluşturulan DNA kasedi ve *ACL* genlerini hücre içine aktarmak için oluşturulan DNA kasetleri ayrı ayrı bu yöntemle transforme edilmiştir ve SDA – URA besi yerine ekimleri yapılmıştır. Transformasyon yapılan hücrelere koloni PCR yöntemi ile koloni taraması yapılmıştır. Pozitif olan koloniler DNA kasedinin içermiş olduğu URA3 belirtecini uzaklaştırmak adına, uracil içeren 5- FOA besiyerine ekilmiştir. Oluşan tek koloni hücreler koloni PCR yöntemi ile

taranmış ve SDA-URA besiyerine ekim yapılmıştır. URA bölgesinin uzaklaştığı kesinleştirilmiştir.

## 2.7. Koloni PCR ve Dizileme

Transformasyondan sonra pozitif olduğu tahmin edilen koloniler seçilerek 200 mM LiAc %1 SDS'de çözdürülmüş 70 °C'de 5 dakika bekletilmiştir. İki kez %96'lık ve %70'lik alkol ile sırasıyla yıkama yapılmasının ardından her defasında vortex ile yavaşça karıştırılmış ve ardından 15000 g hızda santrifüj yapıp süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hücrelerin üzerine 50-80 µL MQ su ilave edilmiştir ve süpernatantı toplamak amacı ile 15000 g'de 1 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. Buradan elde edilen her 1 µL süpernatant koloni PCR reaksiyonu için kalıp olarak kullanılmıştır.

Koloni PCR Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) kullanılarak genel şartlara uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Genel şartlar **Tablo 2.8**'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.8.** Genel PCR döngüsü şartları

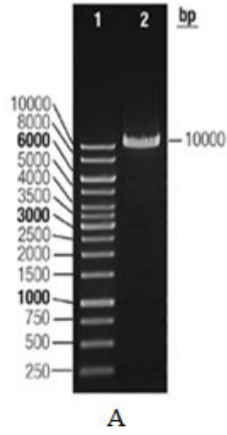
98°C	1 dk	
98°C	10 sn	X30
Primerin çalıştığı sıcaklık	15 sn	
72°C	30 sn /1000 bç	
72°C	10 dk	
+4°C	∞	

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Elde Edilen DNA Parçalarının Agaroz Jelde Görüntülenmesi

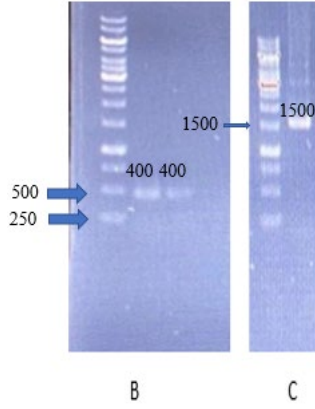
##### 3.1.1. *yp1062w* genin silinmesi ile ilgili jel görüntüleri

*yp1062w* genini silmek amacı ile Gene up, Gene down adı verilen DNA parçaları ve ura bölgesi ayrı ayrı PZR ile elde edilmiştir ve agaroz jel elektroforezi ile elde edilen parça büyüklükleri doğrulanmıştır. DNA parçalarını büyüklükleri marker kullanılarak tespit edilmiştir (Şekil 3.1). İlk olarak Gene up ve Gene down olarak adlandırılan *yp1062w* geninin ilerisinde ve gerisinde bulunan DNA parçaları genomik DNA kalıp olarak kullanılarak, Tablo 2.5'te gösterilmiş olan primerler ile elde edilmiştir. Ura parçası ise X1-1 plazmitinden Tablo 2.5'te gösterilmiş olan primerler ile elde edilmiş, elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür ve jel görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. DNA parçalarını büyüklüklerinin karşılaştırıldığı thermo fisher SM0314 katalog numaralı marker

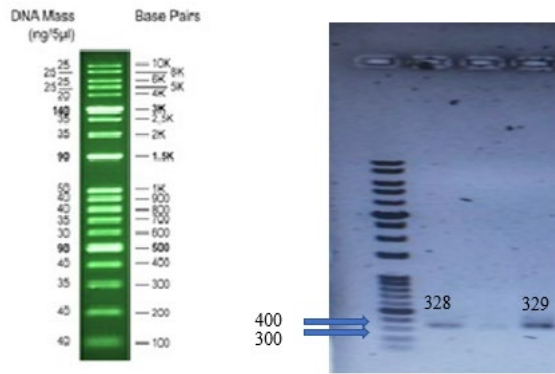




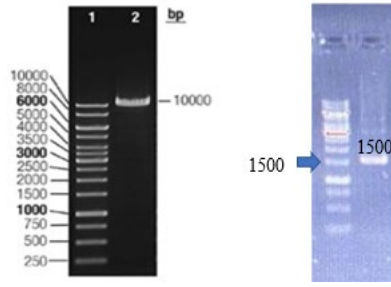
**Şekil 3.2.** B: Gene up ve Gene down DNA parçaları C: URA gen bölgesi , agaroz jelde gösterilmesi

