



***S. cerevisiae*'de LİKOPEN ÜRETİMİ İÇİN GAL PROMOTORU İLE
İNDÜKLENEBİLİR EKSPRESYON VEKTÖRÜNÜN TASARIMI**

Yüksek Lisans Tezi

Tuğçe KOLAÇ

Eskişehir 2024

***S. cerevisiae*'de LİKOPEN ÜRETİMİ İÇİN GAL PROMOTORU İLE
İNDÜKLENEBİLİR EKSPRESYON VEKTÖRÜNÜN TASARIMI**

Tuğçe KOLAÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hülya KARACA ATSAROS

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Handan Açelya KAPKAÇ

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Temmuz 2024

Bu tez çalışması TUBİTAK 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Bursu kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Tuğçe KOLAÇ'ın "S. cerevisiae'de Likopen Üretimi için GAL Promotoru ile İndükenebilir Ekspresyon Vektörünün Tasarımı" başlıklı tezi .../.../20.. tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Hülya KARACA ATSAROS	
Üye (Tez Danışmanı)	: Dr. Öğr. Üyesi Handan Açelya KAPKAÇ	
Üye	: Prof. Dr. Meral YILMAZ CANKILIÇ	
Üye	: Doç. Dr. Volkan KILIÇ	

.....
Prof. Dr.

Enstitü Müdürü

ÖZET

S. cerevisiae'de LİKOPEN ÜRETİMİ İÇİN GAL PROMOTORU İLE İNDÜKLENEBİLİR EKSPRESYON VEKTÖRÜNÜN TASARIMI

Tuğçe KOLAÇ

Farmasötik Mikrobiyoloji

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Temmuz 2024

Danışman: Doç. Dr. Hülya KARACA ATSAROS

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Handan Açelya KAPKAÇ

Likopen, kırmızı meyve ve sebzelerde bulunan ve yaygın takviye gıda olarak kullanılan bir karotenoiddir. Anti-oksidan özelliğiyle bilinmekte olan likopen aynı zamanda kardiyoprotektif, anti-kanser, anti-inflamatuvar etkilere de sahiptir. Ticari üretimi geleneksel domates ekstraktlarından olan likopenin, son zamanlarda metabolizma mühendisliği gibi yenilikçi yöntemlerle daha verimli üretimi sağlanmaktadır. Bu mühendislik stratejileri, mikroorganizmaların metabolik yollarını düzenleyerek likopen üretimini artırmayı amaçlamaktadır. Özellikle *S. cerevisiae*, likopen sentezinde ideal bir arka plan hücresi olarak kullanılmaktadır.

Likopen ökaryotik organizmalarda mevalonat (MVA) yolağında, prokaryotik organizmalarda 1-deoksü-D-ksilüloz-5-fosfat (DXP) yolağında sentezlenmektedir. Bu yollarda bulunan *CrtE*, *CrtI* ve *CrtB* genleri likopen sentezi için önemli ara ürünleri sentezlemektedir. GAL promotörü güçlü bir promotör olduğundan likopen üretim çalışmalarında *CrtE*, *CrtI* ve *CrtB* genlerinin ifadesi için kullanılmaktadır. Bu çalışmada bu amaçla, likopen ekspresyon vektörü tasarlanmıştır. Tasarlanan vektör, indüklenebilen GAL promotörünü, *CrtE*, *CrtI* ve *CrtB* genlerini, tGPM1, tPGK1 ve tCYC1 terminasyon bölgelerini içermektedir. Ayrıca tasarlanan vektör, *S. cerevisiae* genomunda galaktoz metabolizmasının düzenlenmesinden sorumlu *GAL80* geninin silinmesini ve aynı bölgeye likopen üretimini sağlayacak kasetin integrasyonunu sağlamak üzere GAL80-up ve GAL80-down bölgelerini içermektedir.

