

**BİR HÜCRE FABRİKASI OLARAK
SACCHAROMYCES CEREVISIAE'DA
METABOLİZMA MÜHENDİSLİĞİ
STRATEJİLERİ KULLANARAK
TAKSOL ÜRETİMİ**

Yüksek Lisans Tezi

Özlem MORÇAL

Eskişehir 2019

**BİR HÜCRE FABRİKASI OLARAK *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*'DA
METABOLİZMA MÜHENDİSLİĞİ STRATEJİLERİ KULLANARAK TAKSOL
ÜRETİMİ**

Özlem MORÇAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilimdalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hülya KARACA GENÇER

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mayıs 2019**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Özlem MORÇAL'ın “Bir Hücre Fabrikası Olarak *Saccharomyces Cerevisiae*'da Metabolizma Mühendisliği Stratejileri Kullanarak Taksol Üretimi” başlıklı tezi 31/05/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Dr. Öğr. Üyesi Hülya KARACA GENÇER	
Üye	: Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU	
Üye	: Doç. Dr. Erol ŞENER	

Prof. Dr.
Nalan GÜNDOĞDU-KARABURUN
Enstitü Müdürü



ÖZET

BİR HÜCRE FABRİKASI OLARAK *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*'DA METABOLİZMA MÜHENDİSLİĞİ STRATEJİLERİ KULLANARAK TAKSOL ÜRETİMİ

Özlem MORÇAL

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mayıs 2019

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hülya KARACA GENÇER

İzoprenoidler doğada birçok yerde bulunmaktadır ve temel hücre bileşenlerinden ikincil metabolitlere kadar çeşitlilik göstermektedir. Terpenoidler (izoprenoidler) gibi doğal ürünler genellikle orijinal kaynaklarından özütlenerek elde edilmektedir, çünkü çoğu zaman birden fazla kiral merkez içeren bu kadar karmaşık yapıların ticari sentezi çok zordur ve ekonomik değildir. İzoprenoid biyosentetik yolu, metabolizma mühendisliği açısından çok dikkat çekmektedir ve bu yollar üzerinde metabolik akışı arttırmada önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. İyi bilinen bir izoprenoid olarak taksol çeşitli kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan güçlü bir antikanser ilaçtır. Taksolün orijinal kaynağı *T. brevifolia*'dır fakat bu ağacın kabuklarından elde edilen miktar oldukça düşüktür.

Bu çalışmada metabolizma mühendisliği stratejileri kullanarak bir model organizma olan *S. cerevisiae*'da taksol öncülerinin miktarının artırılması hedeflenmiştir. Taksol öncüleri *S. cerevisiae*'da mevalonat yolağından üretilmektedir ve mevalonat yolağı sitozolde bulunan asetil-KoA yolağı ile beslenmektedir. Dolayısıyla akışı asetil-KoA'ya yönlendirebilmek için indüklenebilen bir promotor olan *pHXT7* 'yi kullanarak farklı mutant suşlarda *ADH2* geninin akışı kontrollü bir şekilde artırılarak yolak taksadiene doğru yönlendirilmiştir. Taksadien miktarlarındaki değişim GC-MS ile analiz edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Saccharomyces cerevisiae*, metabolizma mühendisliği, asetil-KoA, taksol, *pHXT7*

ABSTRACT

TAXOL PRODUCTION BY USING METABOLISM ENGINEERING STRATEGIES IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* AS A CELL FACTORY

Özlem MORÇAL

Department of Pharmaceutical Microbiology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, May 2019

Supervisor: Dr. Lecturer Hülya KARACA GENÇER

Isoprenoids are found in many places in nature and range from basic cell components to secondary metabolites. Natural products such as terpenoids (isoprenoids) are usually obtained by extracting from their original sources, because the commercial synthesis of such complex structures, which often involve more than one chiral center, is very difficult and uneconomical. The isoprenoid biosynthetic pathway has attracted much attention in terms of metabolism engineering and significant progress has been made in increasing the metabolic flow on these pathways. A good blinen isoprenoid, taxol is a potent anticancer drug widely used in the treatment of various cancers. The original source of taxol is *Taxus brevifolia* and the amount obtained from the bark of this tree is quite low.

In this study, I tried to increase the amount of taxol pioneers in *Saccharomyces cerevisiae* by using a model organism via metabolism engineering strategies. Taxol precursors are produced in the mevalonate pathway and the mevalonate pathway is fed by acetyl-CoA pathway in the cytosol. Therefore, by changing the *pHXT7*, which is an inducible promoter to direct the flow to acetyl-CoA, we have examined the change in the different mutant strains by changing GC-MS analysis.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, metabolic engineering, acetyl-CoA, *pHXT7*, taxol

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini ve tecrübelerini bizlerle paylaşan sayın danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Hülya KARACA GENÇER'e teşekkürlerimi sunarım.

31/05/2019

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.

Özlem MORGAL

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Metabolizma Mühendisliği.....	1
1.1.1 Genetik mühendisliğinden metabolizma mühendisliğine	1
1.1.2. Metabolizma mühendisliği için genel stratejiler.....	2
1.1.3. Sistem biyolojisi ve metabolizma mühendisliği arasındaki ilişki.....	6
1.2. <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	8
1.2.1. <i>S. cerevisiae</i> genom organizasyonu	10
1.2.2. Bir hücre fabrikası olarak <i>S. cerevisiae</i> ve endüstriyel biyoteknoloji.....	11
1.2.3. <i>S. cerevisiae</i> ' de taksol üretimi için asetil-KoA miktarının arttırılması	13
1.2.3.1. <i>S. cerevisiae</i> 'de asetil-KoA metabolizmasına genel bir bakış ..	13
1.2.3.2. Endüstriyel ürünlerin üretimi için asetil-KoA miktarının arttırılmasının önemi	15
1.3. İzoprenoidlerin Üretimi.....	17
1.3.1. İzoprenoidlerin biyosentezi	19
1.3.1.1. MVA yolağı	19
1.4. Taksol (Paklitaksel).....	21
1.4.1. Paklitaksel'in (Taksolün) biyosentezi	23

2. MATERYAL	26
2.1. Çalışmada Kullanılan Mayalar.....	26
2.2. Maya Kültür Besiyerleri.....	27
2.3.Kullanılan Kitler	28
2.4. Laboratuvar Ekipmanı.....	29
3. METOD	30
3.1. Rekombinant Kasetleri Oluşturan İnsert Parçalarının PCR ile Üretimi....	30
3.2. Üretilen Parçaların Saflaştırılması & Agaroza Jel Analizi.....	33
3.3. Elde Edilen İnsert Parçaların Asetil-KoA Yolağı İntegratif Kasetini Oluşturmak Üzere Birleştirilmesi.....	33
3.4. İntegratif Kasetinin Saflaştırılması	35
3.5. Maya Hücrelerinin Kompetent Hale Getirilmesi ve Transformasyon Aşamaları.....	35
3.5.1. Maya hücrelerinin kompetant hale getirilmesi.....	35
3.5.2.Transformasyon aşamaları.....	36
3.6. Koloni PCR.....	36
3.6.1. Koloni PCR reaksiyonu için primerlerin tasarımı	37
3.6.2.Genomik DNA'nın preparasyonu	37
3.6.3. Koloni PCR reaksiyonu	38
3.7. Rekombinant Kasetin Sekans Analizi	38
3.8. Markır Genlerin 5-FOA Besiyeri ile Uzaklaştırılması	38
3.9. Taksadien Üretimi İçin Epizomal Plazmitin Transformasyonu.....	39
3.10. GC-MS Analizleri İçin Örnek Toplanması.....	39
3.11. GC-MS Analiz Şartları.....	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. İnsert Parçaların ve Asetil-KoA Yolağı İntegratif Kasetinin PCR Döngüsü Sonucunda Agoroza Jelden Elde Edilen Görüntüleri	41
4.2. Koloni PCR Döngüsü Sonucunda İntegratif Kasetin Agoroza jelden Elde Edilen Görüntüsü	41
4.3. URA3 Geninin 5-FOA Besiyeri ile Uzaklaştırıldıktan Sonra Agoroza Jeldeki Bulguları	42
4.4. Epizomal Plazmitlere Ait Koloni PCR Döngüsü Sonucu Jel Görüntüleri ..	43
4.5. GC-MS Analiz Sonuçları.....	43
5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	45
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Metabolizma mühendisliğinin bütünsel görünümü.....	2
Şekil 1.2. Mikroorganizmaların metabolizma mühendisliği için genel stratejiler.....	5
Şekil 1.3. Metabolizma mühendisliği ve sistem biyolojisinin kombinasyon.....	7
Şekil 1.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nin yaşam döngüsü.....	9
Şekil 1.5. <i>S. cerevisiae</i> kromozomu III'ün bir eşleşme tipi anahtarlama olayının ardından gerçekleştirdiği değişikliğin basitleştirilmiş görüntüsü.....	9
Şekil 1.6. <i>S. cerevisiae</i> 'deki asetil-KoA metabolizmasına genel bakış.....	14
Şekil 1.7. <i>S. cerevisiae</i> 'deki asetil-KoA metabolizmasına basitleştirilmiş bakış.....	15
Şekil 1.8. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'de izoprenoidlerin üretimi.....	20
Şekil 1.9. Taksolün (paklitaksel) yapısı.....	23
Şekil 1.10. Taksolün biyosentezi.....	25
Şekil 4.1. İnsert parçaların ve İntegratif Kasetin PCR döngüsü sonucu Agoroz Jeldeki görüntüsünün Marker bantlar ile karşılaştırılması.....	41
Şekil 4.2. <i>MVAo</i> , <i>SCIG22ao</i> ve <i>SCIG22axo</i> suşlarına ait koloni PCR döngüsü sonuçlarının jel görüntüleri	42
Şekil 4.3. <i>MVAo</i> , <i>SCIG22ao</i> ve <i>SCIG22axo</i> suşlarının sırayla 5-FOA besiyerinden sonra jel görüntüleri	42
Şekil 4.4. <i>MVAo</i> , <i>SCI22ao</i> ve <i>SCI22aox</i> suşlarında epizomal plazmitin varlığının <i>ERG20</i> geni ile teyiti.....	43
Şekil 4.5. Mutant suşların GC-MS analiz sonuçları.....	44

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2. 1. Bu çalışmada kullanılan maya suşları ve plazmitler.....	26
Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan laboratuvar ekipmanı.....	29
Tablo 3.1. İnsert fragmentlerin ve rekombinant kasetin amplifikasyonu için kullanılan gen spesifik primer çiftleri.....	30
Tablo 3.2. PCR döngüsü için gerekli olan rekombinant dizileri oluşturan insertler, büyüklükleri, kaynak vektörler ve insert spesifik tasarlanan primer çiftlerinin isimleri.....	31
Tablo 3.3. İnsert parçaların amplifikasyonu için kullanılan genel reaksiyon karışımı....	32
Tablo 3.4. İnsert parçaların amplifikasyonu için PCR döngüsü şartları.....	32
Tablo 3.5. İlk füzyon reaksiyonu için PCR şartları.....	34
Tablo 3.6. Füzyon reaksiyonu için entegre edilecek insert parçaların sıralı konumlarına göre katsayıları.....	34
Tablo 3.7. İkinci füzyon için PCR döngüsü şartları.....	35
Tablo 3.8. Koloni PCR döngüsünde kullanılan primerler.....	37

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

∞	: sonsuz
ACS	: Acetyl-CoA Citrate Synthase (Asetil-KoA Sitrat Sentetaz)
ADH	: Alcohol Dehydrogenase (Alkol Dehidrojenaz)
AMP	: Adenosine Monophosphate (Adenozin monofosfat)
Asetil-KoA	: Acetyl-CoA (Asetil Koenzim A)
cP450	: Cytochrome P450 (Sitokrom P450)
CS	: Citrate Synthase (Sitrat Sentaz)
DBAT	: 10-deacetylbaicatin III-10-O-acetyltransferse (10-deasetilbaicatin III-10-O-asetiltransfer)
DMAPP	: Dimethylallyl Diphosphate (Dimetilasilik Difosfat)
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
FAEE's	: Fatty Acid Ethyl Esters (Yağ Asidi Etil Esterleri)
FDA	: U.S. Food and Drug Administration (ABD Gıda ve İlaç İdaresi)
GC-MS	: Gas Chromatography Mass Spectrometry (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi)
GGPP	: Geranyl Geranyl Diphosphate (Geranylgeranyl Diphosphate)
GRAS	: Generally Recognized As Safe (Genellikle Güvenli Olarak Kabul Edilir)
IPP	: Isoprenyl Diphosphate (İzoprenil Difosfat)

MEP	: Methylerythritol Phosphate (Metileritritol Fosfat)
MVA	: Mevalonic (Mevalonat)
NAD	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide
OD	: Optik Density (Optik Yoğunluk)
ORF	: Open Reading Frame (Açık Okuma Çerçevesi)
PCR	: (Polimeraze Chain Reaction) Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDH	: Pyruvate Dehydrogenase (Piruvat dehidrogenaz)
PHB	: Polyhydroxybutyrate (Polihidroksibütirat)
PPi	: Pyrophosphate (Pirofosfat)
RNA	: Ribo Nükleik Asit
rRNA	: Ribosomal RNA
SDA-URA	: Synthetic Defined Agar
SGD	: <i>Saccharomyces</i> Genome Database
T10 β H	: Taxoid-10 β -hydroxylase (taksoid-10 β - hidroksilaz)
T13aH	: Taxadiene-13 α -hydroxylas (Taksadien-5a-13a-diol hidroksilaz)
T5aH	: Taxadiene-5 α -hydroxylase (Taksadien-5a-hidroksilaz)
TASY	: Taxadiene Synthethase (Taksadien sentaz)
TCA	: Tricarboxylic Acid Cycle (Trikarboksilik Asit Döngüsü)
TDAT	: Taxadiene-5 α -ol-O-acetyl Transferase (Taksadien-5a-ol-O-asetil Transferaz)
tRNA	: Transfer RNA

YPD : Yeast Extract-Peptone-Dextrose Agar

1. GİRİŞ

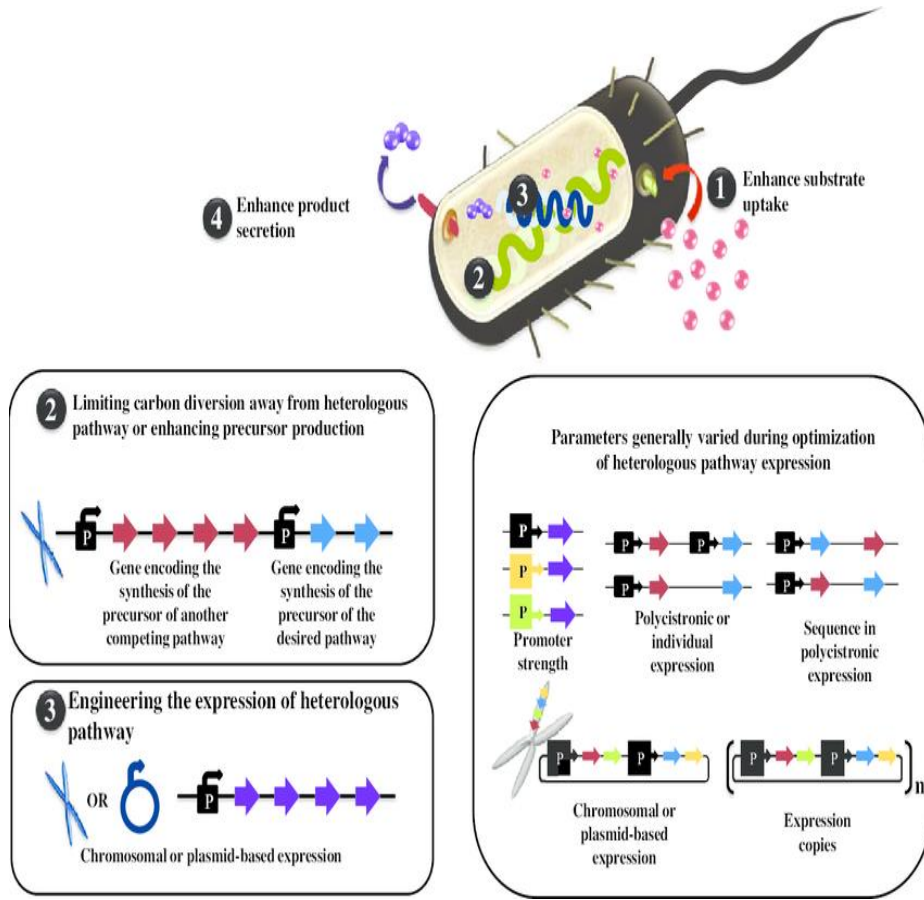
1.1. Metabolizma Mühendisliği

1.1.1 Genetik mühendisliğinden metabolizma mühendisliğine

1980'lerde ve özellikle 1990'larda birçok araştırma grubu, rekombinant DNA teknolojisinin prensiplerini benimsemişlerdir ve bu teknolojiyi kullanarak endüstriyel işlemler için rekombinant proteinler ve küçük moleküllü kimyasallar üretebilen hücreler, özellikle mikroorganizmalar geliştirmişlerdir (Steensels vd.,2012; Lee vd., 2019). Bu deneyler, ilgilenilen ürünü üretmekte doğrudan rol oynayan genleri manipüle etmeyi amaçlayan tek genlere ve enzimlere odaklanmıştır (Steensels vd.,2012). Bu yaklaşım daha geniş bir bağlamda kullanılmasına rağmen, çoğunlukla “genetik mühendisliği” olarak adlandırılmıştır. 1991'de iki makale (Bailey, 1991; Stephanopoulos ve Vallino, 1991), “metabolizma mühendisliği” olarak adlandırılan, çoklu genlerin hedef alındığı, genetik modifikasyonun sistematik bir yaklaşımını ortaya koymuştur. Bu teknik, çeşitli ürünlerin sentezini optimize etmek veya kurmak için metabolik yolların yönlendirilmiş modifikasyonunu ve / veya düzenlemelerini kullanmaktadır (Steensels vd., 2012).

Metabolizma mühendisliği, metabolik ve hücrel sistemi bir bütün olarak ele almaktadır. Metabolizma mühendisliğinin basit genetik mühendisliğinden farkı, genel biyolojik (overall bioprocess) işleyişin etkinliği dikkate alınarak sistemin manipülasyonuna izin vermesidir. Ayrıca, metabolizma mühendisliği, basit genetik mühendislik veya rastgele mutagenез ile karşılaştırıldığında, hücrenin tanımlanmasına izin verdiği için, hücrenin gereksiz değişikliklerinden kaçınılması ve gerektiğinde daha fazla mühendislik yapılmasına fırsat vermesi nedeniyle, birçok açıdan avantajlıdır (Lee vd., 2019).

Metabolizma mühendisliği, bir organizmada bulunan metabolik yolların hedefe yönelik ve amaçlı olarak değiştirilmesini içermektedir. Kısaca, ikincil metabolitlerin fazla üretilmesi için hücrel metabolizmaya müdahaleler, aşağıdaki seviyelerin birinde veya birçoğunda meydana gelebilir: **(1)** substrat alım hızında artış, **(2)** metabolik yollarda istenmeyen yan ürün oluşumunun eliminasyonu ve prekürsör ve/veya kofaktör akışının artırılması, **(3)** heterolog yolun aktarılması ve bileşen enzimlerinin aktivitesinin optimizasyonu ve **(4)** dengeyi ürün oluşumuna doğru kaydırmak için ürünün hücre dışı ortama verilmesi (Şekil 1.1) (Yaday vd., 2012).



Şekil 1.1. Metabolizma mühendisliğinin bütünsel görünümü (Yaday vd., 2012).

1.1.2. Metabolizma mühendisliği için genel stratejiler

Mikroorganizmalardaki metabolizma mühendisliği, doğal kaynaklarından elde edilmesi zor olan ve kimyasal sentezle üretilmeyecek kadar pahalı veya karmaşık büyük miktarlarda değerli metabolitlerin üretilmesi için fırsatlar sunmaktadır (Engels vd., 2008).

Bitkiler, tıbbi amaç için kullanılabilecek çok çeşitli sekonder metabolitler üretebilirler; örneğin, paklitaksel *Taxus spp.*'nin kabuğunda bulunan önemli bir antikanser ilaçtır. Bununla birlikte, bileşik sadece bitki içinde % 0,05 bulunduğu için tedarik edilmesi zordur. Kompleks paklitaksel biyosentetik yolu, kimyasal sentezi ticari olarak elde edilmez kılmaktadır; bu nedenle, metabolizma mühendisliği stratejileri ile üretim için alternatif kaynaklar oluşturulmaya çalışılmıştır (Howat vd., 2014). Sekonder metabolitlerin metabolizma mühendisliği ile üretilmesinde belirli stratejiler geliştirilerek, bir özelliği optimize etmeyi hedeflerken, dikkat edilmesi gereken birkaç önemli husus şu şekilde ifade edilmiştir (Şekil 1.2.).