### 3.1.2. IDH1 genin silinmesi ile ilgili jel görüntüleri

IDH1 genini silmek amacı ile Up, Down adı verilen DNA parçaları ve URA bölgesi ayrı ayrı PZR ile elde edilmiştir ve agaroz jel elektroforezi ile elde edilen parça büyüklükleri doğrulanmıştır. İlk olarak Up ve Down kasetleri, IDH geninin ilerisinde ve gerisinde bulunan DNA parçaları, genomik DNA kalıp olarak kullanılarak, **Tablo 2.6**'da gösterilmiş olan primerler ile elde edilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür (**Şekil 3.3**). Ura parçası ise X1-1 plazmitinden **Tablo 3.6**'da gösterilmiş olan primerler ile elde edilmiştir (**Şekil 3.4**).



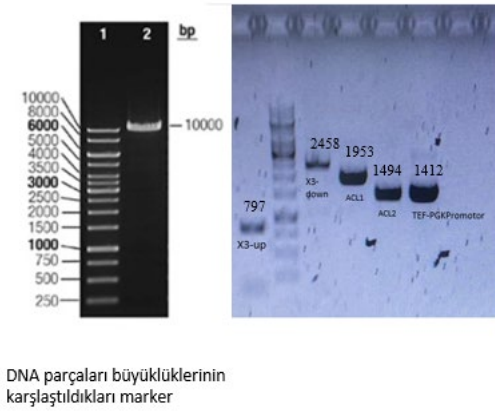
**Şekil 3.3.** Up ve Down parçalarının agaroz jeldeki görüntüsü



Şekil 3.4. *URA* parçasının agaroz jeldeki görüntüsü.

### 3.1.3. *ACL* genlerinin hücre içine aktarılması için oluşturulan DNA kasedindeki DNA parçalarının jel görüntüleri

*ACL* genlerinin hücreye aktarılması için DNA kasedi tasarlanmıştır (Şekil 2.2). DNA kasedinde X3- UP, *ACL1*, Promotor, *ACL2* ve X3-DOWN bölgeleri Tablo 2.7’de gösterilen uygun primerler ile ve uygun DNA kaynakları ile farklı PZR reaksiyonları kurularak elde edilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde koşturulmuştur ve jel görüntüleri elde edilmiştir. (Şekil 3.5).



DNA parçaları büyüklüklerinin karşılaştıkları marker

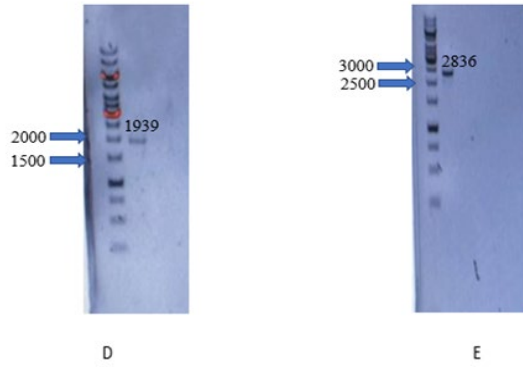
Şekil 3.5. Ölçü olarak kullanılmış olan marker, X3- UP, *ACL1*, Promotor, *ACL2* ve X3-DOWN bölgeleri

## 3.2. Elde Edilen DNA Parçalarının Birleştirilme Reaksiyonları Ardından Agaroz Jelde Görüntülenmesi

### 3.2.1. *yp1062w* genin silinmesi için yapılan birleştirme reaksiyonu sonucunun jelde görüntülenmesi

Agaroz jelde doğru yerde olduğu gösterilmiş olan parçalar Gene up ve Gene down bölgeleri GeneJet PCR Purification Kit (Thermo scientific) kullanılarak, *URA*