Anahtar Sözcükler: Likopen, Metabolizma Mühendisliği, Ekspresyon Vektörü

ABSTRACT

Design of an Inducible Expression Vector with the GAL Promoter for Lycopene

Production in *S. cerevisiae*

Tuğçe KOLAÇ

Department of Pharmaceutical Microbiology

Anadolu University, Graduate School, June 2024

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hülya KARACA ATSAROS

Co-Supervisor: Dr. Lecturer Handan Açelya KAPKAÇ

Lycopene is a carotenoid found in red fruits and vegetables and is widely used as a dietary supplement. Known for its antioxidant properties, lycopene also has cardioprotective, anti-cancer, and anti-inflammatory effects. While its commercial production traditionally comes from tomato extracts, recent innovative methods like metabolic engineering have enabled more efficient production. These engineering strategies aim to enhance lycopene production by regulating the metabolic pathways of microorganisms. Specifically, *S.cerevisiae* is used as an ideal background cell in lycopene synthesis.

Lycopene is synthesized through the mevalonate (MVA) pathway in eukaryotic organisms and the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP) pathway in prokaryotic organisms. The genes *CrtE*, *CrtI*, and *CrtB* in these pathways are important for synthesizing intermediate products necessary for lycopene synthesis. Since the GAL promoter is a strong promoter, it is used for the expression of *CrtE*, *CrtI*, and *CrtB* genes in lycopene production studies. In this study, a lycopene expression vector was designed for this purpose. The designed vector includes the inducible GAL promoter, *CrtE*, *CrtI*, and *CrtB* genes, and the termination regions tGPM1, tPGK1, and tCYC1. Additionally, the designed vector contains GAL80-up and GAL80-down regions to delete the GAL80 gene, which is responsible for the regulation of galactose metabolism in the *S. cerevisiae* genome, and to integrate the cassette necessary for lycopene production into the same region

Keywords: Lycopene, Metabolic Engineering, Expression Vector

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmam boyunca bana sonsuz destek ve rehberlik sağlayan danışmanlarım Doç. Dr. Hülya KARACA ve Doç. Dr. Handan Açelya KAPKAÇ'a

Yüksek lisans serüvenim boyunca her zaman yanımda iyi ki var olan, bilgi ve tecrübesini esirgemeyen, sabırla bana yol gösteren Dr. Murat KAYA'ya

Tüm zorluklarla başa çıkmamı sağlayan ve beni her daim cesaretlendiren çok sevgili çalışma arkadaşlarım Melis HACIOĞLU, Hacer AKDAĞ, İrem Nur ÖZKAN, Aygün MUSTAFAZADE, değerli hocalarım Öğr. Gör. Pervin SOYER ve Arş. Gör. Mustafa Güçlü ÖZARDA'ya

Aldığım her kararda arkamda duran ve beni destekleyen babam Kemal KOLAÇ, annem Tülay KOLAÇ, ablam Tuba ALPERTONGA ve abim Öğr. Gör. Turgay KOLAÇ'a sonsuz teşekkürler..

Tuğçe KOLAÇ

Temmuz 2024

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

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.

.....

(İmza)

Tuğçe KOLAÇ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii-viii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Terpenoidler.....	2
2.2. Likopen.....	2
2.3. Likopen Eldesi.....	4
2.4. Metabolik Yol Mühendisliği.....	5
2.5. Likopen Üretim Yolakları.....	7
2.6. Likopen Üreten Çalışmalar.....	11
2.7. Model Oranizma <i>S.cerevisiae</i>	13
2.8. Galaktoz Metabolizmasından Sorumlu GAL Promotorları.....	13
2.9. Amaç.....	14
3. YÖNTEM	18
3.1. Kullanılan Suşlar, Besiyerleri ve Kültürizasyon Koşulları	18
3.2. Likopen Kasetinin Tasarlanması.....	18
3.2.1. Likopen Kaseti için Kullanılan Primerler	18

	<u>Sayfa</u>
3.3. Hedef Gen, Terminasyon ve Promotor Bölgelerinin Amplifikasyonu, Saflaştırılması ve Kasetin Oluşturulması	19
3.4. Stok ve Üretim için <i>E.coli</i> hücrelerinin Kompetent Hale Getirilmesi, Transformasyon ve İzolasyon Aşamaları	22
4. BULGULAR.....	24
4.1. Likopen Üretim Kaseti Genlerinin Amplifikasyonu ve pSP-GM1 Vektörüne Klonlanması.....	24
4.2. Likopen Üretim Kasetine URA Marker'ının Eklenmesi	27
5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	29
KAYNAKÇA	32