İlk olarak; **uygun konakçı**, ilgilenilen metabolitin üretildiği minyatür kimyasal bir fabrika olarak görülmektedir ve bu nedenle göz önünde bulundurulması gereken en önemli faktörlerden biri konakçının seçimidir. Uygun bir konakçı seçilirken önemli kriterlerden biri, istenen metabolik dönüşümleri gerçekleştirmek için konakçı suşunun kapasitesinin incelenmesidir; farklı mikroorganizmalar farklı metabolik yeteneklere sahiptir (Lee vd., 2009). *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi model mikroorganizmalar, çeşitli ürünlerin biyobazlı üretimi için en yaygın kullanılan organizmalardır (Choi vd., 2019). Bununla birlikte, bazı kimyasallar, aseton ve bütanol için *Clostridium sp.*, ve *Saccharopolyspora erythraea*, polietilen kimyasallarının üretimi için *Streptomyces fradiae* doğal olarak daha iyi konakçı mikroorganizmalar olarak bildirilmiştir (Choi vd., 2019; Lee vd., 2009). Alternatif olarak, arzu edilen bir ürünü üretme kabiliyetine sahip olmayan ancak daha iyi gen manipülasyon sistemine sahip başka bir konakçı mikroorganizma seçilebilmektedir. Ekspirasyon vektörleri, transformasyon protokolü ve kromozomal gen susturma/integrasyon sistemi gibi genetik mühendisliği araçlarının mevcudiyeti, bu araçların metabolizma mühendisliği için gerekli olması nedeniyle dikkate alınmaktadır (Lee vd., 2009).

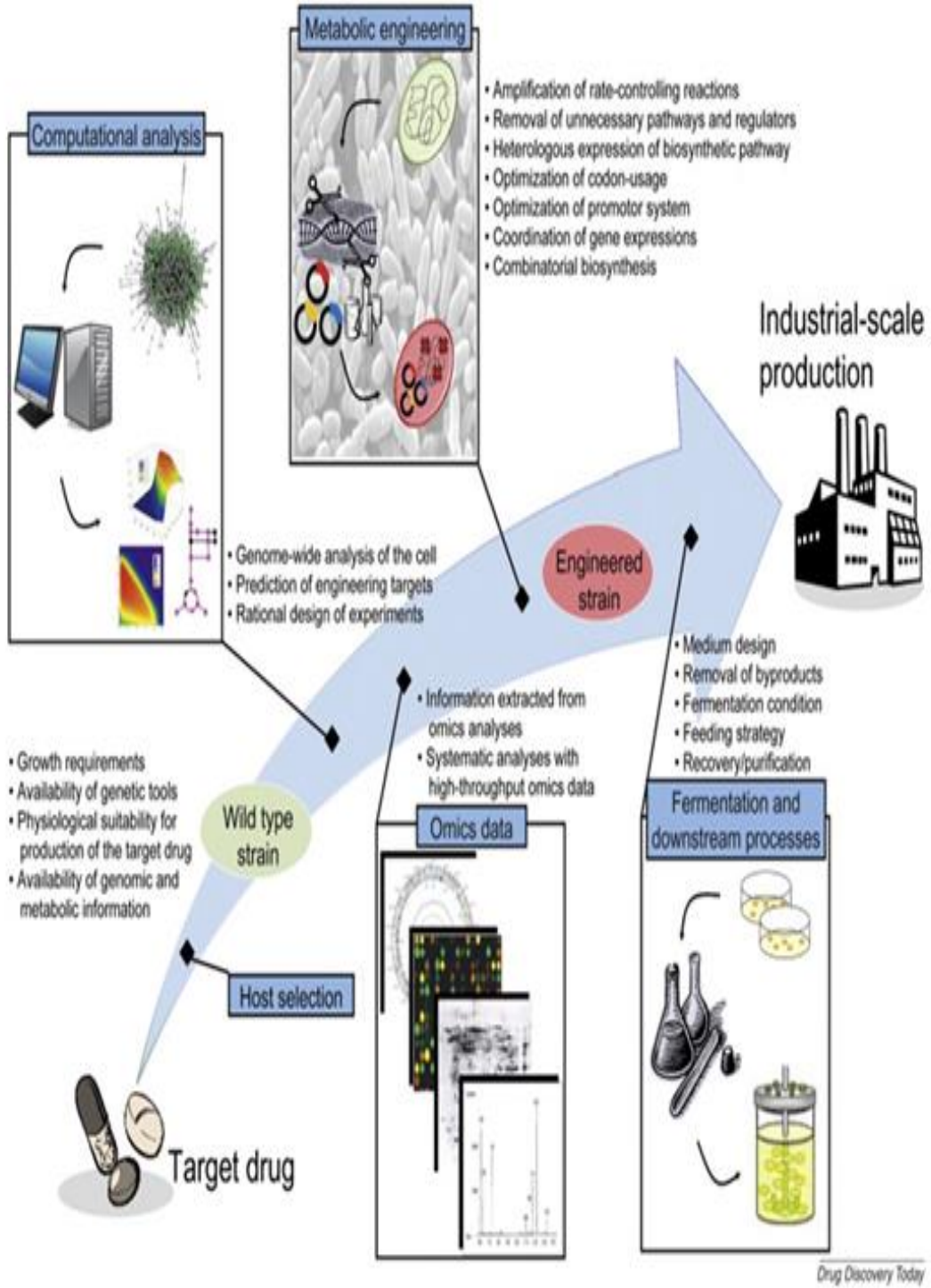
İkinci olarak uygun bir konakçı suş belirlendikten sonra **metabolizma mühendisliği stratejileri** geliştirilmektedir. Bu süreç, genlerin ifadelerinin artırılması ve susturulması, yeni metabolik yolların oluşturulması, arzu edilen ürüne doğru metabolik akışın artırılması, istenmeyen metabolik akışların azaltılması veya kapatılması, metabolik akışın dengelenmesi olup bunların tümü optimum ürün oluşumu için bir dizi gen manipülasyonlarını içeren stratejilerdir (Lee vd., 2009; Steensels vd., 2012). Bununla birlikte, metabolik akışın yeniden dağıtımını kontrol eden karmaşık düzenleyici mekanizmalar bulunmaktadır. Bu sistemler ile, hücresel sistemi bir bütün olarak analiz ederek hücresel ve metabolik ağlar oluşturulması hedeflenmektedir (Lee vd., 2009).

Bilgisayarlı modelleme ve siliko simülasyonları bu bağlamda güçlü araçlardır, çünkü bunlar araştırmaya ve bakteriyel metabolik devrelerin daha derinlemesine anlaşılmasına izin vermektedir (Fondi and Liòn, 2015).

Üçüncüsü, bileşiklerin mikrobiyal sentezi, konaklarda **heterolog metabolik yolların** oluşturulmasına veya eklenmesine bağlıdır. Heterolog genlerin yüksek ekspresyon seviyeleri hücre üzerinde önemli derecede metabolik yük oluşturabileceğinden her zaman arzu edilmemektedir (Steensels vd., 2014). Bu nedenle,

hedeflenmiş genlerin hem promotor hem de terminatörlerinin optimizasyonu çok önemlidir. Metabolik yoldaki genlerin ekspresyon seviyelerinin, yol içindeki metabolik akışı dengelemek için optimize edilmesi gerekmektedir (Yuan vd., 2013).

Dördüncüsü, metabolik akışın iyileştirilmesi transkripsiyon seviyesindeki düzenleme dışında, **protein seviyeleri translasyon verimliliğine de bağlıdır**, bu da kodon kullanımından oldukça etkilenmektedir. Heterolog genlerin kodon optimizasyonu, protein seviyelerini önemli ölçüde arttırabilir. Endojen genlerin ekspresyonunda kodon optimizasyonu ile arttırılabileceği bildirilmiştir (Steensels vd., 2014).



Şekil 1.2. Mikroorganizmaların metabolizma mühendisliği için genel stratejiler (Lee vd., 2009).

1.1.3. Sistem biyolojisi ve metabolizma mühendisliği arasındaki ilişki

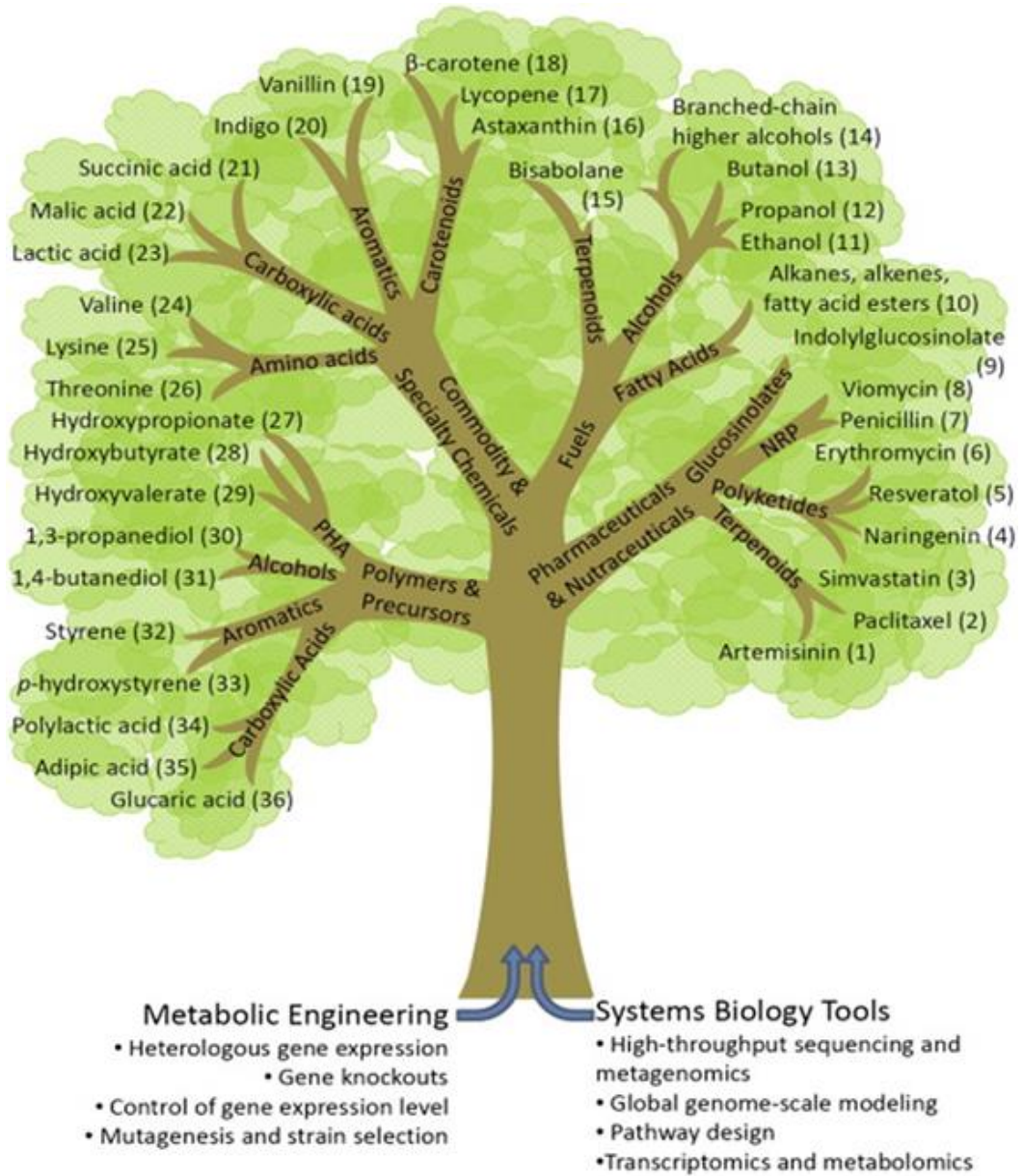
Fosil kaynakların kullanımından kaynaklanan şiddetli çevresel problemler nedeniyle biyo-bazlı bileşik üretmek için sürdürülebilir süreçlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Metabolizma mühendisliği, bu bileşikleri yenilenebilir kaynaklardan üretmek için yüksek verimli hücre fabrikalarının geliştirilmesini kolaylaştırmaktadır. Sistem biyolojisinin amacı, canlı hücrelerin kapsamlı ve kantitatif bir şekilde anlaşılmasını sağlamak ve böylece hücresel davranışı karakterize ederek ve ön görerek metabolizma mühendisliğini beslemektir. Endüstriyel mikroorganizmaların sistem biyolojisi bu nedenle metabolizma mühendislik için değerlidir ve metabolizma mühendisliği hedeflerinin belirlenmesi için sistem biyoloji araçlarının kullanılması önemlidir (Şekil 1.3.) (Dai and Nielsen, 2015).

Sistem biyolojisi, global (bütünsel) düzeyde hücrelerin anlaşılması ve modellenmesi amacıyla hücresel veri setlerinin birleştirilmesi ve sentezlenmesi ile ilgili bir çalışma alanıdır. Metabolizma mühendisliği hedefleriyle birleştirildiğinde, sistem metabolizma mühendisliği alanı hücresel sistemleri anlama ve iyileştirme potansiyeli ile ortaya çıkmaktadır. Yüksek verimli sekanslama, proteomik, transkriptomik, metabolomik ve tek hücre analitiği gibi fonksiyonel genomik araçların ortaya çıkışı, tüm hücresel peyzajın en ince detaylarda çözülmesini sağlamaktadır ve bu da inanılmaz bir veri zenginliği sağlamaktadır (Curran ve Alper, 2012).

Sistem metabolizma mühendisliği araştırmasının en önemli etkilerinden biri, genom-ölçekli metabolizma modellerinin ortaya çıkması olmuştur. Genomik sekanslamanın mevcudiyeti sistem biyolojisi için bir katalizör görevi görmektedir. Aslında, genom ölçekli modeller, hemen hemen endüstriyel olarak ilgili tüm organizmalar için mevcuttur ancak, *E. coli* ve *S. cerevisiae* gibi yüksek oranda kullanılan organizmalar için modellerde önemli incelik gösterilmektedir. Bu modeller (çoğunlukla doğada stokiyometrik iken), hücrede meydana gelen tüm reaksiyonları hesaba katmakta ve özellikle genetik değişikliklere cevap olarak metabolik akışı tahmin etmek için optimizasyon teknikleriyle birleştirilebilmektedir (Curran ve Alper, 2012).

Sistem biyolojisi, biyolojik sistem fenotipinin altında yatan moleküler mekanizmaları çözmeyi ve yüksek verimlilik teknolojilerinin ve hesaplama yöntemlerinin kombinasyonu ile hücresel davranışı öngörmeyi amaçlamaktadır. Mikroorganizmanın ayrıntılı bilgileri, özellikle omik teknolojilerinin kullanımı ve matematiksel modelleme yoluyla sistem biyolojisinin gelişimi nedeniyle yavaş yavaş

çözülmemektedir. Sistem biyolojisi, metabolizma mühendisliğini sistematik ve global bir şekilde kolaylaştırabilir ve mühendislik sürecini daha verimli bir şekilde hızlandırabilir (Dai ve Nielsen, 2015).



Şekil 1.3. Metabolizma mühendisliği ve sistem biyolojisinin kombinasyonu, mikrobiyal hücre fabrikalarında sentezlenebilecek veya kısmen sentezlenebilecek kimyasal ürün sayısını büyük ölçüde genişletmiştir. Ağaç, bu gibi kimyasalların birkaç temsili örneğini göstermektedir (Curran ve Alper, 2012).

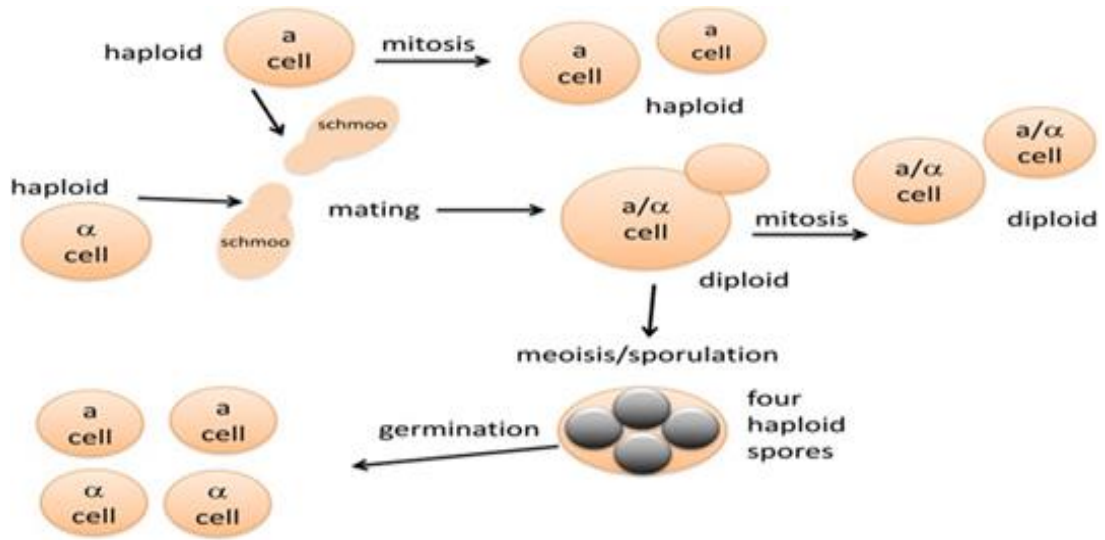
1.2. *Saccharomyces Cerevisiae*

Bir model organizma olan *S. cerevisiae* genellikle ekmek mayası veya bira mayası olarak bilinmektedir. Aslında, *S. cerevisiae* bilimsel adı bira için eski dünya terminolojisinden türemiştir. *S. cerevisiae*, bir mantar veya küf olarak sınıflandırılmaktadır. *S. cerevisiae*, tek hücreli bir ökaryottur ve bu nedenle, bir çekirdek, endomembran sistemi ve mitokondri gibi zarla çevrili organelleri bulunmaktadır. Maya hücreleri, optimal laboratuvar koşullarında her 90 dakikada bir, daha küçük hücrelerin ana hücreden çimdiklediği veya tomurcuklandığı bir tomurcuklanma işlemi yoluyla bölünmektedir. "Tomurcuklanan maya" ismi, hücre bölünmesinin bu önemli özelliğinden kaynaklanmaktadır (Duina vd., 2014). *S. cerevisiae*, haploit ve diploit olmak üzere iki formda bulunabilmektedir. Diploit hücreler her kromozomun iki kopyasına sahipken, haploit hücreler her kromozomdan bir kopya içermektedirler. *S. cerevisiae*'nin hücreleri daima haploit (vejetatif) durumda bulunabilirler (16 kromozomlu). Fakat seyrek olarak iki haploit maya hücresi birleşebilir ve diploit bir hücre (32 kromozomlu) ortaya çıkabilmektedir (Madıgan., MT. ve Martinko, 2014).

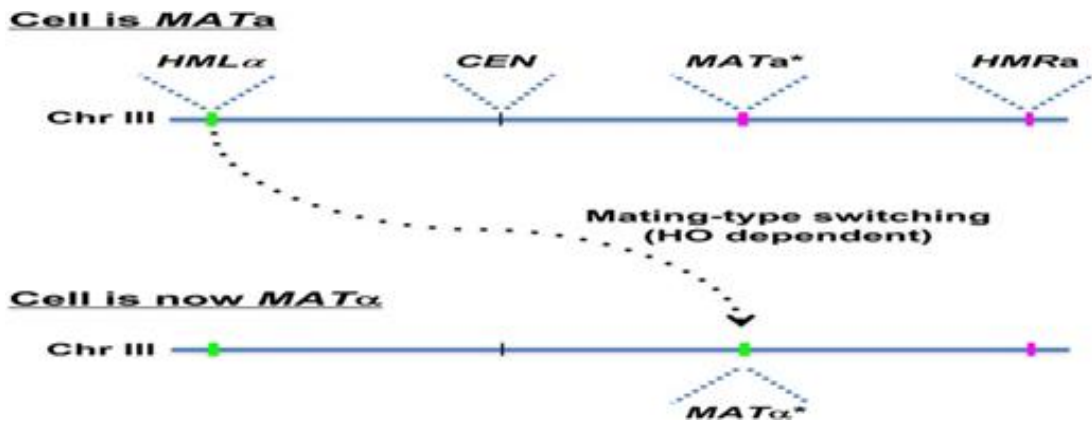
Besin bakımından zengin durumlarda hem haploid hem de diploid hücreler tomurcuklanarak aseksüel olarak çoğalabilmektedir. Bazı besin bakımından zayıf koşullara maruz kaldığında, diploidler sporülasyona girebilmektedir bu da spor oluşumuna neden olmaktadır. Sporulasyon diploid bir hücrenin dört haploid spora dönüştürülmesiyle sonuçlanmaktadır ve şartlar düzeldiğinde haploid hücreler çimlenebilmektedir (Steensels vd., 2014). Haploit *S. cerevisiae* hücrelerinde, hücre başına 16 kromozom sağlamak için her hücre bölünmesinden önce mitoz bölünme gerçekleşmektedir (Şekil 1.4.).