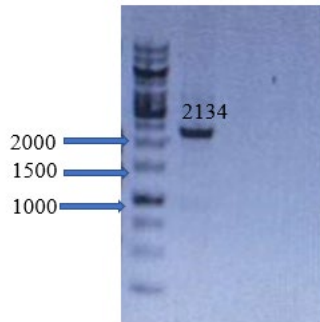
bölgesi ise GeneJet gel extraction kit (Thermo scientific) kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen DNA parçaları ile birleştirme reaksiyonu yapılmış ilk önce Gene up olarak adlandırılmış olan DNA parçası Ura parçası ile birleştirilmiş ardından birleşen iki parça GeneJet PCR Purification Kit (Thermo scientific) kullanılarak saflaştırılmış ve Gene down adı verilmiş olan DNA bölgesi ile birleştirilmiştir (**Şekil 3.6**).



**Şekil 3.6.** D: Gene up ve URA bölgeleri birleştirme reaksiyonu sonucu E: Gene up, URA ve Gene down parçalarının birleştirme reaksiyonu sonucu

### 3.2.2. IDH1 genin silinmesi yapılan birleştirme reaksiyonu sonucunun elde jelde görüntülenmesi

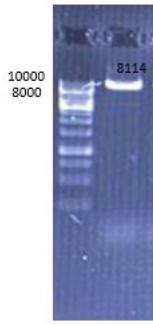
Agaroz jelde doğru yerde olduğu gösterilmiş olan UP Kasedi ve DOWN kasedi ve URA bölgesi GeneJet PCR Purification Kit (Thermo scientific) kullanılarak, kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen DNA parçaları ile birleştirme reaksiyonu yapılmıştır (**Şekil 3.7**).



**Şekil 3.7.** IDH1 genini silmek üzere oluşturulan DNA kasedi birleştirme reaksiyonu sonucu

### 3.2.3. *ACL* genlerinin hücreye tanıtılması için yapılan birleştirme reaksiyonu sonucunun jelde görüntülenmesi

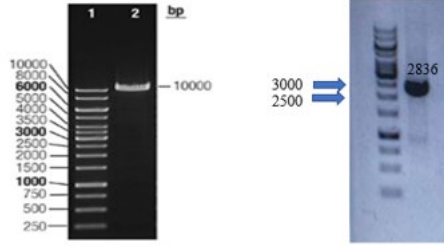
Agaroz jelde doğru yerde olduğu gösterilmiş olan X3- UP, *ACL1*, Promotor, *ACL2* ve X3-DOWN bölgeleri GeneJet PCR Purification Kit (Thermo scientific) kullanılarak, kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen DNA parçaları ile birleştirme reaksiyonu yapılmıştır (**Şekil 3.8**).



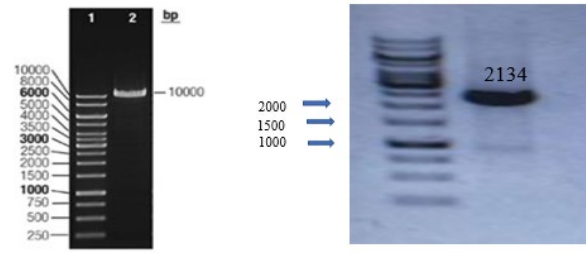
**Şekil 3.8.** *Acl* genlerini hücre içine atmak için oluşturulan DNA kasedi birleştirme reaksiyonu sonucu

### 3.3. Transformasyon Sonrası Koloni PZR sonuçları

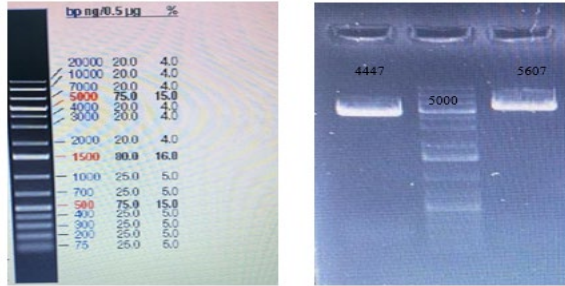
Yapılan birleştirme reaksiyonlarından sonra transformasyon için gerekli miktarda DNA elde edilmiş ve transformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Transformasyon işlemi yapılan hücreler SDA-URA besiyerine ekilmiştir ve 2-3 gün sonrasında besiyerinde oluşan tek koloniler seçilip koloni PZR protokolü uygulanmıştır ve reaksiyon kurulmuştur. Koloniler içerisinden agaroz jel görüntüsü istenilen büyüklükte çıkan DNA parçaları çoğaltılmıştır (**Şekil 3.9**, **Şekil 3.10** ve **Şekil 3.11**). GeneJet gel extraction kit (Thermo scientific) kullanılarak saflaştırılan DNA'lar, Sanger yöntemi ile doğrulanmıştır.