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1. Likopen üretim kasetini oluşturmak için kullanılan primerler.....	19
---	----



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Terpenlerin farklı organizmalarda üretim yolları olan MVA (mevalonat) yolağı ve DXP (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate) yolağı.....	8
Şekil 2.2. <i>S. cerevisiae</i> 'de GGPP'ye kadar doğal olarak üretilirken crtE, crtB ve crtI genlerinin heterolog olarak klonlanması likopen üretimini artırmaktadır.....	10
Şekil 2.3. Tasarımı yapılan 1. Parça, 2. Parça ve 3. Parçanın SnapGene haritası.....	16
Şekil 2.4. pSP-GM1-LÜK Snapgene Viewer haritası.....	17
Şekil 4.1. Genlerin PCR sonucunda agaroz jel görüntüleri.....	24
Şekil 4.2. 1. Ve 2. parçanın restriksiyon enzimleri ile kesim sonucunda agaroz jel görüntüleri.....	25
Şekil 4.3. 3. parçanın PCR sonucunda agaroz jel görüntüsü.....	25
Şekil 4.4. Vektörün transformasyon sonucunda koloni PCR agaroz jel görüntüsü.....	26
Şekil 4.5. Pozitif koloninin restriksiyon enzimi ile teyit edilmesi.....	26
Şekil 4.6. URA gen bölgesinin PCR sonucunda agaroz jel görüntüsü.....	27
Şekil 4.7. 1-2. Parça ve 3. Parçanın restriksiyon enzimleri ile kesimi.....	27
Şekil 4.8. Vektörün DH5 α 'ya transformasyon tabakları.....	28
Şekil 4.9. URA eklenmiş vektörün transformasyon sonucu koloni PCR	28

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACC	: Acetyl-CoA Carboxylase
ACS	: Acetyl-CoA Synthetase
ADH2	: Alcohol Dehydrogenase 2
ATP	: Adenozin trifosfat
<i>B. trispora</i>	: <i>Blakeslea Trispora</i>
CENPK	: <i>S.cerevisiae</i> suşu
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
DXP	: 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate
HMGR	: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase
LB	: Lysogeny Broth
MPTP	: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MVA	: Mevalonate (Mevalonat)
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
ROS	: Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
IGF-1R	: Insulin Like Growth Factor 1 Receptor(İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 Reseptörü)
<i>S. cerevisiae</i>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

1. GİRİŞ

Likopen, kırmızı meyve ve sebzelere rengini veren bir pigment olup insan sağlığı açısından oldukça faydalı bir sekonder metabolittir (Shi ve Maguer 2000; Rao, Ray ve Rao 2006). Anti-oksidan, kardiyoprotektif, anti-kanser, anti-inflamatuar özelliklerinden dolayı sıklıkla kullanılan bir takviye gıdadır (Elango ve Asmathulla 2017). İnsan sağlığının yanı sıra kozmetikte anti-aging ve doğal renklendirici olarak kullanılmaktadır (Abir ve Mahamud 2023). Likopen ihtiyacını karşılamak için genellikle domates ekstraktı tercih edilse de, son yıllarda metabolizma mühendisliği gibi yenilikçi disiplinlerin kullanılması, likopen üretiminde daha verimli ve sürdürülebilir çözümler sunmaktadır (Landrier ve Breniere 2023).

Metabolizma mühendisliği, mikroorganizmaların metabolik yollarını biyoteknolojik yöntemler kullanarak düzenlenmesini ve kontrol altına alınmasını kapsamaktadır (Ciocan ve Elinav 2023). Metabolizma mühendisliği sayesinde yeni ürünlerin geliştirilmesi, endüstriyel süreçlerde verimliliğin artırılması, sürdürülebilir üretim yöntemleri ve kişiselleştirilmiş tıbbi tedavilerin geliştirilmesi sağlanmaktadır (Eskandar 2023). Likopen gibi yaygın kullanılan takviye gıdaların metabolizma mühendisliği ile üretilmesi oldukça avantaj sağlamaktadır (Du ve Sun 2023).