S. cerevisiae a ve a eşleşme tipleri olarak adlandırılan iki farklı hücre formuna sahiptir. Bir hücrenin a ve a olması genetik olarak belirlenmektedir ve a tipi hücreler sadece a tipi hücrelerle eşleşmektedirler (Şekil 1.4.). *S. cerevisiae*'nin bazı haploit suşları a veya a olarak kalırken, diğer suşlar bir eşleşme tipinden ötekine geçebilmektedir. Şekil 1.5.'de gösterilen olayda eşleşme tipindeki bu değişimin sebebi bir genin eklenmesinden (insert) kaynaklanmaktadır. *S. cerevisiae*'nin kromozomlarının birinin üzerinde MAT lokusu bulunmaktadır. Bu bölgeye a veya a geni insert olmaktadır. Hangi gen bu lokusta bulunuyorsa MAT promotörü onun transkripsiyonunu kontrol etmektedir. Eğer, bu lokusta a geni bulunuyorsa hücre a eşleşme tipine, a geni bulunuyorsa a eşleşme tipine dönüşmektedir. Maya genomunun başka yerlerinde a ve a genlerinin kopyaları

bulunmasına rağmen bu genler ekspresyon olmamaktadır (Madıgan., MT. ve Martıno, 2014). Şekil 1.5.'de gösterildiği gibi bu suskun kopya (*HMLa* kaseti) insert olan genin kaynağıdır. Eşleşme tipi değişikliğinde *HMLa* kaseti suskun olduğu bölgesinden kopyalanarak MAT bölgesine yerleşmekte ve önce orda aktif olarak bulunan *a* genin yerini almaktadır. Yani eski eşleşme tipini sağlayan gen endonükleaz kodlayan bir gen olan *HO* ile kesilerek atılmakta ve yerine yeni eşleşme tipi olan *a* gen insert olmaktadır (Duina vd., 2014). Hangi gen MAT lokusuna yerleşmişse o gen transkriplenmektedir (Madıgan., MT. ve Martıno, 2014).



Şekil 1.4. *Saccharomyces cerevisiae*'nin yaşam döngüsü.



Şekil 1.5. *S. cerevisiae* kromozomu III'ün bir eşleşme tipi anahtarlama olayının ardından gerçekleştirdiği değişikliğin basitleştirilmiş görüntüsü

S. cerevisiae'nin *a* ve *a* genleri regülatör genlerdir. Diğer olaylara ilaveten bu genler eşleşme sırasında salgılanan *a* faktör veya *a* faktör peptid hormonlarının yapımını düzenlenmektedir. Bu hormonlar zıt eşleşme tipi hücrelere bağlanarak onların hücre yüzeylerinde sebep oldukları değişmelerle hücrelerin kaynaşmasına (füzyon) imkan sağlamaktadır. Zıt tipteki eşleşme hücreleri bir araya gelince, diploit bir zigot ile sonuçlanan hücre ve nükleus füzyonu gerçekleşmektedir. Zigot mayozla haploit ve vejetatif forma dönüştürülerek yaşam döngüsünü tamamlamaktadır (Madıgan., MT. ve Martinko, 2014).

1.2.1. *S. cerevisiae* genom organizasyonu

1996 yılında, *S. cerevisiae* genomu, ilk tamamen dizilenmiş ökaryotik genom olmuştur. Tipik bir haploid tomurcuklanan maya hücresi 16 kromozomdan oluşan ~12.000 kb boyutunda genomik DNA içermektedir. SGD'ye (Saccharomyces Genome Database) göre, 3 Şubat 2014 itibariyle S288C referans suşunda “doğrulanmış açık okuma çerçeveleri (ORF'ler)” sayısı 5076'da kalmıştır (Duina vd., 2014). Bu da maya genomunun her 2 kb'sinde bir protein kodlayan genin bulunduğu, toplam sekansın yaklaşık %70'inin ORF'lerden oluştuğu anlamına gelmektedir (Goffeau vd., 1996). Tomurcuklanan maya genomundaki protein kodlayan genlerin yoğunluğu oldukça yüksek (her ~2 kb için bir gen) olup, insan genomundaki gen yoğunluğundan ~50 kat daha yüksektir. Yüksek gen yoğunluğu, kısmen, *S. cerevisiae*'deki nispeten düşük sayıda intron içeren gen ile açıklanmaktadır, bunun tüm genlerin % ~4'ü olduğu tahmin edilmektedir. *S. cerevisiae* genomu, teknik olarak ORF'ler olmasına rağmen proteinleri kodlaması muhtemel olmayan "şüpheli ORF'ler" olarak adlandırılan 786'yı da barındırmaktadır (Duina vd., 2014).

Saccharomyces cerevisiae diğer pek çok ökaryot gibi, büyük oranda tekrar eden DNA dizilerine sahiptir. Örneğin XII. maya kromozomu, yaklaşık 1260 kb 100-200 adet maya rRNA geni tekrarını içermektedir. Bu rRNA gen tekrarlarını bir başka tekrar serisi takip etmektedir. rRNA operanlarındaki 100-200 özdeş tekrarın yanısıra, maya çekirdek genomu tRNA'lar için 275 gen (sadece birkaçı özdeş) ve diğer tip kod içermeyen RNA'lar için ise 80 gen içermektedir (Madıgan., MT. ve Martinko).

1.2.2. Bir hücre fabrikası olarak *S. cerevisiae* ve endüstriyel biyoteknoloji

Maya, bakteri ve alg gibi mikroorganizmalar, geleneksel fermente edilmiş yiyecek ve içeceklerin üretilmesinden rekombinant proteinlere ve diğer yüksek değerli moleküllere kadar çeşitli endüstriyel işlemlerde kilit rol oynamaktadır (Steensels vd., 2014).

Bu endüstriyel işlemlerin çoğu, ağırlıklı olarak maya *Saccharomyces cerevisiae* modeline dayanmaktadır (Steensels vd., 2014). Bira, ekmek fermentasyonu ve şarap yapımı gibi geleneksel biyoteknolojideki önemi nedeniyle, tarihsel olarak araştırma faaliyetleri, *Saccharomyces cerevisiae* mayasına odaklanmıştır. Böylece genetik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleriyle ilişkili olarak genetik mühendisliği ve fermentasyon teknolojileri hakkında zamanla derinlemesine bir bilgi birikimi oluşmuştur. Yüksek verimli transformasyon yöntemlerinin mevcudiyeti, *S. cerevisiae*'nin genetik mühendisliğine yardımcı olmuştur. Ayrıca, epizomal olanlar da dahil olmak üzere birçok özel ekspresyon vektörü ve raportör genler, immün etiketler ve genetik olarak seçilebilir markerler gibi sayısız başka faydalı araç *S.cerevisiae* için mevcuttur. Ek olarak, bu türdeki olağanüstü yüksek homolog rekombinasyon verimliliği, kromozomlar içinde hedeflenmiş manipülasyonları kolaylaştırmaktadır. *S. cerevisiae*'nin temel ve uygulamalı araştırmalardaki popülaritesi şüphesiz ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından GRAS (genellikle güvenli olarak kabul edilir) olarak sınıflandırılmasından da etkilenmektedir (Nevoigt vd., 2008).

S. cerevisiae yüksek titre ve verime sahip şekerlerden etanol ve karbon dioksit üretme kapasitesi nedeniyle uygulamalı araştırmalarda da önemli bir rol oynamaktadır (Nevoigt vd., 2008). *S. cerevisiae*, yaygın olarak kullanılan bir hücre fabrikasıdır. Antik çağlardan beri ekmek, bira ve şarap üretimi için kullanılmaktadır. Endüstriyel işlemlerin geliştirilmesi ile yüksek etanol toleransı ve yüksek fermentasyon kapasitesi nedeniyle biyoetanol üretimi için tercih edilen hücre fabrikası haline gelmiştir. Dahası, bu maya, geçmişte farmasötik protein üretimi için konukçu bir organizma olarak kullanılmıştır. *E. coli*'de ilk genetik mühendisliğinin gösterilmesinden sonra, *S. cerevisiae*'nin genetik mühendisliği için teknikler hızla geliştirilmiştir, örneğin insan insülini gibi biyofarmasötiklerin üretimi için kullanılmasına izin verilmiştir. O zamandan beri, hepatit ve insan papilloma virüsü aşılıları dahil olmak üzere *S. cerevisiae* kullanılarak birçok başka farmasötik protein üretilmiştir. Ayrıca, *S. cerevisiae* şu anda bütanoller, organik asitler,

yeni antibiyotikler, resveratrol gibi nutrasötikler, bir dizi yakıt ve kimyasal madde için bir üretim konağı olarak kullanılmaktadır (Siewers vd.,2010).

S. cerevisiae'nin bir hücre fabrikası olarak kullanılmasının avantajları arasında: **(i)** genomik, biyokimya, hücre biyolojisi ve fizyolojisi bakımından en iyi karakterize edilmiş ökaryotik mikroorganizma olması; **(ii)** çok yüksek glikolitik akı sağlayabilen çok verimli bir metabolizmaya sahip olması; **(iii)** ilk defa *S. cerevisiae*'nin analizi için yüksek verimli deneysel teknikler geliştirilmiş olması ve bu tür veriler için çok büyük veritabanlarının varlığı; **(iv)** bu organizma için ayrıntılı metabolik modeller geliştirilmesi; ve **(v)** bu organizma için çok verimli genetik mühendisliği araçları bulunması yer almaktadır. Bu sonuncu özellik, *S. cerevisiae*'nin metabolizma mühendisliği için özellikle önemlidir, çünkü çoğu zaman farklı stratejileri değerlendirmek gerekmektedir. Etkili bir metabolik mühendislik stratejisi, gen silme, farklı promotorların kullanımı ve / veya heterolog gen ekspresyonu gibi birçok genetik modifikasyon gerektirmektedir (Siewers vd.,2010).

S.cerevisiae'da etkili bir şekilde kullanılan en önemli sentetik araçlardan biri promotorlardır. Biyosentetik bir yol için ilk kontrol çizgisi transkripsiyon ve transkripsiyonun yönlendirilmesidir ve bu şekilde promotorlar biyosentetik yolların kontrolünde önemli bir rol oynamaktadırlar (Keasling, 2012).

Örneğin, *pHXT7* glikoz esaslı bir promotordur ve *HXT7* promotoru, Hxt7p'yi düşük glikoz konsantrasyonunda yüksek oranda ifade eden yüksek afiniteli bir heksoz taşıyıcı olarak tanımlanmıştır. Dolayısıyla *HXT7* promotoru, çok yüksek gen ekspresyon seviyelerine ulaşmak için glikoz sınırlı koşullarda beslenen parti veya sürekli ekim için önerilmektedir. Diğer bir örnek olarak, *ADH1* promotoru, yüksek glukoz konsantrasyonlarında genlerin koşula bağlı ekspresyonu için uygundur. Bu nedenle, farklı deneyler için farklı promotor kombinasyonları kullanmak iyi bir fikir olabilmektedir, çünkü mevcut promotorları klonlanmış genlerin ekspresyon seviyesini değiştirmek için çalışmalarda kullanılan herhangi bir promotorla değiştirmek metabolizma mühendisliğinde sıkça kullanılan bir yöntemdir (Partow, 2010).

Metabolizma mühendisliği, yani, metabolik yolların amaçlı olarak yeniden yönlendirilmesi, yukarıda belirtilen tüm endüstriyel uygulamalar için maya suşlarının iyileştirilmesinde bir rol oynamıştır (Nevoigt, 2008). Bu yaklaşım kabaca iki önemli bölümden oluşmaktadır: **(i)** genetik manipülasyon için en umut verici hedefi / hedefleri belirlemek amacıyla hücrelerin analizi ile ilgilenen metabolizma mühendisliğinin analitik

tarafı ve (ii) genetik modifikasyonlara sahip hücrelerin yapıldığı hücreler (Ostergaard, 2000).

1.2.3. *S. cerevisiae*' de taksol üretimi için asetil-KoA miktarının arttırılması

1.2.3.1. *S. cerevisiae*'de asetil-KoA metabolizmasına genel bir bakış

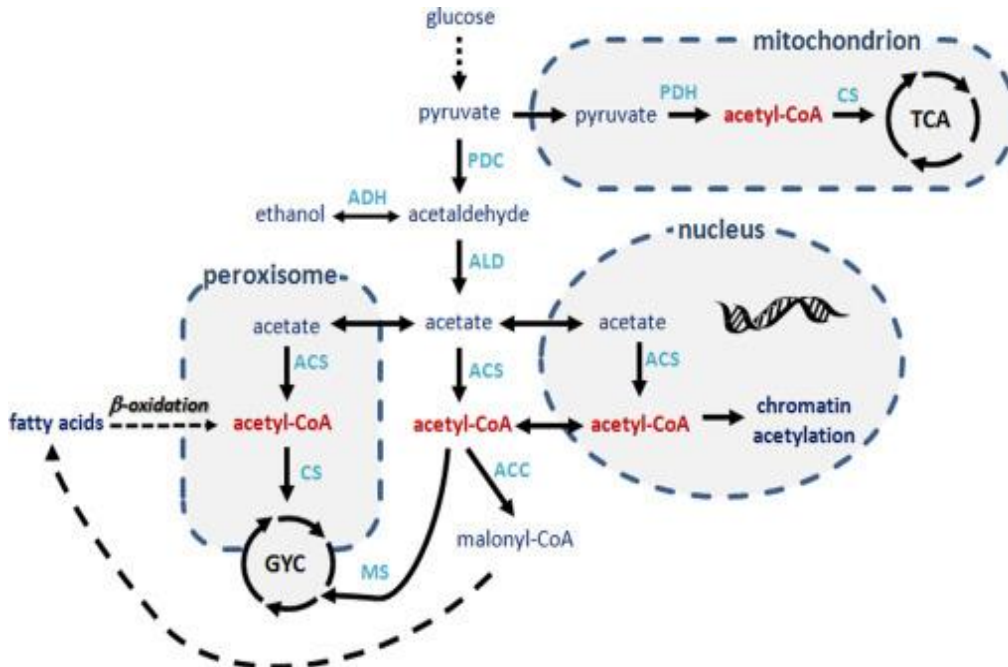
Merkezi bir metabolit olarak asetil-KoA (asetil koenzim A), enzimatik asetil transfer reaksiyonlarında yer alan bir dizi hücresel fonksiyonda önemli roller oynamaktadır. Asetil-KoA, trikarboksilik asit (TCA) döngüsünün başlangıç bileşiğidir ve sterollerin, yağ asitlerinin, lipidlerin, amino asitlerin ve poliketidlerin biyosentezinde anahtar bir öncüdür. Ek olarak, asetil-KoA, histon ve histon olmayan proteinlerin translasyon sonrası (posttranslasyon) asetilasyon reaksiyonları için asetil grubunun donörü olarak işlev görür. Hücresel gereksinimi karşılamak için doğa, pirüvatın oksidatif dekarboksilasyonu, uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonu ve bazı amino asitlerin oksidatif bozunması gibi asetil-KoA sentezi için çeşitli yollar geliştirmiştir (Şekil 1.6) (Lian vd., 2014).

Asetil-KoA, aktive edilmiş bir asetat formudur ve *S. cerevisiae*'nin metabolik ağında önemli bir ara metabolittir. Asetil-KoA metabolizması sitozol, mitokondri, peroksizom ve çekirdek olmak üzere bölmelere ayrılmıştır. Aerobik ve glikoz sınırlı koşullar altında, TCA döngüsü katabolizmada çok önemli bir rol oynamaktadır ve piruvattan piruvat dehidrojenaz (PDH) kompleksinin ürettiği asetil-KoA bu işlem için anahtar substrattır.(2) Mitokondride piruvat, şekerlerden glikoliz yoluyla üretilen sitosolik piruvattan veya mitokondride yer alan malik enzim yoluyla malattan türetilmektedir. Asetil-KoA, TCA döngüsüne sitrat sentaz (SS) tarafından katalize edilen bir aşamada girer. SS, asetil-KoA'yı oksaloasetat ile yoğunlaştırıp, sitrat açığa çıkarmaktadır. *S. cerevisiae*'de tanımlanan, *CIT1*, *CIT2* ve *CIT3* tarafından kodlanan 3 sitrat sentaz izoformu bulunmaktadır. Cit1p ve Cit3p, reaksiyonu ilk katalize eden ve genellikle TCA döngüsüne asetil-KoA tedarik eden ve TCA döngüsünün akışının kontrol edildiği düşünülen iki mitokondriyal izoformdur. *CIT2*, sitrat sentazın peroksizomal izoformunu, sırasıyla protein seviyesinde ve DNA düzeyinde *CIT1* ile %81 ve %74 özdeşlik ile kodlamaktadır (Krivoruchko vd.,2015).

Asetil-KoA için bir diğer önemli kaynak asetil-KoA sentetazdır (ACS). ACS, *S. cerevisiae*'de, piruvat dekarboksilaz (PDC), asetaldehit dehidrojenaz (ALD) ve ACS'den

oluşan PDH bypassının bir parçasını oluşturmaktadır. ACS ile katalize edilen reaksiyon, asetatları asetil-KoA'ya dönüştürmek için ATP'yi tüketmektedir ve iki aşamada AMP oluşturur. İlk adımda, enzim ATP ve sonra asetat bağlayarak enzime bağlı asetil-AMP'yi verir ve pirofosfat (PPi) açığa çıkarır. İkinci aşamada, ACS KoA'yı bağlamakta ve ara maddeyi asetil-KoA ve AMP'ye dönüştürmektedir (Lian vd., 2014).

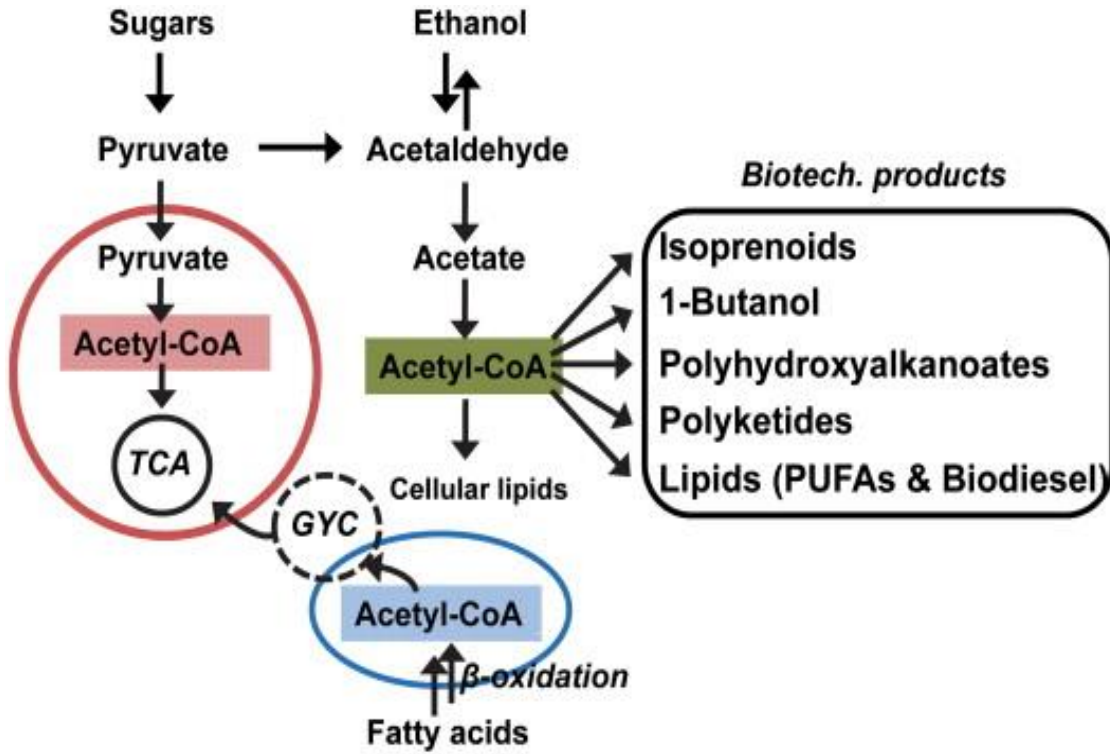
Özetle mayadaki asetil-KoA metabolizması bölümlere ayrılmıştır ve bu bölümler sitozol, mitokondri, peroksisom ve çekirdekten oluşmaktadır. Sitosolik asetil-KoA, piruvattan, asetaldehit ve asetat yoluyla, PDC, ALD ve ACS'nin etkisiyle üretilmektedir. ACC, sitozolik asetil-KoA'yı yağ asidi sentezi için bir substrat olarak kullanılan malonil-KoA'ya dönüştürebilmektedir. Mitokondriyal asetil-KoA, piruvattan PDH'nin hareketleriyle üretilmekte ve daha sonra TCA döngüsünde kullanılmaktadır. Peroksisomda asetil-KoA, ACS'nin hareketleri vasıtasıyla asetattan veya yağ asitlerinin β -oksidasyonu yoluyla üretilmektedir. Peroksisomal asetil-KoA, daha sonra glikosilat döngüsünde bir substrat olarak kullanılabilir. Nükleer asetil-KoA, ACS'nin hareketleriyle asetattan üretilmekte ve temel olarak kromatin proteinlerinin asetilasyonu için kullanılmaktadır (Krivoruchko vd.,2015) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. *S. cerevisiae*'deki asetil-KoA metabolizmasına genel bakış (Krivoruchko vd.,2015).