Şekil 3.9. *ypI062w* genini silmek adına yapılan transformasyon sonrasındaki koloni PZR işlemi ardından agaroz jel fotoğrafında istenilen DNA parçası



Şekil 3.10. *IDH1* genini silmek adına yapılan transformasyon sonrasındaki koloni PZR işlemi ardından agaroz jel fotoğrafında istenilen DNA parçası



Şekil 3.11. *ACL* genleri için yapılan transformasyon sonrasındaki koloni PZR işlemi ardından agaroz jel fotoğrafında istenilen DNA parçası

## 4. SONUÇ VE TARTIŞMA

### 4.1. Sonuç

Yapılan bu tez çalışması ile SCIG22a suşunda ve 22aÖM suşunda *ypl062w* geni susturularak sırası ile İPK1 ve İPK2 suşları elde edilmiştir. İPK1 suşunda ise *IDH1* geni susturularak İPK3 suşu elde edilmiştir. Elde edilen İPK3 suşuna *ACL1* ve *ACL2* genleri heterolog kodon optimize olarak aktarılmış ve İPK4 suşu elde edilmiştir. Elde edilen suşlar *Saccharomyces cerevisiae*'de metabolizma mühendisliği ile Asetil- KoA ve terpenoidler gibi sekonder bileşiklerin üretiminin artırılması amacı ile yapılacak daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C'de stoklanmıştır.

### 4.2. Tartışma

Yapılan çalışmada öncelikle, *Saccharomyces cerevisiae*'de metabolizma mühendisliği ile ilgili daha önceden yapılmış olan çalışmalar taranmıştır. Terpenoidler gibi bitkilerde bulunan sekonder bileşiklerin üretiminin *Saccharomyces cerevisiae*'de yapılabildiği fakat bu bileşiklerin üretimi için öncelikli olarak öncül madde olan Asetil-KoA miktarının yüksek olması gerektiği bu çalışmalarda belirtilmiştir [7, 23-30]. Bu çalışmada ise Asetil-KoA miktarını, arttırmak adına yapılan farklı çalışmalardan elde edilen bilgiler doğrultusunda, yapılmış olan iki çalışma göz önüne alınmıştır. Çalışmalardan birinde mitokondrideki sitrat miktarını arttırmak için *IDH1* geninin silinmesi ve sitoplazmadaki sitratın Asetil-KoA'ya dönüşmesi için *ACL* genlerinin mikroorganizmaya tanıtılmış ve sitoplazmadaki Asetil-KoA miktarındaki artışın oldukça yüksek olduğu görülmüştür [23]. Diğer çalışmada ise uzak bir gen bölgesi olan *ypl062w* geninin silinerek hücre dışı asetat birim miktarında azalmanın ve sitoplazmadaki Asetil-KoA miktarında yüksek bir artış olduğu gözlenmiştir [30]. Yapılmış olan çalışmalardaki Asetil- KoA miktarını arttırmak için uygulanmış olan 3 ayrı strateji bu çalışmada birleştirilmiştir. *ypl062w*, *IDH1* geni silinmiş ve *ACL1* ve *ACL2* genleri *Saccharomyces cerevisiae*'ye tanıtılmıştır. Elde edilen suşların her birisinde Asetil- KoA miktarını arttıracak değişiklikler yapılmış olup elde edilen son suş olan İPK4 suşunda 3 ayrı stratejinin hepsi uygulanmıştır ve artışın en çok olması beklenen suşta İPK4 suşudur. Elde edilen suşlar dizileme yaptırılarak doğrulukları kanıtlanmıştır. Asetil-KoA miktarını arttırmak adına yapılacak olan sonraki çalışmalarda, yapılmış olan çalışmada elde edilen suşlar kullanılarak, Pirüvat dehidrogenaz (*PDC*), Aldehid dehidrogenaz(*ALD*), Asetil-CoA sentaz (*ACS*) gibi

Asetil-KoA yolağında bulunan ve Asetil-KoA'nın sentezlenmesinde görevli olan bu genlerin ifadelerinin arttırılması ile Asetil-KoA miktarında ve bununla birlikte yolakta bulunan diğer sekonder bileşiklerin miktarında daha fazla artış sağlanabilecek farklı stratejiler uygulamak mümkün olacaktır.