Metabolizma mühendisliği ile likopen üretmek için, yüksek verimlilik sağlayan, genetik yapısı kolay anlaşılabilir olan ve mühendislik çalışmalarında sıklıkla kullanılan *S. cerevisiae* ideal arka plan hücresidir (Zhao ve Ma 2024). Likopen sentezinin gerçekleştiği ökaryotlarda mevalonat (MVA) ve prokaryotlarda 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP) yollarında likopen öncülerinin üretiminden sorumlu genler olan *CrtE* (karotenoid biyosentez geni E), *CrtI* (fitoen desaturaz) ve *CrtB* (fitoen sentaz) kilit rol oynamaktadır.

Bu çalışmanın amacı *S. cerevisiae*'ye likopen ürettirebilmek üzere, integratif kaset içeren ve tekrar kullanımı mümkün olan bir vektor tasarlamaktır. Bu kaset indüklenebilen, güçlü GAL promotoru ile *CrtE*, *CrtB* ve *CrtI* genlerinin ifadesini artırmak üzere bölgeler içermektedir. GAL promotorunun kullanabilmesi için galaktoz metabolizmasının düzenlenmesi gerekmektedir. Galaktoz metabolizmasının düzenlenmesinden sorumlu genlerden biri olan *GAL80* geni silinerek güçlü GAL promotorunun indüklenmesi sağlanabilmektedir (Peng ve Wood 2018; Bahieldin ve Gadalla 2014).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Terpenoidler:

İzoprenoidler olarak da adlandırılan terpenler, $(C_5H_8)_n$ formülüne sahip lipid türevleridir. Terpenler, bitkilerin reçinelerinin, uçucu yağlarının ve kokularının ana bileşenlerini oluşturmaktadır. Terpenoidler, terpenlerin hidroksilasyonu, esterleşmesi veya oksidasyonu ile elde edilen bileşiklerdir. Terpenlere göre daha karmaşık fonksiyonel gruplara sahip bileşikler olan terpenoidler esas olarak bitkilerde bulunur ve bitkilerdeki uçucu yağların çoğunluğunu oluşturmaktadır (Perveen ve Al-Taweel 2018). Ancak hayvanlar, arkealar, funguslar, bakterilerde de bulunan terpenoidler çeşitli biyolojik işlevlere sahip sekonder metabolitlerdir (Joshee, Dhekney ve Parajuli 2019).

Antikanser, antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, kardiyoprotektif ve antidiyabetik etkilere sahip terpenoidler farmasötik, kozmetik, tarım, nütresötik, tatlandırıcı, gıda takviyesi ve biyofuel üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Canlılarda iki farklı yolak üzerinden sentezlenen terpenoidler; arkea, fungi, bitki sitoplazması ve diğer ökaryotlarda genel olarak mevalonat yolağı (MVA) üzerinden sentezlenmektedir (Couillaud ve Leydet 2021).

2.2. Likopen

Likopen $C_{40}H_{56}$ kimyasal formülüne sahip kırmızı-pembe pigment çıkaran terpenoid ailesine ait bir tetraterpenoid'dir (Brahmachari 2021). Domates, karpuz, kayısı, greyfurt ve guava gibi besinlerde doğal olarak bulunan likopen, işlenmiş ürünler arasında domates salçası, ketçap ve domates suyu gibi ürünlerde de mevcuttur. En zengin likopen kaynağının ise domates kabuğu olduğu bilinmektedir. Besin yardımı ile yeterince alınamayan likopen takviye gıda olarak alınabilmektedir (Khan ve Sevindik 2021; Machmudah ve Winardi 2012).

Antioksidan, kardiyoprotektif, antikanser, anti-inflamatuvar, nörobiyolojik, uyku düzenlenmesi, özellikleri sayesinde likopen insan sağlığı için oldukça önem arz etmektedir (Khan ve Sevindik 2021; Przybylska 2020).