1.2.3.2. Endüstriyel ürünlerin üretimi için asetil-KoA miktarının arttırılmasının önemi

Hücrel metabolizma için bir yapı taşı olarak önemli rollerine ek, asetil-KoA ayrıca n-bütanol, poliketidler (antibiyotikler, antikanser ilaçları ve immünosupresörler) yağ asidi etil esterleri (FAEE'ler), kauçuk, alkanlar, polihidroksibütirat (PHB) ve izoprenoitler (çoğunlukla aroma ve koku, biyodizel, antimalarial ve antikanser ilaçları, antibiyotikler, kauçuk, diyet takviyeleri, gıda katkı maddeleri ve vitaminler olarak kullanılmaktadır), lipidler (diyet gibi takviyeleri, ilaç ve biyodizel) gibi çeşitli yakıt ve kimyasal moleküllerin biyolojik sentezi için anahtar öncüdür (Chen vd.,2013; Lian vd., 2014). Sürdürülebilirlik ve enerji güvenliği konusundaki endişelerden dolayı, bu moleküllerin *E. coli* ve *S. cerevisiae* gibi çevre dostu ev sahiplerinde biyolojik üretimi artan ilgi görmüştür (Lian vd., 2014) (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. *S. cerevisiae*'deki asetil-KoA metabolizmasına basitleştirilmiş bakış. Asetil-KoA, üç farklı bölgede anahtar bir metabolittir: sitozol (yeşil işaretli), mitokondri (kırmızı işaretli) ve peroksisomlar (mavi işaretli) Sitozolda asetil-KoA'nın birincil kaderi, hücrel lipidler (yağ asitleri ve ergosterol) için öncü olarak görev yapmaktır. Endüstriyel açıdan ilginç birçok biyoteknolojik ürün, asetil-KoA'dan türetilir ve bunların çoğunun biyosentezi, sitozolde meydana gelir. Bu nedenle, tüm bu ürünler için bir maya hücresi fabrikalarında, sitozoldeki karbonu asetil-KoA'ya yönlendirmek ana hedeftir (Lian vd., 2014).

Bu ürünler, genellikle asetil-KoA'yı sitozolden drene eden yollar ile üretilmektedir. Bu nedenle, sitoplazmada prekürsör asetil-KoA'nın yeterli miktarlarda temini çok önemlidir. Bununla birlikte, Şekil 1.7'de gösterildiği gibi, asetil-KoA, birkaç farklı bölmede, yani, sitozol, mitokondri ve peroksizomlarda üretilmekte ve kullanılmaktadır (Chen vd 2013).

Mayada, sitozoldeki asetil-KoA, piruvatın dekarboksilasyonu ile oluşturulan asetaldehitten türetilmiş asetattan üretilmektedir. Asetaldehit ayrıca alkol dehidrojenaz ile etanole dönüştürülebilir ve glikoz üzerindeki büyüme sırasında glikolitik akının büyük bir kısmı mayadaki Crabtree etkisinden dolayı etanole yönlendirilmektedir. Ana alkol dehidrojenazın (Adh1p) yanı sıra, asetaldehitin etanole dönüşümünü katalize edebilen birkaç alkol dehidrojenaz vardır ve bu nedenle mayada etanol üretimini ortadan kaldırmak doğal olarak zordur. Bu aktiviteyi kodlayan genlerin silinmesiyle sitozolde asetil-KoA gereksinimini karşılamak için ortama etanol veya asetat gibi bir C₂ bileşiğinin eklenmesi gerekmektedir (lisin ve lipidlerin biyosentezi için gerekli) (Chen vd., 2013).

Birçok mayanın temel fizyolojik özelliği, karbonhidratları genellikle glikoz gibi altı karbonlu (C₆) molekülleri, CO₂'ye tamamen oksitlemeden iki karbonlu (C₂) bileşenlere, oksijen varlığında bile özellikle etanole indirgeme yetenekleridir. Oksijen varlığında bile etanol biriktiren *S. cerevisiae*, Crabtree-pozitif maya olarak adlandırılmaktadır, oysa şekerleri *Candida albicans* gibi CO₂'ye indirgeyenler Crabtree-negatif mayalar olarak belirtilmektedir. Etanol üretimi sırasında, büyüme için enerji oksidatif solunum yolu yerine glikoliz ve fermantasyon yolları ile sağlanmaktadır. *S. cerevisiae*'de Crabtree etkisi, büyük ölçüde, glikoz gibi C₆ karbonhidratlarının varlığının solunumu bastırdığı bir glikoz-represyon devresine dayanır. Bununla birlikte, doğada substratı C₂ bileşiklerine indirmek en etkili strateji değildir. Aslında, glikozun tükenmesinden ve etanolün birikmesinden sonra, Crabtree-pozitif mayalarda metabolizma değişmektedir. Fermantasyon ürünü - etanol - bir substrat haline gelmekte ve eğer oksijen varsa bozulmaktadır. Metabolizmadaki bu değişim “diauxic shift” olarak bilinmektedir (Piskur vd., 2006).

'Biriktir-Tüket' stratejisi:

Fermantasyon sırasında (aerobik veya anaerobik) maya, asetaldehitin etanole dönüşümünde NADH'yi geri dönüştürür. Daha sonra oksijen varsa, biriken etanol tekrar asetaldehite dönüştürmektedir. Asetaldehit-etanol dönüşümü, farklı katalitik etkinliklerde olmasına rağmen prensipte reaksiyonu her iki yönde (yani, asetaldehit-etanol ve etanol-

asetaldehit) katalize edebilen alkol dehidrojenaz (Adh) ile katalize edilmektedir. *S. cerevisiae*'de, sitoplazmik Adh aktivitesi, bir gen-duplikasyonu olayı ile ortaya çıkan iki gen tarafından kodlanmaktadır. *ADH1*, yapısal olarak ifade edilirken, *ADH2*, yalnızca iç şeker konsantrasyonu düştüğünde ifade edilmektedir (Piskur vd., 2006).

Bu noktada şuna değinirsek yaptığımız bu çalışmada asetil-CoA'nın mevalonat yoluna tedarikini arttırmak ve *S. cerevisiae*'de yüksek seviyede taksadien üretimi elde etmek için, birincil metabolik yolağa, *Adh2* genin asetil-KoA ile rekabetini önlemeye odaklandık ve bunun için indülenebilen bir promotor *pHXT7* ile akışı mva yoluna yönlendirmeyi amaçladık.

1.3. İzoprenoidlerin Üretimi

Bugün, çoğu bitki tarafından sentezlenen, 50.000'den fazla bilinen terpenoid bulunmaktadır (Engels vd., 2008). İzoprenoidler, karakteristik kokulara sahip bitkisel yağlar ve reçineler sağlayan ikincil metabolitler olarak bilinmektedir. Ek olarak, karotenoidler gibi kritik fotosentetik pigmentleri içerdikleri, meyve olgunlaşma işlemlerinde yer aldıkları ve bitkileri zararlı otlara karşı savunma görevi gördükleri varsayılmaktadır. İzoprenoidler ayrıca, dolikoller (bakteri duvarına ve glikoproteinlere şeker taşıyan bir izoprenoid), ubikinonlar (hücreler arası elektron taşıma zincirinde yardımcı kofaktör), büyüme düzenleyicileri ve steroller gibi hücre fonksiyon için önemli olan metabolitleri içermektedir. Örneğin, triterpen skualen, ardışık reaksiyon dizisinde, mantarlarda membran bütünlüğü için hayati önem taşıyan ergosterol'e dönüştürülmektedir (Tippmann vd., 2013).

Bitki terpenoidlerinin kimyasal çeşitliliği muhtemelen doğadaki birçok biyolojik faaliyetlerinin bir yansımasıdır; bu da onları geleneksel ve modern insan sömürüsü için yaygın bir şekilde kullanılan bir kaynak haline getirmiştir. Bitki terpenoidleri aynı zamanda bir endüstriyel malzeme grubunun üretimi için büyük hacimli hammadde görevi görmektedir. Birçok farklı yapıları nedeniyle, bir grup olarak bitki terpenoidleri, birçok farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip bileşikler içermektedir. Lipofilik veya hidrofilik, uçucu veya uçucu olmayan, siklik veya asiklik, kiral veya akiral olabilirler. Bitki terpenoidlerinin kimyasal çeşitliliği genellikle karmaşık terpenoid biyosentetik yollardan kaynaklanmaktadır (Bohlmann and Keeling, 2008).

Terpenoidler (izoprenoidler) gibi doğal ürünler genellikle orijinal kaynaklarından özütlenerek elde edilmektedir, çünkü çoğu zaman birden fazla kiral merkez içeren bu

kadar karmaşık yapıların ticari sentezi çok zordur ve ekonomik değildir (Engels vd., 2008). Bununla birlikte, doğal kaynaklar genellikle bu değerli hedef moleküllerin çok küçük miktarlarını ürettiklerinden dolayı biyolojik kaynaklardan saflaştırma düşük verime ve safsızlıklara yol açarak doğal kaynakların da tükenmesine neden olmaktadır (Engels vd., 2008; Shiba vd., 2007). Ayrıca verim, çevresel ve epigenetik faktörlerden dolayı değişiklik göstermektedir (Shiba vd., 2007). Kaynak organizmanın uygun bir ölçekte yetiştirilememesi durumunda mikrobiyal terpenoidlerin üretilmesi zordur. Bu engelleri aşmak için rekombinant mikrobiyal sistemler kullanılabilir (Engels vd., 2008). En umut verici olanı, önceki stratejilere göre birçok avantaja sahip olan metabolizma mühendisliğidir. Mikroorganizmalar hızlı büyüme özelliğine sahiptir, kolayca ekilebilir ve mikroorganizmalar tarafından üretilmesinin ölçeklendirilmesi kolaydır. En önemlisi, mikroorganizmalar glikoz gibi ucuz ve yenilenebilir karbon kaynaklarından özel olarak istenen bir kimyasal üretmek için bir dizi enzimatik reaksiyonu birleştirebilmektedirler. Ek olarak, biyolojik sistemler değiştirilebilmekte, yeniden tasarlanabilmekte ve çok çeşitli kimyasalların üretimine izin veren sentetik biyoloji araçları kullanılarak tamamen yeni yollar oluşturulabilmektedir (Tippmann vd., 2013).

Mikrobiyal hücre fabrikalarının geliştirilmesi, sadece hücresel metabolizma ve rekombinant DNA teknolojileri hakkında geniş bilgi sahibi olmakla kalmayıp aynı zamanda diğer mühendislik disiplinlerinin entegrasyonu gerektiren karmaşık bir iştir. Ancak, her şeyden önce, istenen kimyasal maddeye göre uygun bir konak organizmanın seçilmesi gerekmektedir. Fonksiyonel izoprenoitlerin üretimi için, esasen *S. cerevisiae* ve *Escherichia coli* kullanılmaktadır, çünkü bunlar geniş moleküler kaynaklara sahip genetik manipülasyonlara elverişlidir (Tippmann vd., 2013).

S. cerevisiae, *E. coli*'ye kıyasla büyük ölçekli fermantasyonlarda daha sağlamdır. Düşük pH ve yüksek şeker konsantrasyonlarının yanı sıra inhibitörlere de oldukça dirençli olmalarının dışında, ökaryotik sitokrom P450 enzimlerini fonksiyonel olarak eksprese edebilmektedir. Bu enzimler, terpenler, alkaloidler ve poliketidler dahil birçok karmaşık bitki türevli molekülün sentezinde rol almaktadır. Örneğin, taksolün sentetik yolu, sekiz sitokrom P450'ye bağlı hidroksilasyon içermektedir. Bununla birlikte, ökaryotik P450'ler endoplazmik retikulum zarına sık sık bağlandığından, bu organellerden yoksun prokaryotik mikroorganizmalarda fonksiyonel olarak eksprese etmek zordur (Krivoruchko and Nielsen, 2015). Ayrıca, mayanın mühendisliği için bir

dizi ileri moleküler biyolojik araçlar geliştirilmiştir ve metabolizmasının düzenlenmesi hakkında birçok bilgi mevcuttur (Tippmann vd., 2013).

1.3.1. İzoprenoidlerin biyosentezi

İzoprenoidlerin tümü, aktive edilmiş izopren formlarından, yani izopentenil pirofosfat (IPP) ve onun izomeri dimetilasilil pirofosfattan (DMAPP) meydana gelmektedir. Bu iki öncül canlı organizmalarda iki farklı yoldan oluşmaktadır: mevalonat (MVA) ve 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat (MEP) yolu. MVA yolu ilk olarak 1960'larda keşfedilmiştir ve yaklaşık 40 yıl boyunca tüm canlı organizmalarda IPP'ye giden tek yol olduğu varsayılmıştır. Bununla birlikte, 1990'larda, MEP yolu bakteri, yeşil alg ve daha yüksek yapıli bitkilerde alternatif bir yol olarak bulunmuştur. Bazı istisnalar dışında MVA yolu, ökaryotların yanı sıra arkealar tarafından da kullanılmaktadır, MEP yolu ise tipik olarak prokaryotlarda ve fotosentetik organizmaların plastidlerinde bulunmaktadır (Tippmann vd., 2013).

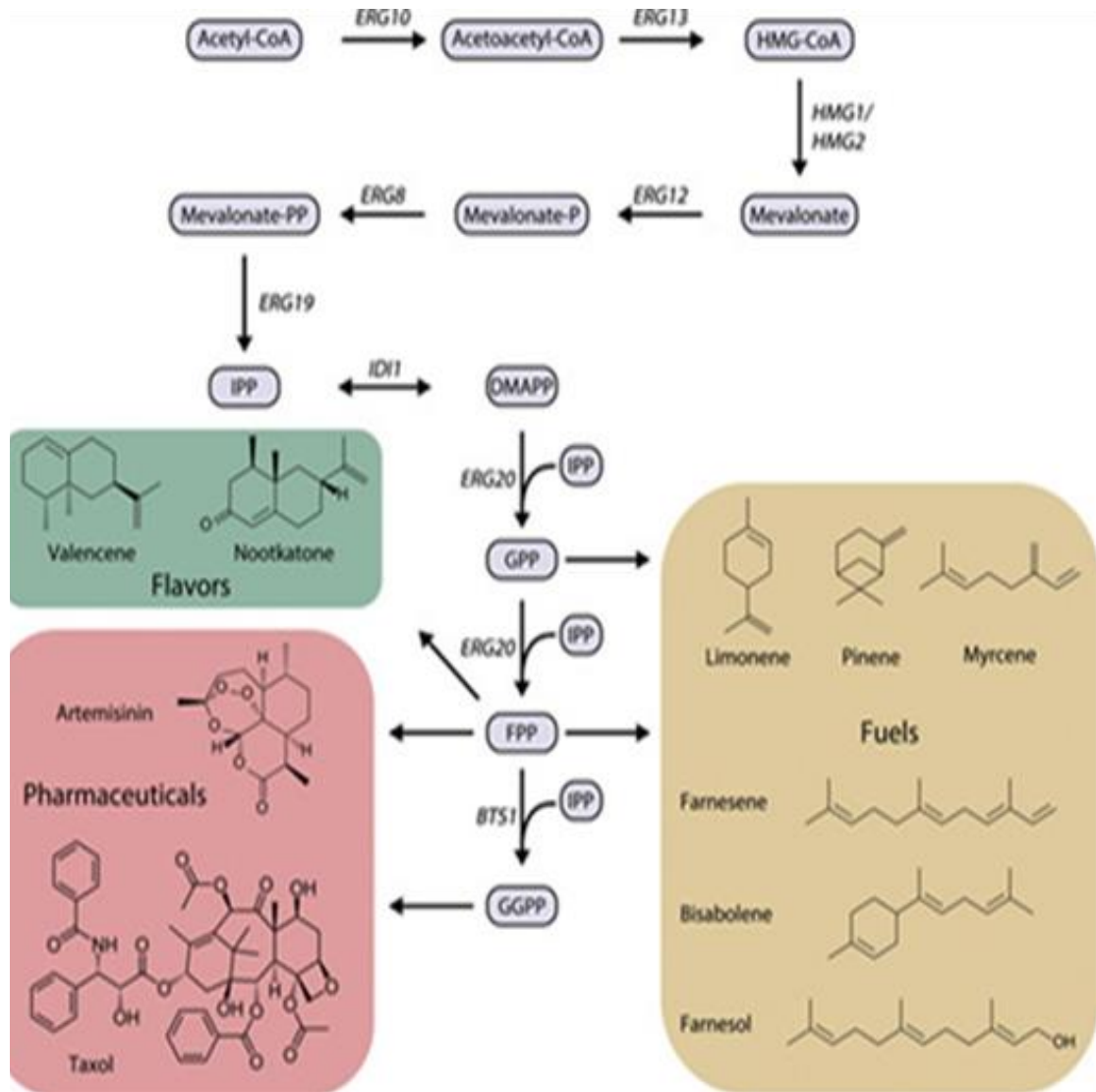
DMAPP; geranil pirofosfat (GPP), farnesil pirofosfat (FPP) veya geranillgeranil pirofosfat (GGPP) oluşturmak üzere bir veya daha fazla IPP molekülü ile baştan sona yoğunlaşma ile uzamaya maruz kalan reaktif bir primerdir (Şekil 1.8). Terpen sentezleri için, öncüler GPP, FPP ve GGPP sırasıyla monoterpen, seskiterpen ve diterpen oluşturmak üzere siklize edilebilmekte ve/veya yeniden düzenlenebilmektedir (Krivoruchko ve Nielsen 2015).

1.3.1.1. MVA yolağı

S. cerevisiae, asetil-KoA'dan yedi enzimatik reaksiyona kadar prekürsör IPP ve DMAPP üretmek için MVA yolunu kullanmaktadır. Bu, asetil-KoA'nın üç molekülünün, asetoasetil-KoA ve hidroksimetilglutaril-KoA (HMG-KoA) vasıtasıyla MVA'ya dönüştürülmesini içermektedir. MVA daha sonra IPP oluşturmak için fosforilasyon ve dekarboksilasyona uğramaktadır. Stereospesifik bir izomerizasyon reaksiyonu, IPP'yi izomer DMAPP'sine dönüştürmektedir (Tippmann vd., 2013) (Şekil 1.8).

S. cerevisiae'de izoprenoid biyosentezinin mühendisliğı için bazı enzimler, özellikle de HMG-KoA redüktaz, IPP izomeraz ve FPP sentaz açıklığa kavuşturulmuştur. *ERG20*, IPP ve DMAPP'yi GPP'ye birleştiren ve daha sonra başka bir IPP ilavesini katalize eden GPP sentaz / FPP sentazını kodlamaktadır (Tippmann vd., 2013).

FPP sayısız bileşik ve primer metabolizma ile bağlantı kuran önemli bir kavşakta bulunmaktadır. Ayrıca skualene yoğunlaştırılır ve daha sonra hücre büyümesi için gerekli olan ve membran geçirgenliği ve akışkanlığın düzenlenmesi üzerinde büyük bir etkisi olan ergosterol oluşturmak için on dokuz dönüşüm basamağından geçmektedir. FPP ayrıca, dolikoller, ubikinon, karotenoidler ve prenile edilmiş proteinler gibi birçok primer metabolitin biyosentezi için önemli bir öncüdür (Tippmann vd., 2013).



Şekil 1.8. *Saccharomyces cerevisiae*'da izoprenoidlerin üretimi: Mevalonat yoluna genel bakış ve ondan elde edilebilecek ürünler. Gen isimleri italiktir. ERG10, asetoasetil-KoA tiolaz; ERG13, HMG-KoA sentaz; HMG1 / HMG2, HMG-KoA indirgemeleri; ERG12, mevalonat kinaz; ERG8, fosfomevalonat kinaz; ERG19, mevalonat pirofosfat dekarboksilaz; IDI1, IPP: DMAPP izomeraz; ERG20, FPP sentazı; BTS1, GGPP sentazı. (Tippmann vd., 2013).