## KAYNAKÇA

- [1] Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E. H., Rollinger, J. M., Schuster, D., Breuss, J. M., Bochkov, V., Mihovilovic, M. D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V. M., & Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol. Adv.*, 33(8), 1582–1614.
- [2] Chen, Y., Daviet, L., Schalk, M., Siewers, V., & Nielsen, J. (2013). Establishing a platform cell factory through engineering of yeast acetyl-CoA metabolism. *MBE.*, 15, 48–54.
- [3] Bahieldin, A., Gadalla, N., Al-Garni, S., Almehdar, H., Noor, S., Hassan, S., Shokry, A., Sabir, J., Murata, N. (2014). Efficient production of lycopene in *Saccharomyces cerevisiae* by expression of synthetic crt genes from a plasmid harboring the ADH2 promoter. *PLASMID A journal of mobile Genetic Elements and Gnomics. Cilt(72)*, 18-28.
- [4] Xie, W., Ye, L., Lv, X., Xu, H., Yu, H. (2015). Sequential control of biosynthetic pathways for balance utilization of metabolic intermediates in *Saccharomyces cerevisiae*. *MBE.*, Cilt(28), 8-18.
- [5] Niu F.X., Lu Q., Bu Y.F., Liu J.Z., (2017). Metabolic engineering for the microbial production of isoprenoids: carotenoids and isoprenoid-based biofuels, *Synth. Syst. Biotechnol.*, 2: 167-175.
- [6] Almanza, A., Montañez, J., Martínez, G., Jiménez, A., Esquivel, J., Aguilar, C. (2016). Lycopene: Progress in microbial production. *Trends Food Sci. Technol.*, Cilt (56), 142-148.
- [7] Krivoruchko, A., Zhang, Y., Siewers, V., Chen, Y., & Nielsen, J. (2015). Microbial acetyl-CoA metabolism and metabolic engineering. *MBE.*, 28, 28–42.
- [8] Kulkarni, R. (2016). Metabolic Engineering: Biological Art of Producing Useful Chemicals. *Reson.*, 21 (3), 233-237.
- [9] Chen Y., Siewers, V., & Nielsen, J. (2012) Profiling of cytosolic and peroxisomal acetyl CoA metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* ., 7(8).



- [10] Gibson, D. G., Glass, J. I., Lartigue, C., Noskov, V. N., Chuang, R. Y., Algire, M. A., Benders, G. A., Montague, M. G., Ma, L., Moodie, M. M., Merryman, C., Vashee, S., Krishnakumar, R., Assad-Garcia, N., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E. A., Young, L., Qi, Z. Q., Segall-Shapiro, T. H., Venter, J. C. (2010). Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome. *Sci.*, 329(5987), 52–56.
- [11] Stephanopoulos, G., Aristidou, A. A., Nielsen, J. (1998). *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*. AP., (1).
- [12] Bailey, J. E. (1991). Toward a science of metabolic engineering. *Sci.*, 252, 1668–1675.
- [13] Woolston, B. M., Edgar, S., Stephanopoulos, G. (2013). *Metabolic Engineering: Past and Future*. *Annu Rev Chem Biomol Eng.*, 4(1), 259–288.
- [14] Nakamura, E., Whited, M. (2003). Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14(5), 454–459.
- [15] Li, T., Chen, X., Cai, Y., Dai, J. (2018). Artificial Protein Scaffold System (AProSS): An efficient method to optimize exogenous metabolic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *MBE.*, 49, 13–20.
- [16] Pickens, B., Tang, Y., Chooi, H. (2011). Metabolic Engineering for the Production of Natural Products. *Annu Rev Chem Biomol Eng.*, 2(1), 211–236.
- [17] Ercan, O. (2008). *Investigation of Growth Physiology and Metabolism of Mutant Yeasts Obtained by Metabolic Engineering*. Yayınlanmamış yüksek lisans tezi. Yayın yeri : İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [18] Pray, L., Relman, D. A., & Choffnes, E. R. (2011). The Science and Applications of Synthetic and Systems Biology. *National Academies Press.*, A1-A13.
- [19] Yadav, V. G., de Mey, M., Giaw Lim, C., Kumaran Ajikumar, P., Stephanopoulos, G. (2012). The future of metabolic engineering and synthetic biology: Towards a systematic practice. *MBE.*, 14(3), 233–241.