Likopenin, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu biyolojik membranlardaki oksidatif hasara karşı hücreleri koruduğu bilinmektedir. Bu sayede, gıda bileşenlerinin oksijenle reaksiyona girmesini engelleyerek bozulabilir ürünlerin bozulmasını geciktirmektedir. Ayrıca, likopen hidrojen peroksit, hidroksi radikalleri ve nitrojen

dioksit gibi reaktif türleri nötralize edebilir. Bunun yanı sıra, hücredeki enzimatik (süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz gibi) ve enzimatik olmayan antioksidanların (E ve C vitaminleri gibi) aktivitelerini destekleyici ve güçlendirici bir etkiye sahiptir. Bu özellikleri sayesinde likopen, antioksidan özellik göstermektedir ve serbest radikal temizleyici olarak görev yapmaktadır (Bacanli, Başaran ve Başaran 2017).

Kardiyoprotektif özelliği sayesinde kardiyovasküler hastalıklardan biri olan ve profilaksi önlem gerektiren ateroskleroz (arterlerde kolesterolle tıkanmış makrofajların subendotelyal birikimi) tedavisinde likopen, insan makrofajlarında oksisterol ile indüklenen proinflamatuvar sitokin ve ROS üretimini bozarak ateroskleroz plak oluşumunu engellemektedir. Bunun yanı sıra likopen, endotel fonksiyonunun iyileştirilmesi (nitrik oksit biyoyararlanımı ve kan akışı), metabolik aktivite (kolesterol sentezini inhibe ederek) ve kan basıncının kontrolü gibi çeşitli kardiyovasküler olarak faydalı etkilere sahiptir (Mozos ve Stoian 2018; Palozza ve Simone 2011).

Likopenin anti-kanser özellikleri, birçok doku kültürü deneyiyle desteklenmiştir. Bu deneyler, likopenin kanserli hücrelerde büyümeyi engellemek için hücre döngüsünü inhibe ettiğini ve apoptozu (programlanmış hücre ölümü) indükleyerek kanser hücrelerinin ölümünü teşvik ettiğini göstermektedir. Ayrıca, likopenin meme kanseri hücrelerinde, insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü (IGF-1R) yolunu zayıflatarak hücre çoğalmasını engelleyici bir rol oynadığı belirlenmiştir. Bu nedenle, likopenin kanser hücresi büyümesini engellemede ve meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmede önemli bir potansiyele sahip olduğu görülmektedir (Tjahjodjati ve Sugandi 2020).

Likopenin lipofilik yapısı, hücre zarının inflamatuvar mediatör sinyal yollarını düzenleyerek ve antioksidan ekspresyonunu aktive ederek anti-inflamatuvar etkiler göstermesine olanak tanınmaktadır. Bu anti-inflamatuvar özellikleri, likopeni kanser tedavisi, metastaz ve tümör ilerlemesinin engellenmesi, obezite ile ilişkili metabolik bozuklukların ve nörodejeneratif hastalıkların önlenmesi gibi birçok alanda güçlü bir ajan haline getirmektedir. Likopen, nöro-inflamatuvar sinyallemenin baskılanması yoluyla özellikle nörodejeneratif hastalıkların önlenmesinde etkili olmaktadır (Mozos ve Stoian 2018; Chen, Huang ve Chen 2019).

Likopen, merkezi sinir sistemi (MSS) üzerinde etkilidir ve çeşitli nörolojik hastalıkların önlenmesinde rol oynamaktadır. Örneğin, Alzheimer ve epilepsi gibi

hastalıklarda oksidatif stresi azaltarak etkili olmaktadır. Ayrıca, Parkinson hastalığına neden olan 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) kaynaklı dopamin düşüklüğünü önlemeye yardımcı olmaktadır. Likopen ayrıca nöro-inflamasyonu baskılayarak ve lipid düzensizliğiyle ilişkili bilişsel bozulmalara karşı koruma sağlamaktadır (Chen, Huang ve Chen 2019).