1.4. Taksol (Paklitaksel)

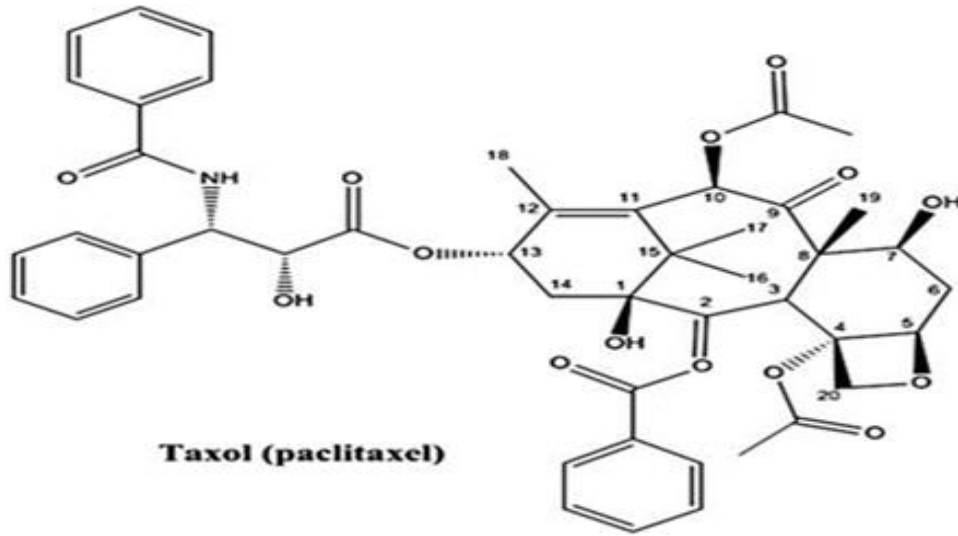
Taksol (paklitaksel), farmakolojik özelliklerinden dolayı bitki kökenli terpenoidlerin daha iyi bilinenlerinden biridir (Engels vd.,2008). Taksol (Şekil 1.9) yumurtalık karsinomları, meme, akciğer, baş ve boyun, mesane, serviks, melanomlar ve AIDS ile ilişkili Karposi sarkomu dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan etkili bir antikanser ilacıdır (Jennewein and Croteau, 2001). Taksol, sekiz fonksiyonel oksijen grubu, iki asil grubu ve bir benzil grubu ile süslenmiş bir tetrasiklik oksaheptadekan iskeletini içeren kompleks bir metabolittir (McElroy and Jennewein, 2017). Taksol'ün bu karmaşık yapısı, ilk olarak 1971'de *Taxus brevifolia* Nutt'ın (pasifik porsuk ağacı) bir kabuk ekstraktından karakterize edilmiştir (Jennewein and Croteau, 2001). Bu oldukça arzu edilen anti-kanser ilacının, Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylandıktan sonra kamuya açık hale gelmesi 21 yılını almıştır. Zorlu gelişme sürecine rağmen, taksol ve ilgili taksan analogları, daha önce beş milyar ABD dolarını aştığı bildirilen satışlarıyla önde gelen anti-kanser ilaçları haline gelmiştir. Sanofi ve Celgene'den 2016 yılına ait yıllık mali raporlarda, Taxotere®, Jevtana® ve Abraxane® ürünlerinden elde edilen gelirlerin bir buçuk milyar ABD Doları'nın üzerinde olduğu belirtilmiştir. Uzun gelişme süresi, büyük ölçüde iyi bir kaynağın bulunmadığını yansıtmıştır, çünkü 1 g taksolün alınması ~12 kg ağaç kabuğu malzemesi gerektirmektedir ve bu da üç yetişkin Pasifik porsuğu (*Taxus brevifolia* Nutt) ağacının kabuğuna eşdeğerdir. Saflaştırma, bileşiğin hidrofobik yapısından dolayı zahmetli ve karmaşıktır çünkü ilaç ağaç kabuğunda çok düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır, örneğin *T. brevifolia*'da % 0.001-0.05 oranında bulunmaktadır (McElroy ve Jennewein, 2017).

Taksolün antikanser özellikleri, diğer antitümör ajanlara kıyasla oldukça benzersiz ve yenidir. Taksol, mikrotübüllerin β -tubulin alt birimlerine bağlanan, normalde depolimerizasyonu destekleyen düşük sıcaklıklarda ve kalsiyum konsantrasyonlarının varlığında polimerleşmelerine neden olan güçlü bir anti-neoplastik bileşiktir. 10 nM'den daha büyük dozlar, hücrel proliferasyonu önleyen ve böylece metafazda hücreleri durdurarak büyük ve stabil tübül demetlerinin birikmesine neden olurken, düşük konsantrasyonlar apoptoza yol açmaktadır (McElroy ve Jennewein, 2017). Taksolde antitümör aktivitesi, yan zincir, A halkası, C2 benzoil grubu ve oksetan halkasından kaynaklanmaktadır. Aktivitenin, C13 zincirindeki C3' amid-asil grubu ve C2' hidroksil grubunun mevcudiyeti nedeniyle devam ettiği bildirilmiştir. Mikrotubulinin sitotoksitesi

ve stabilizasyonu, bu bileşenlerin β -tubulin ile etkileşimi ile indüklenmektedir (KunduSumita ve Ghosh, 2016). Saflaştırılmış sığır beyin tubulini ve HeLa hücreleri ile yapılan in vitro çalışmalar bu bulguları doğrulamıştır. Taksol 1992 yılında, ısıya dayanıklı yumurtalık kanserinin tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır. Bunu, 1994'te meme kanserinin tedavisi, 1999'da akciğer kanseri ve 2014'te adenokarsinom tedavisi için onaylanması takip etmiştir. Aslında, onayından bu yana taksolden geliştirilen ilaçlar bir milyondan fazla hastaya (bağımsız olarak veya bir ilaç kokteyli parçası olarak) uygulanmıştır (McElroy ve Jennewein, 2017).

T. brevifolia'nın şu anki durumu “tehdit altında”dır. Popülasyonu, yangınlar ve taksol elde etmek için kabuğundan faydalanma gibi durumlardan dolayı göze çarpan bir şekilde azalmıştır ve azalmaya devam etmektedir. Bu ağaçların olgunluğa ulaşması ~ 300 yıl gerektirdiğinden, tahrip edici kabuk hasadı yapma gereksiniminden kaçınmak için alternatif kaynakların veya taksol üretimi için yöntemlerin geliştirilmesi uzun zamandır takdir edilmektedir (McElroy ve Jennewein, 2017). Taksol üretimi hala birincil kaynaklara güçlü bir şekilde bağlıdır, ancak çeşitli taksus türlerinin iğnelerinden elde edilen 10-deasetilbaccatin III ve baccatin III'ten yarı sentetik olarak gerçekleştirilebilmektedir. Biyosentetik üretim eşit derecede karmaşıktır ve henüz tam olarak anlaşılmamıştır. 8 sitokrom P450-aracılı oksijenasyon içeren 19 enzimatik reaksiyonda, taksol GGPP'den türetilmiştir (Tippmann vd., 2013). *Taxus spp.* hücre kültürleri şu anda taksol ve taksolün sentezlenebileceği ilgili bileşikleri üretmek için kullanılmaktadır, ancak mikroorganizmaların metabolizma mühendisliği gelecekte bu kaynağın yerini alabileceği düşünülmektedir (McElroy ve Jennewein, 2017). Taksoitlerin mikrobiyal üretimi, bitki biyokütlesinden ekstraksiyona ekonomik bir alternatiftir. Bitkilerde taksoit biyosentezi bir anastomoz yolu olduğu için, metabolizma mühendisliği spesifik taksoit ürünlere odaklanan doğrusal bir yol oluşturma fırsatı sunmaktadır (Engels vd., 2008). Taksolün mikrobiyal üretimine yönelik yaklaşımlar çoğunlukla üç konuya odaklanmıştır: **(1)** diterpen üretimi için GGPP temini, **(2)** GGPP'nin işlenmiş ara bileşik taksa-4 (5), 11 (12) -dien'e daha fazla dönüşümü için taksandien sentazın aşırı ekspresyonu ve **(3)** sitokrom P450-aracılı taksadienin taxa-4 (20), 11 (12) -dien-5a-ol'e oksidasyonunun mühendisliği (Tippmann vd.,2013).

Paklitaksel biyosentetik yolunun bazı aşamaları, *E. coli*, *S. cerevisiae* ve bitkiler de dahil olmak üzere heterolog ekspresyon sistemlerine aktarılmıştır. *E. coli*'de IPP izomeraz, GGPP sentaz ve TASY'nin overekspresyonu, hücre kültürünün litresi başına



Şekil 1.9.. Taksolün (paklitaksel) yapısı (McElroy ve Jennewein, 2017).

1,3 mg taksadien üretim seviyelerine yol açmıştır. Bununla birlikte, mikrobiyal sistemlerde sitokrom P450'leri ifade etmedeki zorluklar nedeniyle yolun daha da geliştirilmesi sınırlıdır. Sitokrom P450'ler yanlış katlama, çeviri ve hücre zarına yerleştirme nedeniyle işlevlerini yitirmektedir. Ayrıca, her sitokrom P450'yi enzimatik olarak geri dönüştürmek için gereken spesifik sitokrom P450 redüktazlarının olmamasıyla birlikte kofaktör mevcudiyeti ile ilgili problemler, önemli engelleri temsil etmektedir (Howat vd., 2014).

1.4.1. Paklitaksel'in (Taksolün) biyosentezi

Paklitaksel, karmaşık bir tetrasiklik diterpendir. Çok büyük biyolojik ve ekonomik önemlerine rağmen, taksol biyosentetik yolu ve düzenlenmesi henüz tam olarak bilinmemektedir, ancak öncül geranillgeranil difosfattan (GGPP) taksolün kendisine kadar 19 enzimatik aşamaya ihtiyaç duyduğu genel olarak kabul edilmiştir (Şekil 1.10) (McElroy ve Jennewein, 2017; KunduSumita ve Ghosh, 2016).

Paklitakselin biyosentezi, üç izoprenil difosfat (IPP) biriminin, dimetilasilil difosfat (DMAPP) ile yoğunlaştırılmasını içermektedir. Bitkiler, sitozoldeki mevalonik yolla (MVA) veya plastidlerde metileritrol fosfat (MEP) yoluyla IPP ve DMAPP üretiminde benzersizdir. Paklitaksel biyosentezine katılan öncüllerin kökeni belirsizliğini korumaktadır. *Taxus baccata* ile yapılan araştırmalar hem sitozolik hem de plastid

yolaklarının inhibitörleri tarafından paklitaksel üretiminin azaltılabileceğini göstermektedir (Howat vd., 2014).

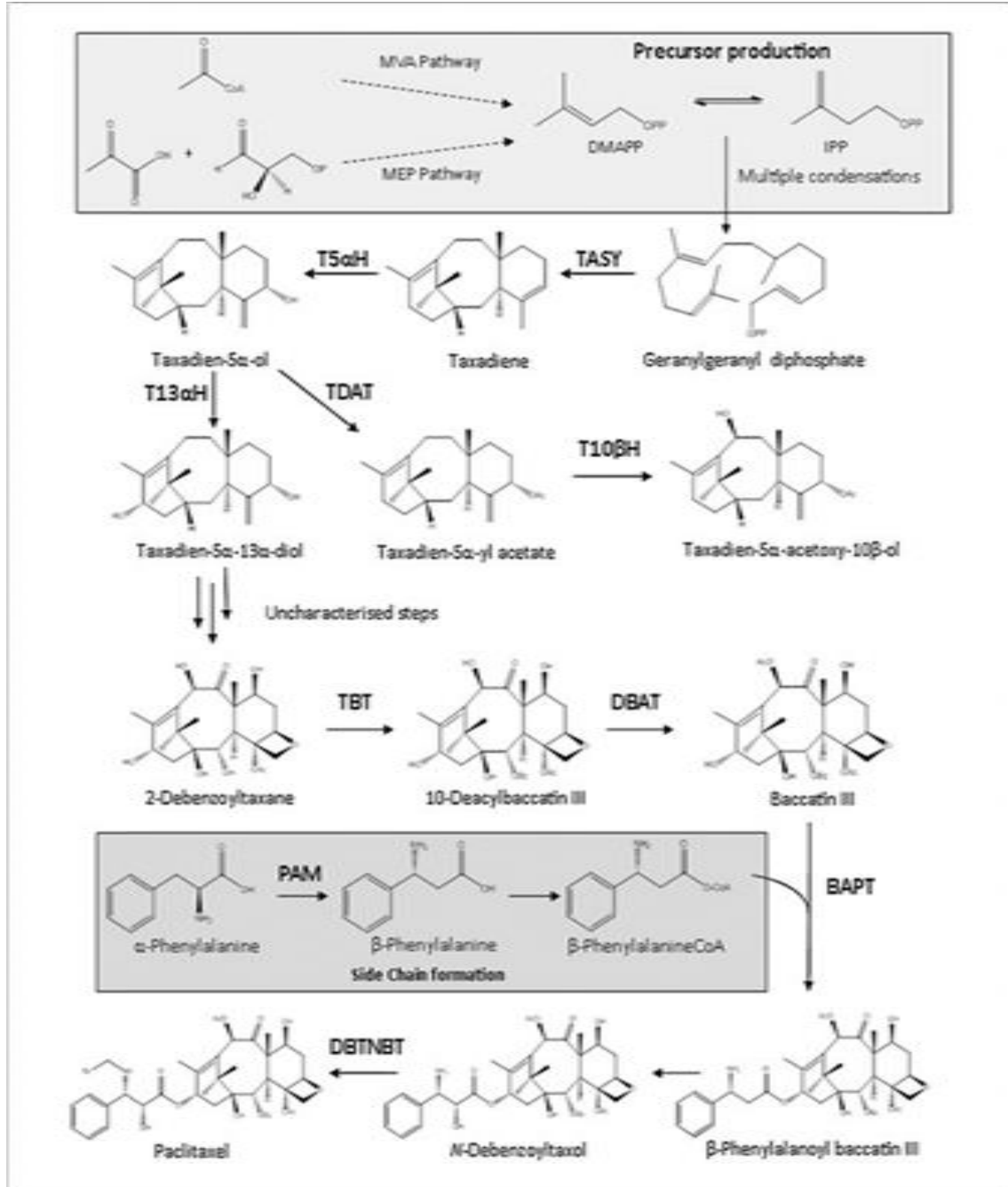
Yoldaki ilk basamak, taksadien sentaz enziminin (TS), geranil geranil difosfatın (GGPP) taksadien'e siklizasyonunu katalize etmesidir. Daha sonra üretilen trisiklik yapı, çeşitli sitokrom P450 (cP450) oksijenazları ve asiltransferazların aracılık ettiği çok sayıda bölgesel ve stereospesifik oksijenasyona ve asilasyona maruz kalmaktadır. Taksadien daha sonra sitokrom P450 taksadien-5a-hidroksilaz (T5aH) ile taksadien-5a-ol üretmek için 5-konumunda hidroksile edilmektedir. Bu ara bileşiğin daha sonra taksadien-5a-ol-O-asetil transferaz (TDAT) enzimiyle taksadien-5a-il-asetata ya da taksadien-5a-13a-diol hidroksilaz (T13aH) ile taksadien- 5a-13a- diol'e dönüşmesi için iki olası yol bulunmaktadır. Taksadien-5a-il-asetat ara maddesi daha sonra 10 konumunda cP450'ye bağlı monooksijenaz taksoid-10 β - hidroksilaz (T10 β H) ile hidroksile edilmektedir (Şekil 1.10) (Howat vd., 2014).

Ardından, ara ürün C1, C2, C4 ve C7 pozisyonlarında dört hidroksilasyona, C9'da bir oksidasyona ve C4 ve C5 arasında bir epoksidasyona tabi tutulur. Bu aşamalar için enzimler tam olarak tanımlanmamıştır, ancak hidroksilasyonlar için cP450'ler aracılık etmektedir. Bilinmeyen anahtar bir enzim, ara ürünün aktivitesi için gerekli olan oksetan halkasının üretiminde rol alan enzimdir. Önerilen birkaç hipotetik mekanizma vardır, 5a-asetat ara maddesinin C4-C20 çift bağının epoksidasyonunu içeren tercih edilen adayla birlikte a-asetoksi grubunun, oksiran-oksetan halkasının genişlemesi ile birlikte C-5'ten C-4'e göç ettiği yeniden düzenleme reaksiyonudur (Howat vd., 2014).

Ayrıca dört ester işlevi de eklenmiştir; C2'de benzonat, C4 ve C10'da asetat ve C13'te N-benzoil-3-fenilizoserinoidir. Bunların meydana gelme sırası hala bilinmemektedir ve sekansı açıklığa kavuşturmak, oksijenasyonlardan daha problemlidir, çünkü asilasyonların, çoğunun çoklu asilasyon bölgelerine sahip olduğu bilinen çok sayıda yan ürüne yol açmaktadır (KunduSumita ve Ghosh, 2016).

Bu dönüşümler, daha sonra C10 pozisyonunda 10-deasetilbakatin III-10-O-asetiltransfer (DBAT) ile asetillenen 10-deasetilbakatin III'ü üretmek için taksan 2a-O-benzoiltransfer (DBT) enzimi 2a-O-benzoiltransfer (DBT) için hipotetik öncü 2-debenzoiltaksan üretmektedir. C13 yan zinciri, daha sonra fenilalanin aminomutaz (PAM) tarafından β -fenilalanine dönüştürülen ve daha sonra β -fenilalanin KoA üretmek için bilinmeyen bir enzim tarafından esterlenen α -fenilalaninden oluşmaktadır. Bu daha sonra 3'-N-debenzoil-2'-deoksitaksol üretmek için bakatin III-13-O-fenilpropanoil

transferaz (BAPT) enzimi ile taksan çekirdeğine bağlanmaktadır. Bu ara madde C2 pozisyonunda bilinmeyen bir cP450 ile hidroksile edilmekte ve 3'-N-debenzoil-2'-deoksitaksol-N-benzoil transferaz (DBTNBT) enzimi tarafından nihai bileşik paklitaksele dönüştürülmektedir (Howat vd., 2014).



Şekil 1.10. Taksolin biyosentezi

2. MATERYAL

2.1. Çalışmada Kullanılan Mayalar

Çalışmada kullanılmış olan bütün suşlar ve vektörler aşağıdaki tabloda verilmiş olup hepsi Chalmers Üniversitesi, Biyoloji ve Biyoloji Mühendisliği Anabilim Dalı Sistem ve Sentetik Biyoloji laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Ek olarak *SCIGS22a* suşu laboratuvarımızda mutasyona uğratılmış olarak *SCIG22ax* şeklinde bulunmaktadır.

Tablo 2. 1. Bu çalışmada kullanılan maya suşları ve plazmitler

Strainler ve suşlar	Genotip
<i>CEN.PK113-5D</i>	(MATa MAL2-8c SUC2 ura3-52)
<i>SCIGS22a</i>	(MATa MAL2-8c SUC 2ura3-52 lpp1Δ::loxP dpp1Δ::loxP PERG9Δ::loxP-PHXT1gdh1Δ::loxP PTEF1-ERG20 PPGK1-GDH2 PTEF1-tHMG1)
<i>MVA</i>	(MATa MAL2-8c SUC2 ura3-52 lpp1Δ::loxP dpp1Δ::loxP PERG9Δ::loxP-PHXT1gdh1Δ::loxP PTEF1-ERG20 PPGK1-GDH2 PTEF1-tHMG1 PPGK1-ERG13 PTEF1-ERG10 PPGK1-ERG8 PTEFERG12 PPGK1-IDI PTEF1-ERG19)
<i>SCIGS22ax</i>	(MATa MAL2-8c SUC 2ura3-52 lpp1Δ::loxP dpp1Δ::loxP PERG9Δ::loxP-PHXT1gdh1Δ::loxP PTEF1-ERG20 PPGK1-GDH2 PTEF1-tHMG1 Δ::ypl062w)
Plazmitler	Genotip
pIYC08	(PTEF1-acsL641P PPGK1-ALD6 PTEF1-ERG10 , PHXT7-ADH2)
pHKG-G	PTEF1-ts, PPGK1ggppsERG20, PHMGR-tHMGR
pXI-I	

2.2. Maya Kùltür Besiyerleri

Bu çalışmada kullanılan besiyerleri ve içerikleri aşağıda verilmiştir.

Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD) Agar

Yeast Extract	10,0 g
Peptone	20,0 g
Dextrose	20,0 g
Agar	15,0 g
MQH ₂ O	1000 mL

Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD) Broth

Yeast Extract	10,0 g
Peptone	20,0 g
Dextrose	20,0 g
MQH ₂ O	1000 mL

Synthetic Defined Agar (SDA)-URA

Yeast Nitrogen Base without amino acids	1,7 g
Ammonium Sulfate	5 g
Dextrose	20 g
CSM-URA	0,7 g
Agar	10 g
MQH ₂ O	1000 mL

İçeriği verilen besiyeri gösterilen miktarlara göre hazırlanıp 121° C' de 15 dak. 1.5 atm basınçta steril edilmiştir. Transformasyon sonrası suşların seçiminde seçici besiyeri olarak kullanılmıştır (Shi vd., 2016).

SD + URA + 5-FOA Medium

Yeast nitrogen base with ammonium sulfate and without amino acids	6,7 g
5-fluoroortic acid (5-FOA)	1 g
Dextrose	20 g
Uracil	50 mg

MQH₂O 500 mL

Tüm bileşenlerin çözülmesi için 65°C'ye kadar ısıtılmıştır; pH 3.5–4'e ayarlanmıştır; ve filtre ile sterilize edilmiştir. 500 mL MQH₂O'ya 20 g agar eklenmiştir ve 2 L hacimli bir şişede otoklavlanmıştır. Filtre ile sterilize edilmiş çözelti otoklavlanmış agara ilave edilmiştir, iyice karıştırılarak besiyeri petri petri tabaklarına dökülmüştür (http 1).

DELFT Media

(NH ₂) ₂ SO ₄	7,5 g/L
KH ₂ PO ₄	14,4 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g/L

İlk olarak bu bileşikler otoklanmıştır ve 1M KOH ile pH 6.5' e ayarlanmıştır. Daha sonra aşağıdaki bileşikler eklenmiştir.