- [20] Xie, W., Lv, X., Ye, L., Zhou, P., Yu, H. (2015). Construction of lycopene-overproducing *Saccharomyces cerevisiae* by combining directed evolution and metabolic engineering. *MBE.*, 30, 69–78.
- [21] Croteau, R., Ketchum, B., Long, M., Kaspera, R., Wildung, R. (2006). Taxol Biosynthesis and Molecular Genetics. *Phytochem Rev.*, 5(1), 75–97.
- [22] Paddon, J., Westfall, J., Pitera, J., Benjamin, K., Fisher, K., McPhee, D., Newman, D. (2013). High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 496, 528.
- [23] Rodriguez, S., Denby, C. M., van Vu, T., Baidoo, E. E. K., Wang, G., & Keasling, J. D. (2016). ATP citrate lyase mediated cytosolic acetyl-CoA biosynthesis increases mevalonate production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Factories.*, 15(1).
- [24] Kocharin, K., Chen Y., Siewers, V., Nielsen, J. (2012) Engineering of acetyl-CoA metabolism for the improved production of polyhydroxybutyrate in *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express*, 2(1), 52.
- [25] Chen, Y., Daviet, L., Schalk, M., Siewers, V., Nielsen, J. (2013) Establishing a platform cell factory through engineering of yeast acetyl-CoA metabolism. *MBE.*, 15(1) 48-54.
- [26] Krivoruchko, A., Serrano-Amatriain, C., Chen, Y., Siewers, V., & Nielsen, J. (2013) Improving biobutanol production in engineered *Saccharomyces cerevisiae* by manipulation of acetyl-CoA metabolism. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol. J IND MICROBIOL BIOT.*, 40 (9) 1051-1056
- [27] Song, Y., Park, J. S., Kang, C.D., Cho, H. Y., Yang, D., Lee, S., & Cho, K. M (2016). Introduction of a bacterial acetyl-CoA synthesis pathway improves lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *MBE.*, 35, 38-45
- [28] Nielsen, J. (2014). Synthetic Biology for Engineering Acetyl Coenzyme A Metabolism in Yeast. *mBio*, 5(6).

- [29] Piskur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico A, Compagno, C. (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends Genet.*, 22(4):183-6
- [30] Chen, Y., Xiao, W., Wang, Y., Liu, H., Li, X., & Yuan, Y. (2016). Lycopene overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* through combining pathway engineering with host engineering. *Microb. Cell Factories.*, 15(113).
- [31] Tang, X., Feng, H., & Chen, W. N. (2013). Metabolic engineering for enhanced fatty acids synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *MBE.*, 16, 95–102.
- [32] Becker, D. M., Guarente, L. (1991). Methods in Enzymology (High-efficiency transformation of yeast by electroporation). 194, 182–187.
- [33] Thompson, J. R., Register, E., Curotto, J., Kurtz, M., & Kelly, R. (1998). An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation. *Yeast*, 14(6), 565–571.
- [34] Gietz, R. D. (2014). Yeast Transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG *Methods mol. biol.*, 1–12.
- [35] López, J., Essus, K., Kim, I. K., Pereira, R., Herzog, J., Siewers, V., Nielsen, J., & Agosin, E. (2015). Production of  $\beta$ -ionone by combined expression of carotenogenic and plant CCD1 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Factories.*, 14(1).
- [36] Chen, Y., Wang, Y., Liu, M., Qu, J., Yao, M., Li, B., Ding, M., Liu, H., Xiao, W., & Yuan, Y. (2019). Primary and Secondary Metabolic Effects of a Key Gene Deletion ( $\Delta$  YPL062W ) in Metabolically Engineered Terpenoid-Producing *Saccharomyces cerevisiae*. *AEM.*, 85(7).

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : İpek Kısacık Alkotb

Yabancı Dil : İngilizce

Doğum yeri ve yılı : Eskişehir- 19.12.1994

### Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

2017, Anadolu Üniversitesi, Biyoloji

2020, Biyoloji Öğretmeni, Özel Emniyet Badem Etüt Eğitim Merkezi

### Yayımları ve/veya Bilimsel/Sanatsal Faaliyetleri:

Yurттаş L., Kubilay A., Evren A.E., Karaca H., Kısacık İ. (2020), Synthesis of some novel 3,4,5-trisubstituted triazole derivatives bearing quinoline ring and evaluation of their antimicrobial activity, Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 195-9, 767-773