Glucose	20 g/L
Trace Metal	2 mL/L
Vitamin	1 mL/L

2.3.Kullanılan Kitler

GeneJET PCR Purification Kit (Thermo scientific kat:K0702)

GeneJET Gel Extraction Kit (K0692)

2.4. Laboratuvar Ekipmanı

Çalışmada kullanılan laboratuvar ekipmanı Tablo 2.2’de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. *Çalışmada kullanılan laboratuvar ekipmanı*

Ekipman	Marka/Model
Block heater	Stuart SBH1300
Cabin – AirClean 600 PCR Workstation	STAR LAB
Electrophoresis device	Biorad
Electroporation device	Biorad GenePulser Xcell
Hotplate Stirrer (magnetic)	IMK-20
Illuminator (gel cutting)	MAESTROGEN
Microscope	ZEISS AXIO scope a1
MINI CENTRIFUGE	MINO-10K – INOVIA technology
Molecular Imager Biorad	ChemiDoc XRS+
Nanodrop one C	Thermo Scientific
Realtime PCR	LightCycler Nano: Roche
Shaking Incubator	maxQ 8000 thermo
Small centrifuge	Eppendorf minispin plus
Standard PCR	Veriti 96 well Thermal Cyclers – Applied Biosystems
Table top centrifuge	Eppendorf 5424 R
Vortex	DAIHAN Scientific

3. METOD

3.1. Rekombinant Kasetleri Oluşturan İnsert Parçalarının PCR ile Üretimi

Çalışmada ihtiyaç duyulan her türlü insert ve rekombinant kasetin amplifikasyonu için gen spesifik primer çiftleri (Tablo 3.1) kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon ile elde edilen parçaların birleştirme reaksiyonlarını gerçekleştirebilmek için primerler kasette bulunan bir gen ile onu takip eden diğer gen bölgesi ile yaklaşık 50bç kadar üst üste gelecek şekilde tasarlanmıştır. Buna göre, çalışma süresince tüm reaksiyonlarda Takara – PrimeStar HighFidelity Hotstart (Kat No: R010) polimeraz enzimi kullanılarak rastgele mutasyon olasılığı en aza indirilmeye çalışılmıştır.

Tablo 3.1. *İnsert fragmentlerin ve rekombinant kasetin amplifikasyonu için kullanılan gen spesifik primer çiftleri*

X-I UP	Fw	GGAATAGTGACGTTGTGATGCGGTGAG
	Rev	GCAAATGTAAAAGATGAACCTCAGAAGAACACGCAGGGGCCCCGAAA TTGTTCTACGACCGGCTGCAAAGAATCCTCCGAGAAAATTTG
pHXT7	Fw	TCGTAGGAACAATTTTCGGGCCCC
	Rev	TTTTTGATTAAAATTAAAAAACTTTTTGTTTTTGTG
ADH2	Fw	TTTTCTAAGAACAAAGAATAAACACAAAAACAAAAAGTTTTTTTAAT TTTAATCAAAAAATGTCTATTCCAGAACTCAAAAAGCC
	Rev	GGGACCTAGACTTCAGGTTGTCTAACTCCTTCCTTTTCGGTTAGAGCG GATCTTATTTAGAAGTGTCAACAACGTATCTAC
X-I DOWN	Fw	ATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAG
	Rev	CCACACCCACCTCAAACCCATTCTTAAGAACC

PCR döngüsü için gerekli olan rekombinant dizileri oluşturan insertler, büyüklükleri, kaynak vektörler ve insert spesifik tasarlanan primer çiftlerinin isimleri Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. *PCR döngüsü için gerekli olan rekombinant dizileri oluşturan insertler, büyüklükleri, kaynak vektörler ve insert spesifik tasarlanan primer çiftlerinin isimleri*

T.2	İnsert	Baz çifti	Kaynak Vektör	Primer Çiftleri
1.parça	XI-I Up	470	XI-I	X-I Up forward
				X-I Up reverse
2.parça	pHXT7	390	CEN.PK113-5D	Promotor forward
				Promotor reverse
3.parça	ADH2	1048	PIYC-08	ADH2 forward
				ADH2 reverse
4.parça	XI-I Down	2523	XI-I	X-I down forward
				X-I down revers

İlgili enzim için üretici tarafından önerilen reaksiyon şartları gerektiğinde optimize edilmiştir ve genel olarak kullanılan şartlar ve genel reaksiyon karışımı Tablo 3.3 ve Tablo 3.4’de verilmiştir. Her bir reaksiyon için 200 ng’dan düşük final konsantrasyonunda kaynak vektör kullanılmış ve her 50 µL reaksiyon için 100 µM stok primer çiftlerinden önerilen final konsantrasyon değerlerine ulaşacak şekilde reaksiyonlara eklenmiştir. Tüm reaksiyonlar aksi belirtilmedikçe 3 aşamalı PCR şartları takip edilerek tamamlanmıştır. Belirtilen reaksiyonlarda tercihli olarak 58-60 derece arasında TM değerleri kullanılmıştır.

Tablo 3.3. *İnsert parçaların amplifikasyonu için kullanılan genel reaksiyon karışımı*

Bileşenler	Reaksiyon başına düşen hacim
5XPrimeSTAR Buffer®(Mg ⁺²)	10 µL
dNTP Mixture	4 µL
Primer forward	0.2 µL
Primer reverse	0.2 µL
Template	<200 ng
PrimeSTAR®HS DNA Polymerase	0.5 µL
MQH ₂ O	50 µL'ye kadar
Total	50 µL

Tablo 3.4. *İnsert parçaların amplifikasyonu için PCR döngüsü şartları*

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

3.2. Üretilen Parçaların Saflaştırılması & Agaroz Jel Analizi

Rekombinant kaseti oluşturmak için PCR reaksiyonları sonrasında elde edilen insert parçalar %1'lik veya 0,7'lik agaroz jele yüklenmiş ve insert parçalara yaklaşık olarak karşılık gelen Safe-Green™ 1kb Opti-DNA Marker (Kat:G474) ile reaksiyon ürünlerinin doğruluğu karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Doğruluğu analiz edilen PCR ürünlerini saflaştırabilmek için yine %1'lik veya 0,7'lik agaroz konsantrasyonuna sahip jel hazırlanmış ve jel DNA mutasyon riskini en aza indirmek için GelGreen boyası (Biotium Kat:41005) ile boyanmıştır. Daha sonra PCR ürünleri hazırlanan jele yüklenmiş ve 80 Volt/90mA çıkışa sahip güç ünitesinde 1-2 saat yeterli seperasyona uğrayana kadar yürütülmüştür. Seperasyonu sağlanan insert parçaların jelden geri kazanımı için jel, UV tray üzerine alınmış ve marker bantlara göre belirlenen pozisyonlardaki insert parçaların büyüklükleri karşılaştırılarak analiz edilip ürünler jelden kesilmiştir. Jelden kesilen PCR ürünleri Thermo Scientific Agarose Gel Extraction Kit (Kat No: K0692) kullanılarak saflaştırılmış ve saflaştırılan parçalar tekrar %1 veya 0,7'lik Agaroz jele yüklenerek insert büyüklüğü kontrol edilmiştir.

3.3. Elde Edilen İntert Parçaların Asetil-KoA Yolağı İntegratif Kasetini Oluşturmak Üzere Birleştirilmesi

Doğruluğu kontrol edilip, agaroz jelden saflaştırılarak geri kazanılan insert parçaların birleştirilmesi yukardaki PCR şartları modifiye edilerek iki adımda gerçekleştirilmiştir. İlk adım ön birleştirme reaksiyonudur ve primersiz olarak gerçekleştirilmiştir. Primersiz olarak gerçekleştirilmesinin nedeni insert parçalar PCR reaksiyonu ile elde edilirken primerler kasette bulunan bir gen ile onu takip eden diğer gen bölgesi ile yaklaşık 50bp kadar üst üste gelecek şekilde tasarlanmıştır ve dolayısıyla füzyon reaksiyonu sırasında insert parçalar birbirinin primeri gibi davranmıştır. Bu şekilde kasetin tek reaksiyonda PCR ile füzyonu gerçekleştirilmiştir. 15 döngüden oluşan ön birleştirme reaksiyonu için PCR şartları, Tablo 3.5'de gösterilmiştir.

Tablo 3.5. İlk füzyon reaksiyonu için PCR şartları.

Sıcaklık	Zaman	Döngü
95°C	3 dakika	
98°C	10 sn	
58°C	15 sn	x15
72°C	5.30 dak.	
72°C	10 dak.	
+4	∞	

İlk füzyon reaksiyonunda kullanılacak insert miktarları Tablo 3.6’da olduğu gibi, entegre edilecek insert parçasının sıralı konumlarına göre artan katsayılara göre belirlenmiştir.

Tablo 3. 6 . Füzyon reaksiyonu için entegre edilecek insert parçaların sıralı konumlarına göre katsayıları

	1.parça	2.parça	3.parça	4.parça
Parçaların isimleri	X-I Up	pHXT7	ADH2	X-I Down
İnsert uzunluğu	470bç	390bç	1048bç	2523bç
Entegre edilecek insert miktarı	X	3X	3X	X

İkinci adımda, ön birleştirmesi gerçekleştirilen reaksiyon kalıp olarak kullanılmıştır. İkinci reaksiyona XI-I up forward primeri, XI-I down reverse primeri ve ilk füzyon reaksiyonundan 2 µL kalıp beraber eklenmiştir. PCR reaksiyonu 30 döngü olarak Takara – PrimeStar HighFidelity Hotstart (Kat No: R010) enzim protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiş ve ikinci füzyon reaksiyonu tamamlanarak insert parçaların birleştirme işlemi sağlanmıştır. İkinci adım için PCR reaksiyon şartlar Tablo 3.7’de gösterilmiştir.

Tablo 3.7. İkinci füzyon için PCR döngüsü şartları.

Sıcaklık	Zaman	Döngü
98°C	3 dakika	
98°C	10 sn	
56°C	15 sn	X30
72°C	5.30	
72°C	10 dk	
+4	∞	

3.4. İntegratif Kasetinin Saflaştırılması

PCR döngüsü sonucunda birleştirme reaksiyonu tamamlanan Asetil-KoA yolağı integratif kasetinin jel analizi yapılmıştır ve saflaştırılmak üzere %1'lik veya 0,7'lik agaroz jele yüklenmiştir. Daha sonra UV tray üzerine alınmış ve marker bantlara göre belirlenen pozisyonlarda analiz edilip ürünler jelden kesilmiştir. Thermo Scientific Agarose Gel Extraction Kit (Kat No: K0692) kullanılarak kasetin saflaştırma işlemi tamamlanmıştır.

3.5. Maya Hücrelerinin Kompetent Hale Getirilmesi ve Transformasyon Aşamaları

3.5.1. Maya hücrelerinin kompetant hale getirilmesi

Birleştirme reaksiyonu ve saflaştırılma işlemi tamamlandıktan sonra oluşturulan Asetil-KoA yolağı integratif kaseti *MVA*, *SCIG22a* ve *SCI22ax* suşlarına transfer edilmek üzere uygun konsantrasyonlarda ve saflıkta hazırlanmıştır. İlk olarak maya suşlarının 80 °C'de donmuş stok kültürlerinden YPD plakalarına inokülasyonu için YPD agar besiyeri hazırlanmıştır (Jessica, 2013). Maya suşları, 3 gün boyunca 30 ° C'de YPD medium plakaları üzerine çizgi ekim yapılarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan tek koloniler transformasyon aşaması için toplanarak 5 mL YPD Broth besiyerine inoküle edilmiştir ve 12-16 saat boyunca 30°C'de 200 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. YPD broth besiyerinde birinci gün inkübasyonu tamamlanan *MVA*, *SCIG22a* ve *SCI22ax* mutant suşların 5 mL'lik starter kültürlerinden 50 mL YPD Broth besiyerine OD600 =

0.05-0.1 ile başlatılması sağlanarak 30 ° C'de ve 200 rpm'de OD600 = 0.8-1.0'a ulaşana kadar inkübasyona devam edilmiştir.

3.5.2.Transformasyon aşamaları

Maya hücreleri OD600=0.8-1.0'a ulaştığında hücre kültürleri 50 mL'lik falkon tüplere alınarak santrifüj edilmiştir (1100 g, 4°C, 5 min) ve süpernatant atılmıştır. Pelletin üzerine 20 mL steril MQH₂O (buz gibi) eklenmiş ve hücreler pipet yardımıyla yeniden süspanse edilmiştir. Daha sonra hücreler tekrar santrifüj edilmiş (1100 g, 4°C, 5 min) ve süpernatant atılmıştır. Pellet 16 mL sorbitol (1M) ile tekrar süspansiyon haline getirilmiştir ve sonra 2 mL 10X TE tamponu (pH 7.5) ve 2 mL LioAc (1M) ile homojenize edilerek ~150 rpm, 30°C' de 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 200 µL DDT (1M) eklenerek, 30 ° C, 150 rpm'de 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir. 20 ml 1 M sorbitol (buz gibi) ile iki kez hücreler yıkanmıştır ve santrifüj edilip (1100 g, 4°C, 5 min) süpernatant atılmıştır. 300 µL 1 M buz ile soğutulan sorbitol pellete eklenmiştir ve hücreler resüspanse edilmiştir. Her suş için ayrı ayrı eppendorf tüpleri hazırlanmıştır ve konsantre hücreler eppendorf tüplerine her tüpte 50 µL olacak şekilde alınmıştır. Hücreler tüplerin içerisinde buz üzerinde tutulmuştur ve DNA eklenerek (toplam hacim <5 µL) 15 dakika bekletilmiştir. Bir sonraki aşama olarak hücreler Bio-rad elektroporasyon kuvvetlerine alınmıştır ve voltaj 1,5 kV olacak şekilde ayarlanarak ayarlanarak ateşleme yapılmıştır. Elektrik vuruşundan hemen sonra soğuk 1 mL sorbitol (1M) hücrelerin üzerine eklenmiştir ve pipetleyerek yukarı ve aşağı iyice karıştırılmıştır. Bütün hücreler en kısa sürede sorbitol tüpüne aktarılır ve 1-3 saat 30 ° C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında suşlar santrifüj (3000 g, 1 dak.) edilmiş ve ~150 µL kalacak şekilde süpernatant atılmıştır daha sonra SDA-URA agar plakaları üzerine hücreler yayılarak petri tabakları 30° C 3 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

3.6. Koloni PCR

Koloni PCR, istenilen genetik yapının mevcut olduğunu doğrulamak veya genetik yapının bir bölümünü amplifiye etmek için transformasyon aşamasını takiben seçici bir besiyeri üzerinde gelişen maya veya bakteri kolonilerini hızlı bir şekilde taramak için bir yöntemdir (Bergkessel and Guthrie, 2013).

3.6.1. Koloni PCR reaksiyonu için primerlerin tasarımı

Koloni PCR için kasete özgü primerler tasarlanmıştır. Bu primerler, integrasyon bölgelerini çevreleyen yerlerden yani XI-I up bölgesinin yaklaşık 200 bç kadar üstünden ve XI-I down bölgesinin yaklaşık 200 bç kadar aşağısından tasarlanmıştır.

Pozitif bir klon toplam kaset uzunluğundan daha büyük boyutlu bir ürün üretecektir. Bu tip primer çifti, ek parçanın doğru boyutta olup olmadığını ve kasetin doğru yere oturup oturmadığı hakkında bilgi vermektedir ([http-3](http://3)). *MVAo*, *SCI22axo* ve *SCI22ao* suşlarında kullanılan primer çifti Tablo 3.8’de verilmiştir. Toplam kaset uzunluğu 4431bç’ dir ve agoroz jelde beklenen uzunluk kullanılan bu primerlerle beraber yaklaşık olarak 4831bç kadardır.

Tablo 3.8. Koloni PCR döngüsünde kullanılan primerler

XI-I Up dışından.	CCAAGTCCGTTACGCTGCGGTG
XI-I Down dışından	CGCTTATGAAAACCTTTATCCGTCTTCACG

3.6.2.Genomik DNA’nın preparasyonu

Hücre duvarı, maya hücrelerinin hızlı ve kolay bir şekilde parçalanması için ana engeldir ve bu nedenle genomik DNA’nın verimli bir şekilde geri kazanılması için parçalanmalıdır. Maya hücrelerinden genomik DNA’nın preparasyonu için SDS ile muamele edilerek hücre duvarını parçalayıp tek bir tüpte genomik DNA hazırlanabilir. Lityum asetat (LiOAc) yaygın olarak hücre duvarlarını zayıflatmak için maya transformasyon protokollerinde kullanıldığı için, mayalardan genomik DNA ekstraksiyonu için hızlı ve verimli bir yöntem geliştirmek üzere SDS ile birleştirilmiştir (Löoke vd., 2011).

Transformasyon aşamasından sonra SD-URA petri tabaklarında bulunan kolonilerden tekrar her suş için ayrı ayrı yeni SD-URA tabaklarına tek koloni ekimi yapılmıştır ve 30 °C de 3 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra SD-URA tabaklarında oluşan tek kolonilerden genomik DNA’nın preparasyonu için eppendorf tüplerin içerisine 100 µL 200 mM LiOAc %1 SDS çözeltisi eklenmiştir. Bir öze yardımıyla seçilen koloniler tüplerin içerisine aktarılmıştır ve vorteksenerek süspanse edilip 10-15 dakika boyunca 70 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, 250 uL %96’lık etanol ilave edilerek, örnekler kısa vorteksenerek karıştırılmıştır ve DNA, 15.000 g’ de 3 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmıştır

ve pelletin üzerine 50-80 µL MQH₂O eklenerek çözülmesi sağlanmıştır. 15.000 g' de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Pellet uzaklaştırılmış ve PCR döngüsü için süpernatant alınmıştır (Lõoke vd., 2011).

3.6.3. Koloni PCR reaksiyonu

SD-URA besiyerinden seçilen kolonilerin istenilen kaseti içerip içermediğinin kontrolü için DreamTaq™DNA Polymerase (Kat: EP0702) enzim protokolü uygulanmıştır. PCR döngüsü için genomik DNA'dan 2 µL kalıp olarak kullanılmıştır. Tablo 3.8' de gösterilen koloni PCR döngüsü için tasarlanmış primer çifti kullanılmıştır.

3.7. Rekombinant Kasetin Sekans Analizi

MVAo, *SCIG22ao* ve *SCIG22axo* suşları koloni PCR döngüsünden sonra elde edilen rekombinant dizilerin sekans analizi yaptırılmış ve biyoinformatik dizilere uygunluk gösterip göstermedikleri analiz edilmiştir.

3.8. Markır Genlerin 5-FOA Besiyeri ile Uzaklaştırılması

S. cerevisiae'de 5-floro-orotik asit (5-FOA), *URA3*⁺ hücrelerine karşı seçim yapmak için çeşitli genetik ekranlarda uzun süredir kullanılmaktadır. *URA3*, urasil biyosentetik yolunda (Ura5p ile birlikte, orotat fosforibosil transferaz) 5-FOA'yı 5-fluoridik asit (5-FU) halinde dönüştürebilen bir enzim olan orotidin-5'-fosfat dekarboksilazı kodlamaktadır (5-FUMP). 5-FU, uracil veya timin yerine RNA ve DNA ile yanlış eşleşebilen bir pirimidin analogudur. RNA ve DNA'nın işlenmesine ve fonksiyonuna etki ederek hücre ölümüne yol açmaktadır. *Ura3* mutantları, büyüme için eksojen urasile ihtiyaç duyar ve 5-FOA içeren besiyerinde urasil bulunmaktadır. *URA3* işaretli bir gen kasetinin varlığı, *ura3* hücrelerini 5-FOA'ya duyarlı hale getirir, ancak bunlar urasil marker genini kendiliğinden kaybederek 5-FOA ve urasil içeren ortama dayanabilmektedirler (Ko vd., 2008).

MVAo, *SCIG22ao* ve *SCIG22axo* mutant suşlarında metabolik yükü önlemek üzere kasette bulunan markır genler çevrelendikleri DR' ler nedeni ile mitotik rekombinasyon ile uzaklaştırılmıştır. *URA3* markır geninin mutant suşlarda tekrar kullanılabilirliği açısından da uzaklaştırmaları önemlidir. Koloni PCR reaksiyonu sonrasında pozitif çıkan kolonilerden 5-FOA besiyerine ekilmiştir. 30°C'de 3 gün inkübasyondan sonra koloniler

SD-URA ve YPD besiyerlerine ekilerek petri tabaklarında kolonilerin varlığı kontrol edilmiştir. Aynı zamanda *URA3* geninin silinip silinmediği colony PCR reaksiyonu ile de teyit edilmiştir (Solis-Escalante vd., 2013).

3.9. Taksadien Üretimi İçin Epizomal Plazmitin Transformasyonu

Laboratuvarımızda kodon optimize olarak bulunan heterolog genler *TS* ve *GGPPS*, *Spe1/Sac1* ve *BamH1/Nhe1* restriksiyon kesim bölgeleri ile çevrelenmiş şekilde GeneScript'e sentezlettirilmiştir ve bu genler pUC57 plazmitlerine klonlanmış halde laboratuvarımızda bulunmaktadır. *MVAo*, *SCIG22ao* ve *SCIG22axo* mutant hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilecek olan epizomal plazmit pHKG-G aynı zamanda *Kpn21/MreI* bölgelerinde ise PHMGR-tHMGR'ı içermektedir. Literatür özeti kısmında ayrıntılı olarak belirtildiği gibi tHMGR yolakta önemli bir düzenleyici olarak çalıştığı için bu epizomal plazmitler içerisine klonlanmıştır. pHKG-G epizomal plazmiti *ERG20* genini de içermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda ve yine literatür özetinde belirtildiği üzere *ERG20*'de yolakta önemli bir gen olması nedeni ile integratif plazmitlerle değil epizomal plazmitlerle ve GGPPS ile füzyon şeklinde klonlanmıştır (Zhou vd. 2012). pHKG-G 3 farklı suşa (*MVAo*, *SCIG22ao* ve *SCIG22axo*) elektroporasyon yöntemi ile transforme edilmiştir ve 15 (3x5) farklı potansiyel maya hücre fabrikası elde edilmiştir. Transformasyon için bölüm 3.5.2'de de önerilen transformasyon tekniği (elektroporasyon) kullanılmıştır. Hücreler SD-URA besiyerine inoküle edilmiştir ve 2-5 gün süre ile 30°C' de inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen kolonilerden seçilen her bir hücreye ait 5 örneğin transforme edilen plazmitleri içerip içermediği koloni PCR yöntemi ile kontrol edilmiştir.

3.10. GC-MS Analizleri İçin Örnek Toplanması

SD-URA besiyerinde geliştirilen koloniler 5 mL Delf Mediuma inoküle edilmiştir. Bir gece inkübasyondan sonra koloniler aynı içerikli 18 mL Delf Medium ve 2 mL dodocane içeren karışıma OD600=0.05-0.1 olacak şekilde aktarılmıştır. 30°C'de 200 rpm'de 72 saat boyunca geliştirilen suşların dodocane tabakasında örnekler toplanmıştır ve GC analizi için hazırlanmıştır.

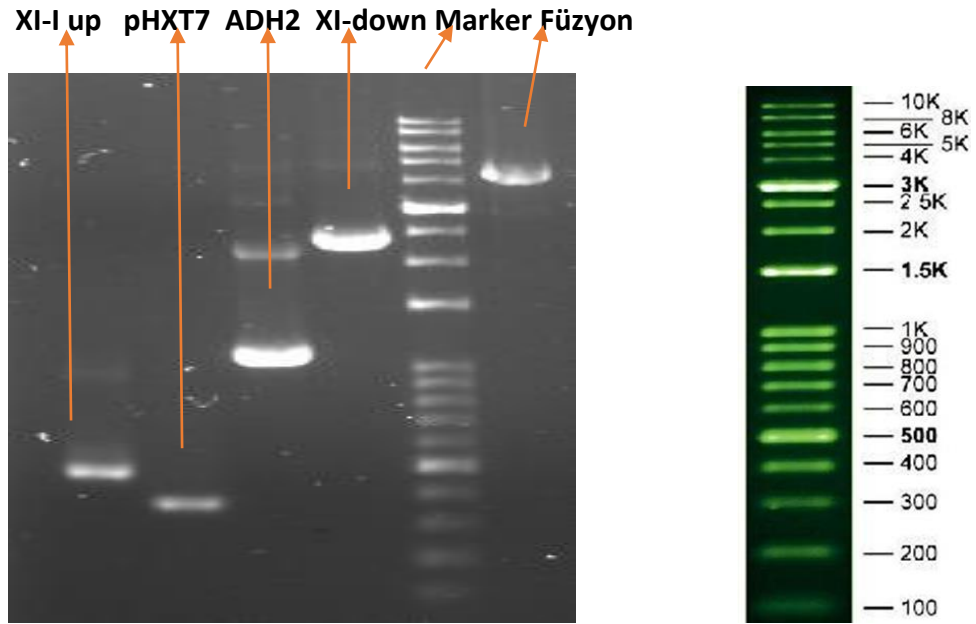
3.11. GC-MS Analiz Şartları

Numune çözeltisinin 0.2 µL'si, kılcal kolon DB-5MS (30M x 0.25mm x 0.25µm) ile donatılmış GC-MS (Shimadzu GCMS-QP2010 ultra) ile analiz edildi. GC-MS şartları şöyledir; Enjeksiyon portu sıcaklığı, 250°C;Taşıyıcı gaz, He (99.999%) ;Enjeksiyon modu, Ayrılmayan Basınç, 49kPa; Toplam akış, 13.4 mL/dak;Fırın Sıcaklığı, 50°C ile 300°C arasında, 10°C/dak. MS koşulları İyon Kaynak Sıcaklığı, 200°C;Alma modu, SIM; Seçilen m/z, 272,122,107.

4. BULGULAR

4.1. İnsert Parçaların ve Asetil-KoA Yolağı İntegratif Kasetinin PCR Döngüsü Sonucunda Agoroz Jelden Elde Edilen Görüntüleri

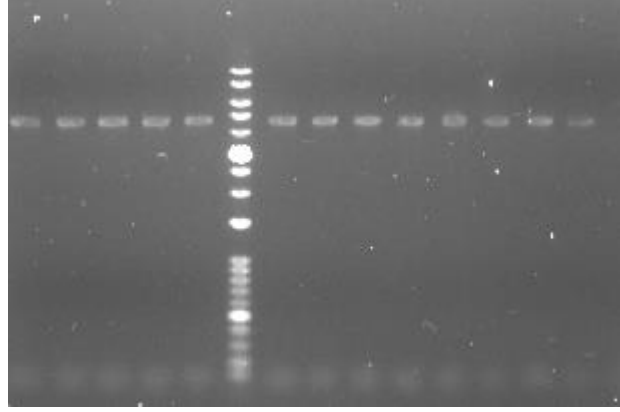
Rekombinant kaseti oluşturmak için PCR reaksiyonları sırasında insert parçaların üretimi gen spesifik örtüşen primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.1). Elde edilen insert parçaların uzunluklarının doğruluğu şekikde olduğu gibi marker bantlara göre karşılaştırılarak kontrol edilmiştir. Rekombinant kasetin füzyon reaksiyonu için X-I up forward ve X-I down reverse primerleri kullanılmıştır. PCR füzyon reaksiyonu sonucunda oluşan kasetin toplam uzunluğu marker bantların pozisyonuna göre karşılaştırılarak tutarlılığı kontrol edilmiştir.



Şekil 4.1. İnsert parçaların ve İntegratif Kasetin PCR döngüsü sonucu Agoroz Jeldeki görüntüsünün Marker bantlar ile karşılaştırılması. XI-I up:470 bç, pHXT7:390 bç, ADH2:1048, XI-I down:2523

4.2. Koloni PCR Döngüsü Sonucunda İnteraktif Kasetin Agoroz jelden Elde Edilen Görüntüsü

Koloni PCR reaksiyonu Tablo 3.8’de verilen primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve beklenen uzunluk toplamda 4831bç’dir.

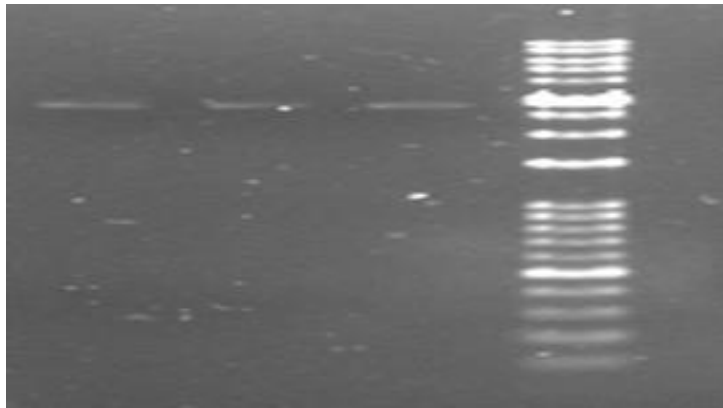


Şekil 4.2. *MVAo, SCIG22ao ve SCI22axo suşlarına ait koloni PCR döngüsü sonuçlarının jel görüntüleri.*

Şekil 4.2’de gösterildiği gibi ilk beş bant *MVAo* suşuna aittir, sonra marker bant ve markerden sonra beş bant *SCI22ao* suşunu, son üç bant ise *SCI22axo* suşunu göstermektedir.

4.3. *URA3* Geninin 5-FOA Besiyeri ile Uzaklaştırıldıktan Sonra Agoroz Jeldeki Bulguları

Mutant suşlarda bulunan *URA3* geni hücrelerin 5-FOA besiyerine ekilmesiyle uzaklaştırılmıştır. Suşlar kontrol için hem SD-URA hem de YPD agar petri tabaklarına ekilmiştir ve SD-URA tabaklarında maya suşlarının gelişmediği gözlenmiştir. Aynı zamanda *URA3* geninin silinip silinmediği Tablo 1’de gösterilen XI-I up forward ve XI-I down reverse primerleri kullanılarak PCR döngüsü ile de teyit edilmiştir.



Şekil 4.3. *MVAo, SCIG22ao ve SCI22axo suşlarının 5-FOA besiyerinden sonra jel görüntüleri*

4.4. Epizomal Plazmitlere Ait Koloni PCR Döngüsü Sonucu Jel Görüntüleri

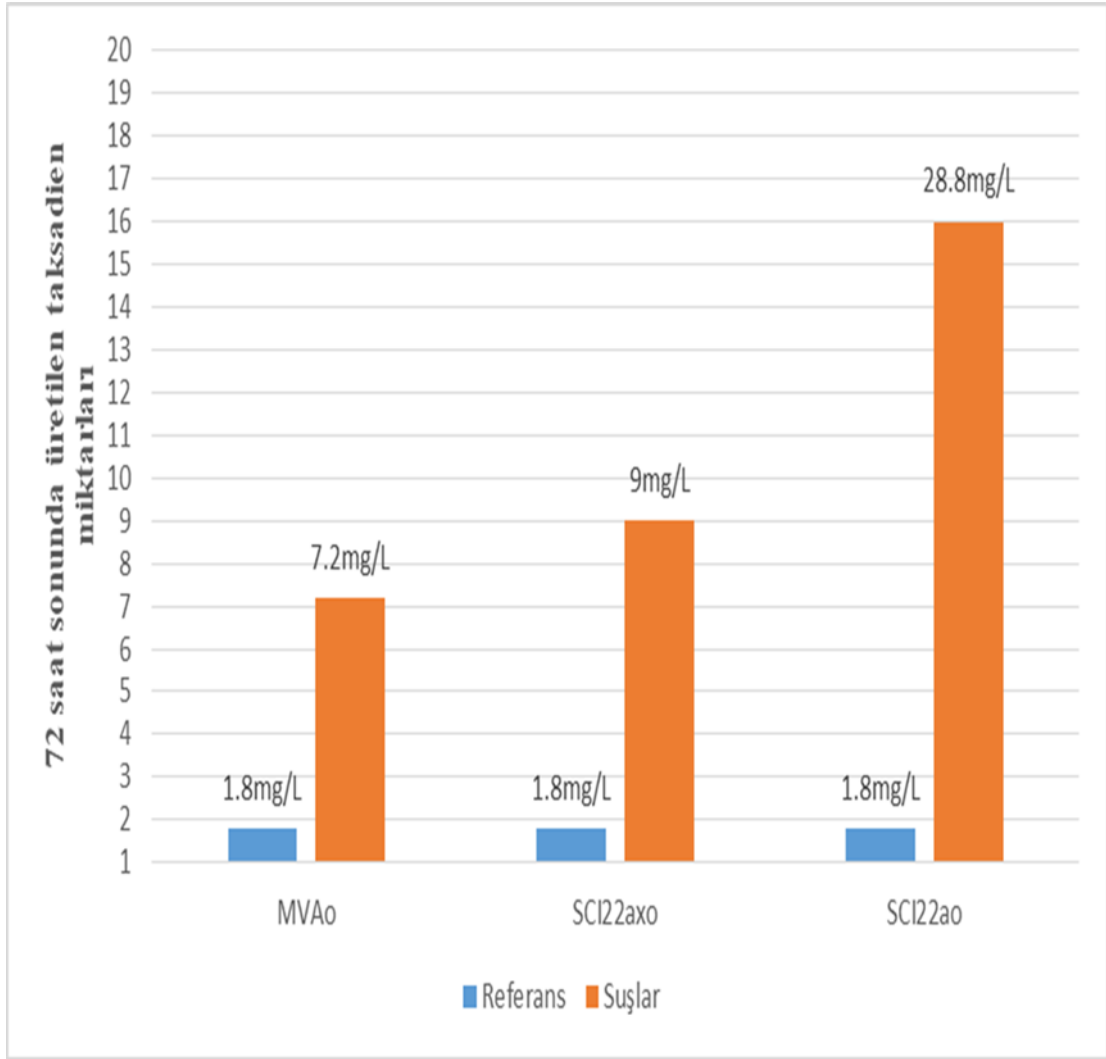
SD-URA besiyerinden seçilen kolonilerin istenilen plazmiti içerip içermediğinin kontrolü DreamTaq™DNA Polymerase (kat: EP0702) enzim protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Agaroz jelde analizi gerçekleştirilen plazmitlerden her suşdan 5'er tane koloni seçilmiştir ve 15 farklı potansiyele sahip maya hücre fabrikası elde edilmiştir. Hücrelerin istenen epizomal plazmiti içerip içermediğinin kontrolü plazmitte bulunan *ERG20* geninin amplifikasyonu ile teyit edilmiştir.



Şekil 4.4. *MVAo*, *SCIG22ao* ve *SCIG22axo* suşlarında epizomal plazmitin varlığının *ERG20* geni ile teyiti

4.5. GC-MS Analiz Sonuçları

MVAo, *SCIG22ao* ve *SCIG22axo* mutant suşlarına ait GC-MS veri sonuçları grafikte gösterilmiştir. *SCIG22a+F* referans suşu alınarak diğer suşlarla karşılaştırılmıştır. Referans suşundan elde edilen miktar 1,83 mg/L'dir. Şekil 4.5'de gösterildiği gibi *MVAo* suşunda yaklaşık olarak dört kat, *SCIG22ao* suşunda onaltı kat ve *SCIG22axo* suşunda ise beş katlık bir artış gözlenmiştir.



Şekil 4.5. Mutant suşların GC-MS analiz sonuçları

5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Maya *Saccharomyces cerevisiae*, yakıtların, kimyasalların ve ilaçların üretiminde yaygın olarak kullanılan bir hücre fabrikasıdır. Bu hücre fabrikasının yeni yakıtların ve kimyasalların düşük maliyetli üretimi için kullanılması, yüksek verim ve düşük yan ürün üretimi gerektirmektedir. Endüstriyel açıdan ilginç birçok kimyasal madde, mayada merkezi bir öncü metabolit görevi gören asetil koenzim A'dan (asetil-KoA) biyosentezlenmektedir. Bu kimyasalların üretiminde yüksek verim sağlamak için, merkezi karbon metabolizmasının, etanol üretiminin en aza indirgenmesi (ya da ortadan kaldırılması) ve asetil-KoA'nın yüksek verimle glikozdan oluşturulabilmesi gerekmektedir (Nielsen, 2014).

İzoprenoidler; kokular, farmasötikler ve potansiyel biyoyakıtlar, iki farklı metabolik yol, mevalonat (MVA) yolu ve 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat (MEP) yolu ile üretilmektedir (Partow vd., 2012). *S. cerevisiae*'deki tüm seskiterpenler, diterpenler, triterpenler ve tetraterpenler, ortak bir öncül farnesil difosfat (FPP) ile üretilir. Bu nedenle, terpenoidlerin üretimini geliştirmek için akışı FPP hedef yoluna doğru verimli bir şekilde yönlendirmek önemlidir (Xie vd., 2015). Tüm ökaryotik hücrelerde ve bitkilerin sitoplazmasında ve mitokondrilerinde işlevsel olan MVA yolu, asetil-KoA'nın asetoasetil-KoA'yı oluşturmak üzere birlikte yoğunlaşması ile başlar (Yadav vd., 2012).

Taksol (paklitaksel) iyi bilinen izoprenoidlerden biridir ve birçok kansere karşı kullanılan bir diterpenoidtir. Orjinali, pasifik porsuk kabuğundan (*Taxus brevifolia*) izole edilmiştir. Bu ilacın karmaşık yapısı, ticari kimyasal sentezini sınırlamaktadır. Bu nedenle, 10-deasetilbakcatin III gibi daha erişilebilir biyosentetik ara maddelerden yarı-sentez ve *Taxus* bitki hücre kültürlerinde üretim, halen bitki kaynaklarına bağlı olan alternatif tedarik yöntemleri geliştirilmiştir (Sawai ve Saito 2011).

Bu çalışmada olduğu gibi bitkilerden elde edilen taksol gibi doğal ürünlerin, alternatif üretim konakçıları aracılığıyla biyosentezini yeniden oluşturmak için biyomühendislik stratejileri kullanılarak kayda değer miktarlarda üretilmesi hedeflenmektedir. Bu tür stratejiler, çeşitli bilgi ve teknolojilerden yararlanmaya çalışmaktadır. Örneğin, bitki türevli bileşiklerin; farmasötikler, zirai kimyasallar, kozmetikler, saf kimyasallar ve nutrasötikler olarak umut vaat ettikleri iyi bilinmektedir. Dolayısıyla, bileşiklerin ve bunların ana üretim konaklarının karmaşıklığı, hızlı ve büyük ölçekli üretim süreçlerinde ciddi çabalar sarf edilmesine neden olmuştur. Bunu takiben, metabolizma mühendisliği gibi kurulmuş alanlar ve sentetik biyoloji gibi yeni ortaya

çıkan alanlar ile ilgili bilimsel ve mühendislik ilerlemeleri, bitki kaynaklı bileşiklere ve bunların güçlü potansiyellerine daha iyi erişim için yeni fırsatlar sunmuştur (Li ve Pfeifer 2014).

Metabolizma mühendisliği, son zamanlarda yüksek verimlilikli omik ve genom ölçekli hesaplama analizleri tarafından teşvik edilen çeşitli metabolitlerin verimli üretimi için çeşitli mikroorganizmaların geliştirilmesini hedeflemiştir. Metabolizma mühendisliği kimyasal olarak sentezlenmesi zor olan kompleks yapılı ve kiraliteye sahip canlı organizmalarda bulunan sekonder metabolitleri içeren yeni ilaçların ve ilaç öncülerinin geliştirilmesinde giderek daha önemli bir rol oynaması beklenmektedir (Lee vd., 2009).

Yapılan bu çalışma ile metabolizma mühendisliği stratejileri kullanarak iyi bilinen bir izoprenoid ve birçok kansere karşı kullanılan bir diterpenoid olan taksol öncülerinin eldesinin *S. cerevisiae* 'da mevalonat (MVA) yolağı ile arttırılması hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda *S. cerevisiae*'nin Taksol üretebilmesi için yolak üzerinde gerekli öncü geranilgeranil difosfatın sağlaması gerekmektedir (Engels vd., 2008). Bu çalışmada, asetil-KoA'nın mevalonat yoluna tedarikini arttırmak ve *S. cerevisiae*'de yüksek seviyede taksadien üretimi elde etmek için, *Adh2* genin asetil-KoA ile rekabeti önlemeye çalışılmış ve bunun için indülenebilen bir promotor *pHXT7* kullanılmış ve akış MVA yoluna yönlendirilmiştir.

S. cerevisiae'nin enerji metabolizmasında iki ana yol bulunur; glikoliz ve aerobik solunum. Etanol, glikolizin ve etanolik fermantasyonun bir son ürünü olan enerji metabolizmasında kilit bir metabolittir. Ayrıca, aerobik solunum sırasında bir karbon substratı olarak hizmet eder, alkol dehidrojenazlar ile (ADHs), asetaldehit ve etanolün dönüşümünü katalize eder (de Smidt vd.,2008).Yüksek şeker ve oksijen seviyelerinde, mayalar solunum, fermantasyon veya her iki yolun aynı anda kullanımı yoluyla ATP üretebilir (Pfeiffer ve Morley 2014).

Saccharomyces cerevisiae, karbon artı enerji kaynağı olarak glikoz veya fruktoz üzerinde katlanarak büyürken ve havanın varlığında, glikoz indirgenmesi, esasen aerobik fermantasyon yoluyla ilerler. Maya, mannoz veya galaktoz üzerinde büyürken, indirgenme, solunum ve fermantasyon yoluyla eş zamanlı olarak ilerler. Bu durum, solunum enzimlerinin sentezlenmesinin yüksek fermantasyon oranları ile baskılanmasından kaynaklanmaktadır. “Crabtree etkisi” olarak adlandırılan bu düzenleyici sistem aslında bir enerji kaynağının (solunum) başka bir enerji kaynağı

(fermantasyon) tarafından bastırılmasından ibarettir (Deken, 1966). Crabtree etkisini en aza indirerek akışı astil-KoA'ya yönlendirmek için sınırlı glikoz seviyelerinde indüklenabilen bir promotor olan *pHX7* bu çalışmada kullanılmıştır.

Asetaldehit-etanol dönüşümü, farklı katalitik etkinliklerde olmasına rağmen prensipte reaksiyonu her iki yönde (yani, asetaldehit-etanol ve etanol-asetaldehit) katalize edebilen alkol dehidrojenaz (*Adh*) ile katalize edilmektedir. *ADH1*, yapısal olarak ifade edilirken, *ADH2*, yalnızca iç şeker konsantrasyonu düştüğünde ifade edilir (Piskur vd., 2006) Bu bilgiler ışığında *pHXT7* promotoru ile *ADH2* genini güçlendirerek akışı asetil-KoA' ya yönlendirmeye çalışılmıştır.

Siavash Partow ve grubu yaptığı bir çalışmada *S. cerevisiae*' da, glikoz üzerinde büyüme sırasında ifade edilen yedi farklı promotörü karşılaştırmış ve değerlendirmiştir (*pTEF1*, *pADH1*, *pTPI1*, *pHXT7*, *pTDH3*, *pPGK1* ve *pPYK1*) , ve yaptıkları çalışmanın sonucunda her bir promotor için çeşitli aktivite profilleri göstermişlerdir; örneğin, *TEF1* promotörü fermentasyon sırasında en sabit etkinliği göstermiştir ve *pHXT7*, glikoz ile sınırlı sürekli kültürde en güçlü olanı temsil etmiştir. Örneğin, *HXT7* promotörü, çok yüksek gen ekspresyon seviyelerine ulaşmak için glikoz sınırlı koşullarda beslenen parti veya sürekli ekimi için önerilmiştir (Partow vd., 2010).

Uzun hidrokarbon yağ asil zinciri, enerji bakımından zengindir; bu, sıvı taşıma yakıtları ve yüksek değerli oleo kimyasalları için ideal bir öncüdür. Xiaowei Li ve grubu (2014) metabolizma mühendisliği stratejileri kullanarak *S. cerevisiae*'yi yağ asitlerinin aşırı üretimi için kullanmışlardır. Araştırmacılar çalışmalarında farklı suşlar kullanmışlardır, *XI23*: {*pXL110*: *pTEF1* - *eutE*; *pHXT7* - *ADH2*} genetik modifikasyonuna sahip bu suş bizim çalışmamızda olduğu gibi *pHXT7* - *ADH2* kombinasyonu şeklinde kullanılmıştır. Ancak, ek bir modifikasyon olarak *eutE* geni *pTEF1* promotoru ile güçlendirilmiştir. Burdaki çalışmada kullanılan suшта, *ADH2* ve *eutE*'nin (*XL123*) aşırı ekspresyonu, yağ asitlerinin üretimini arttırmamıştır (Li vd., 2014).

Yapılan bu çalışmada arkaplan suşu olarak üç farklı suş kullanılmıştır. (*SCIG22a*, *SCIG22ax* ve *MVA*) *SCIG22a* suşu, Gionata Scalcinati ve grubu tarafından endüstriyel öneme sahip seskiterpenlerin öncüsü olan a-santalene üretimini arttırmak için genetik modifikasyonlara maruz bırakılmış bir suştur. Scalcinati ve grubu, α -santalen üretimi için verimli bir *Saccharomyces cerevisiae* hücre fabrikası inşa etmeyi amaçlamışlardır (Scalcinati vd., 2014).

SCIG22a suşunda over eksprese edilen genler, *tHMG1* (turuncated HMG-CoA redüktazı kodlayan), *ERG20* (FPP sentazı kodlayan), *GDH2* (NAD'a bağlı glutamat dehidrojenaz kodlayan) ve *SanSyn opt* (α -santalen sentazı şifreleyen). Silinmiş genler ise *GDH1* (NADP'ye bağımlı glutamat dehidrojenaz kodlayan), *LPP1* ve *DPP1*'dir (her ikisi de lipid fosfat fosfatazları kodlayan genlerdir). *ERG9* geninin promotörü (skualen sentazı kodlayan), *PHXT1* ile değiştirilmiştir (Scalcinati vd., 2014).

SCIG22a suşunun, MVA yolunda tasarlanan diğer enzimatik adım, IPP birimlerinin geranil difosfat (GPP) ve FPP'ye yoğunlaşmasını katalize eden farnesil difosfat sentaz (FPPS) (esansiyel gen *ERG20* tarafından kodlanan) aracılık ettiği adımdır. *GDH1* tarafından kodlanan glutamat dehidrojenazın NADPH tüketen reaksiyonunu silerek azaltılmış kofaktör NADPH'nin mevcudiyetinin artırılması daha önce ürün oluşumunu iyileştirmek için uygulanmıştır. Benzer şekilde, bir *gdh1* suşunda alternatif bir amonyum kullanım yolunun *GDH2* tarafından kodlanan NAD-bağımlı glutamat dehidrojenazın aşırı eksprese edilmesiyle aktivasyonu, anabolik işlem sırasında ve maya kofaktör dengesinin bir modifikasyonunda NADH tüketiminin artmasına neden oldu. Yaptıkları bu çalışmada , tek başına *GDH1* silme etkisinin ve aynı zamanda *GDH2*'nin aşırı aşırı ekspresyonu ile α -santalen üretimi üzerindeki etkisini değerlendirilmiştir (Scalcinati vd., 2014).

Upc2 ve *Ecm22*, birçok MVA ve ergosterol yolu geninin aktivasyonundan sorumlu ana transkripsiyon faktörleri olarak tanımlanmıştır. *Upc2-1*'in aşırı ekspresyonu, izoprenoid üretimi sırasında MVA yolu genlerinin transkripsiyonel olarak yukarı regüle edilmesi için kullanılmıştır. Ancak, yol boyunca karbon akışını artırma üzerindeki etkisi, yalnız kullanıldığında çok azdır. Bununla birlikte, *ERG9* düzenlemesi ile birlikte kullanıldığında, toplam izoprenoid üretiminde belirgin bir artış sağlamıştır. Bu stratejiler mayada seskiterpen üretiminin artırılması için daha önce kullanılmış olmasına rağmen, ilk defa tek bir suşta bir araya getirilmişlerdir. Yukarıda tarif edilen tüm genetik modifikasyonlar, uzun vadeli ekim sırasında üretim suşunun genetik stabilitesini arttırmak için maya genomuna entegre edilmiştir. Karbonu istenen ürüne yönlendirmek için maya metabolik ağını manipüle etmek için prekürsör ve kofaktör tedarikini arttırmayı hedefleyen çok aşamalı bir metabolik mühendislik stratejisi kullanıldı. Kullanılan yaklaşım , referans suşu üzerinde 4 kat bir iyileştirmeye karşılık gelen 0.0052 Cmmol (Cmmol glikoz) ⁻¹ genel bir α -santalen verimi ile sonuçlanmıştır (Scalcinati vd., 2014).

Diğer bir arkaplan suşu olarak laboratuvarımızda bulunan *SCIG22a* suşu üzerine yapılan bir ek genetik modifikasyon ile bu suş *SCIG22ax* suşu haline getirilerek bu çalışmada arka plan suşu olarak kullanılmıştır. Chen ve grubu (2016) ticari ve tıbbi açıdan önemli bir bileşik olan likopenin mikrobiyal üretimi için, *S. cerevisiae* CEN.PK2'ye CrtE, CrtB ve CrtI entegrasyonu ile likopen biyosentezi yolu inşa etmişlerdir. *YPL062W* silindiğinde, az miktarda asetat birikmiş ve referans suşuna göre sitozolik asetil-KoA havuzunda yaklaşık %100 artış sağlanmıştır (Chen vd., 2016). Bu tez çalışmasında *SCIG22a* suşunda *YJL064W* genini silerek asetil-KoA miktarını arttırmayı hedefleyerek yeni bir arkaplan suşu dizayn edilmiştir.

Son arkaplan suşu olarak MVA kullanılmıştır. Arkaplan olarak *SCIG22a* suşunda *S. cerevisiae*'daki *ERG10*, *ERG13*, *ERG12*, *ERG8*, *ERG19*, *IDI* genlerinin güçlü promotorlar yardımı ile ifadeleri arttırılmıştır. Böylece *S.cerevisiae*'daki MVA yolağında bulunan ürünlerin artışı sağlanmıştır. Bu yeni suşa MVA adı verilmiştir.

MVA, *SCIG22a* ve *SCIG22ax* arkaplan suşlarına oluşturduğumuz asetil-KoA yolağı interaktif kasetini transforme ettikten sonra pHKG-G plazmitiyle her suş kombine edilerek plazmit mutant hücrelere transforme edilmiştir. pHKG plazmiti *TS*, *GGPPSERG20* ve *tHMGR* genlerini içermektedir. *tHMGR* yolakta önemli bir düzenleyici olarak çalıştığı için bu epizomal plazmitler içerisine klonlanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda ve yine literatür özetinde belirtildiği üzere *ERG20*' de yolakta akışı FPP'ye yönlendirdiği için önemli bir gendir ve GGPPS ile füzyon şeklinde klonlanmıştır.

MVAo+G, *SCIG22ao*+G ve *SCIG22axo*+G kombinasyonlarında taksadien miktarları GC-MS yöntemiyle ölçülmüştür. GC-MS analiz sonuçlarına göre referans suşu (*SCIG22a*+F) göz önünde bulundurularak suşlardaki taksadien artış miktarları karşılaştırılmıştır. Referans suşundan elde edilen miktara göre diğer suşlardaki değişim yüzde olarak belirtilmiştir ve MVAo suşunda yaklaşık olarak dört kat, *SCIG22ao* suşunda onaltı kat ve *SCIG22axo* suşunda ise beş katlık bir artış gözlenmiştir. Arkaplan suşu olarak *SCIG22ao* alıp bu suşa *YJL064W* geni silinerek dizayn edilen *SCIG22axo* suşunda taksadien miktarı azalmıştır. *SCIG22ao* suşunda *YJL064W* geninin silinmesi verimli olamamıştır fakat yukarda bahsettiğimiz Yan Chen ve grubu tarafından yapılan çalışmada asetil-KoA miktarı yüksek derecede artış göstermiştir. Buna dayanarak *SCIG22axo*+G kombinasyonu değiştirilerek farklı bir plazmit kullanılması önerilebilir ya da *YJL064W* genin silinmesi suşa metabolik yük oluşturmuş olabilir (Chen vd., 2016).

Şimdiye kadar taksol biyosentezine yönelik yapılan ilk metabolizma mühendisliği çalışması Engels ve ark tarafından 2008 yılında *S.cerevisiae*'da yapılmış olup 8.7 mg/L taksadien elde edilmiştir. Yaptıkları bu çalışmada elde edilen taksadien miktarı düşüktür fakat taksolün üretilmesi açısından sonraki çalışmalara öncülük ederek umut vaad etmektedir. Araştırmacılar mevalonat yolağında HMGR (hidroksimetilglutaril-KoA redüktaz) yerine tHMGR (truncated) formunu kullanmışlar ve bunun yolakta akışı aşağı yönde arttırdığını keşfetmişlerdir. *S.cerevisiae*'da taksol öncüsü olan GGPP miktarını arttırmak için heterolog enzimler taksolün orijinal kaynağı olan Taksus türlerinden aktarılmıştır (Engels vd., 2008). Konak organizma olarak *S.cerevisiae* seçilerek yapılan çalışmalarda en yüksek taksol üretimine Ding. Ve ark., (2014) yılında yaptıkları çalışmayla 7.2 mg/L taksadien üreterek başarmışlardır. Araştırmacılar metabolizma mühendisliği stratejilerini kullanarak Taksus türlerinden kaynak alan GGPP genlerinin sentetik formlarını kullanarak yüksek miktarda taksadien üretmek üzere en aktifini seçmişlerdir. Bu çalışmada tHMGR kullanılmış ve ERG20'nin ifadesi arttırılmıştır (Ding vd., 2014).

Şuana kadar yapılmış çalışmalarda en yüksek taksadien üretimi *E.coli*'de 1 g/L'dir. Yapılan çalışmada Ajikumar ve grubu (2011) *E.coli*'de bulunan terpenoid yolağını (DXP) *S.cerevisiae*'dan aktardıkları mevalonat yolağının genleri ile kombine ederek *E.coli*'de taksol öncülerini üretmeye çalışmışlardır. Araştırmacılar geliştirdikleri metabolizma mühendisliği stratejileri ile 16 farklı suş geliştirmişler ve sonuç olarak 1g/L taksadien üretmeyi başarmışlardır (Ajikumar vd., 2010).

Yapılan bu tez çalışması ile diğer çalışmalardan farklı olarak shake flaskta kültüre edilen hücrelerden elde edilen taksadien miktarı belirlenmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda ise hem zengin kültür kullanılmış olup hem de fed-batch ile çalışılmış olup bu durumun üretime katkısı bilinmektedir. Yapılan bu çalışma ile ADH2 geninde yapılan modifikasyon ile arkaplan suşlarında taksadien üretiminde artış elde edilmiştir. Yapılan çalışmanın sürekli kültür ortamında desteklenmesi ile üretim miktarının artacağı öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Ajikumar, P.K., Xiao, W.H., Tyo, K.E., Wang, Y., Simeon, F., Leonard, E., Mucha, O., Phon, T.H., Pfeifer, B., Stephanopoulos, G. (2010). Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, 330(6000),70-4
- Bergkessel, M. and Guthrie, C. (2013). Colony PCR. *Methods Enzymol.* 529,299-309
- Bohlmann, J. and Keeling, C.I. (2008). Terpenoid biomaterials. *Plant J.* 54(4),656-69
- Chen, Y., Daviet, L., Schalk, M., Siewers, V., Nielsen, J., (2013). Establishing a platform cell factory through engineering of yeast acetyl-CoA metabolism. *Metab Eng.* 15,48-54.
- Chen, Y., Xiao, W., Wang, Y., Liu, H.,² Li, X., Yuan, Y., (2016). Lycopene overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* through combining pathway engineering with host engineering. *Microb Cell Fact.* 15(1),113
- Choi, K.R., Jang, W.D., Yang, D., Cho, J.S., Park, D., Lee, S.Y., (2019). Systems Metabolic Engineering Strategies: Integrating Systems and Synthetic Biology with Metabolic Engineering. *Trends Biotechnol.* 167-7799(19),30003-4.
- Curran, K.A. ve Alper, H.S. (2012). Expanding the chemical palate of cells by combining systems biology and metabolic engineering. *Metab Eng.* 14(4),289-97.
- Dai, Z. and Nielsen, J. (2015). Advancing metabolic engineering through systems biology of industrial microorganisms. *Curr Opin Biotechnol.* 36,8-15.
- de Smidt, O., du Preez, J.C., Albertyn, J. (2008). The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. *FEMS Yeast Research*, 8, 967–978,
- DEKEN R. H. DE (1966). The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. *J. gen. Microbiol.* 44, 149-156

- Ding, M.Z., Yan, H.F., Li, L.F., Zhai, F., Shang, L.Q., Yin, Z., Yuan, Y.J.(2014). Biosynthesis of Taxadiene in *Saccharomyces cerevisiae*: selection of geranylgeranyl diphosphate synthase directed by a computer-aided docking strategy. *PLoS One*. 8,9(10).
- Duina, A.A., Miller, M.E. and Keeney, J.B. (2014). Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*. 197(1),33-48.
- Engels, B., Dahm, P. and Jennewein, S. (2008). Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards Taxol (Paclitaxel) production. *Metab Eng.*, 10(3-4),201-6.
- Fondi, M. and Liò, P. (2015). Genome-scale metabolic network reconstruction. *Methods Mol Biol.*, 1231,233-56.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, SG. (1996). Life with 6000 genes. *Science*. 274(5287),546, 563-7.
- Howat, S., Park, B., Oh, IS., Jin, Y.W., Lee, E.K., Loake, G.J., (2014). Paclitaxel: biosynthesis, production and future prospects. *N Biotechnol.*, 31(3),242-5.
- Jennewein, S. and Croteau, R. (2001). Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 57(1-2),13-9.
- Jessica S.Dymond (2013). Chapter Twelve - *Saccharomyces Cerevisiae* Growth Media. *Methods in Enzymology*. Volume 533,191-204.
- Keasling JD. (2012). Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering. *Metab. Eng.* 14(3),189-195

Ko, N., Nishihama, R. and Pringle J.R. (2008). Control of 5-FOA and 5-FU resistance by *Saccharomyces cerevisiae* YJL055W. *Yeast*. 25(2),155-60.

Krivoruchko, A. and Nielsen, J. (2015). Production of natural products through metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Biotechnol.*,35,7-15.

Krivoruchko, A., Zhang, Y., Siewers, V., Chen, Y., Nielsen, J. (2015). Microbial acetyl-CoA metabolism and metabolic engineering. *Metab Eng.*, 28,28-42

KunduSumita, S. and Ghosh, J (2016). Metabolic Engineering for Improving Production of Taxol. Transgenesis and Secondary Metabolism.1-22

Lee, S.Y., Kim, H.U., Park, J.H., Park, J.M., Kim, T.Y. (2009). Metabolic engineering of microorganisms: general strategies and drug production. *Drug Discov Today*, 14(1-2),78-88.

Li, X., Guo, D., Cheng, Y., Zhu, F., Deng, Z., Liu, T. (2014). Overproduction of fatty acids in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng.* (9),1841-52

Li, Y. and Pfeifer, B.A. (2014). Heterologous production of plant-derived isoprenoid products in microbes and the application of metabolic engineering and synthetic biology. *Curr Opin Plant Biol.* 19,8-13.

Lian, J., Si, T., Nair, NU., Zhao, H. (2014). Design and construction of acetyl-CoA overproducing *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Metab Eng.*, 24,139-49.

Löoke, M., Kristjuhan, K. and Kristjuhan A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*, 50(5),325-8.

Madıgan., MT. ve Martıno JM. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi.

McElroy, C. and Jennewein, S. (2017). Taxol® Biosynthesis and Production: From Forests to Fermenters. *Biotechnology of Natural Products*, 145-185

Nevoigt, E. (2008). Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 72(3):379-412.

Nielsen J. (2014). Synthetic biology for engineering acetyl coenzyme A metabolism in yeast. *MBio.* 4,5(6)

Ostergaard, S., Olsson, L. and Nielsen, J. (2000). Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *American Society For Microbiology.*, 35-50

Partow, S., Siewers, V., Bjørn, S., Nielsen, J., Maury, J. (2010). Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.*, 27(11),955-64.

Partow, S., Siewers, V., Daviet, L., Schalk, M., Nielsen, J. (2012). Reconstruction and evaluation of the synthetic bacterial MEP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*,7(12).

Pfeiffer, T. and Morley, A. (2014). An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Front Mol Biosci.* 1:17

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

Sawai, S. and Saito, K. (2011). Triterpenoid biosynthesis and engineering in plants. *Front. Plant Sci.*

Scalcinati, G., Knuf, C., Partow, S., Chen, Y., Maury, J., Schalk, M., Daviet, L., Nielsen, J., Siewers, V. (2012). Dynamic control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* engineered for the production of plant sesquiterpene α -santalene in a fed-batch mode. *Metab Eng.* (2),91-103

Scalcinati, G., Partow, S., Siewers, V., Schalk, M., Daviet, L., Nielsen, J. (2012). Combined metabolic engineering of precursor and co-factor supply to increase α -santalene production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact.* 31;11:117.

Shi, S., Ji, H., Siewers, V., Nielsen, J. (2016). Improved production of fatty acids by *Saccharomyces cerevisiae* through screening a cDNA library from the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.* 16(1),108

Shiba, Y., Paradise, E.M., Kirby, J., Ro, D.K., Keasling, J.D. (2007). Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of isoprenoids. *Metab Eng.*, 9(2),160-8.

Siewers, V., Mortensen, U. and Nielsen, J. (2010). Genetic Engineering Tools for *Saccharomyces cerevisiae*. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Third Edition. 287-301.

Solis-Escalante, D., Kuijpers, N.G., Bongaerts, N., Bolat, I., Bosman, L., Pronk, J.T., Daran, J.M., Daran-Lapujade, P. (2013). amdSYM, a new dominant recyclable marker cassette for *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 13(1),126-39.

Steensels, J., Snoek, T., Meersman, E., Picca Nicolino, M., Voordeckers, K., Verstrepen, K.J. (2014). Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiol Rev.*, 38(5),947-95.

ter Linde, JJ1., Liang, H., Davis, R.W., Steensma, H.Y., van, Dijken J.P., Pronk, J.T. (1999). Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J Bacteriol.*, 181(24),7409-13.

Tippmann, S., Chen, Y., Siewers, V., Nielsen J. (2013). From flavors and pharmaceuticals to advanced biofuels: production of isoprenoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol J.*, 8(12),1435-44.

Xie, W., Ye, L., Lv, X., Xu, H., Yu, I.H.(2015). Sequential control of biosynthetic pathways for balanced utilization of metabolic intermediates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Müh.* 28,8-18

Yadav, V.G., De Mey, M., Lim, C.G., Ajikumar, P.K., Stephanopoulos, G. (2012). The future of metabolic engineering and synthetic biology: towards a systematic practice. *Metab Eng.*, 14(3),233-41.

Yuan, Y., Du, J. and Zhao, H. (2013). Customized optimization of metabolic pathways by combinatorial transcriptional engineering. *Methods Mol Biol.*, 985,177-209.

http1 http://cshprotocols.cshlp.org/content/2017/4/pdb.rec089565.full?text_only=true

http-2 https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/242820.pdf

http-3 <https://blog.addgene.org/plasmids-101-colony-pcr#>

http-4 <http://himedialabs.com/TD/G076.pdf>