Likopen, uyku düzenlemesinde de önemli bir rol oynar çünkü vücudunuzun besin alımı ve metabolizması üzerinde etkisi vardır. Likopen içeren gıdaları tüketmek, metabolizmayı düzenler ve bu da uyku kalitesini iyileştirmektedir. Özellikle, likopenin uyku başlangıcını kolaylaştırma ve uyku süresini düzenleme potansiyeli vardır. Bu, daha hızlı uyku durumuna geçmeyi ve daha uzun süre dinlendirici bir uyku geçirmenizi sağlamaktadır. Dolayısıyla, likopenin diyet ve metabolizma üzerindeki etkileri uyku düzenini optimize etmeye yardımcı olmaktadır (Grandner ve Jackson 2014).

Likopen sağlık alanı dışında tarımda, kozmetikte ve gıda sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır (Khan ve Sevindik 2021). Likopen, son zamanlarda kozmetik endüstrisinde popüler hale gelmiştir ve cilt bakım ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu doğal pigment, antioksidan özellikleriyle bilinir ve cildi serbest radikallerin neden olduğu hasara karşı korumaktadır. Likopen, güneşin zararlı UV ışınlarına karşı cildi korurken aynı zamanda cilt tonunu eşitlemeye ve lekeleri azaltmaya yardımcı olmaktadır. Anti-inflamatuar özellikleri sayesinde, ciltteki tahrişi hafifletir ve kızarıklığı azaltmaktadır. Ayrıca, likopen saç bakım ürünlerinde kullanılmaktadır ve saç derisini besleyerek sağlıklı saç büyümesini teşvik etmektedir. Likopen, kozmetik ürünlerde kullanılarak doğal bir parlaklık ve genç bir görünüm sağlamaktadır (Andreassi ve Stanghellini 2002; Bin-Jumah ve Alwakeel 2021).

2.3. Likopen Eldesi

Ticari likopenin büyük bir kısmı, domatesten ekstre edilmektedir. Domatesin uzun gelişim süreci ve ekstraksiyon işleminin stabil olmaması ve sonrasında organik çözücülerden eleme gibi temel sorunları nedeni ile bu şekilde eldesi karmaşık bir süreçtir. Mikrobiyal üretim için ise genel olarak karotenoid üretebilen *Blakeslea trispora*, *Xanthophyllomyces dendrorhous* ve *Dunaliella salina* türlerinin fermentasyon koşullarının iyileştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Likopenin fermentasyonla eldesinde ise ortama ek siklaz inhibitörlerinin eklenmesi gerekmektedir ki bu durum gıda güvenliği konusunda ciddi sıkıntı yaratabilmektedir (Martínez-Cámara ve Rubio 2018).

Takviye olarak alınan insan sağığına faydalı birçok gıdanın eldesi meyve, bitki veya fungus ekstresi ile sağılanmaktadır. Ancak ekstrakt olarak elde edilmesi bitki, meyve veya fungusun gelişim süresi bakımından hem uzun bir süreç olup hem de çeşitli kimyasallara tabii tutulup arındırma işleminin zahmetinden dolayı oldukça zorlu bir süreçtir. Domates ekstresi olarak üretilen likopenin ekstraksiyon sürecinde ısı ve ışığa duyarlılığı, yağda çözünmesi gibi engellerle karşılaşılır. Üretimden sonra saklanma aşamasında ise kolayca bozulabilmesi gibi dezavantajlar oluşturmaktadır (Ha ve Kim 2015).

Bu dezavantajların önüne geçmek adına daha pratik bir yol olan rekombinant takviye gıda üretim stratejileri yaygın olarak kullanılmaktadır. Rekombinant üretim bitki, hayvan, fungus veya mikroorganizmaların zaten sentezlediğı ve ancak saflaştırmasının mümkün olmadığı insan sağığına faydalı olan gıdaların istenen ürüne yönelik manipüle edilmiş gen/genlerin uygun bir taşıyıcı (vektör) aracılığı ile hücre kültürü, mikroorganizma gibi konakçılarda, uygun ortamlarda sentezlenmesinin sağılanması ve eldesidir. Kısa sürede çok daha fazla ürün eldesi mümkün olmakla beraber saflaştırılma aşaması çok daha pratik olmaktadır (Schillberg ve Spiegel 2022).

2.4. Metabolik Yol Mühendisliğı

Metabolizma mühendisliğı, metabolik yollarda üretilen metabolitlerin ticari boyutlarda üretilmesini amaçlayan bir alan olup, bunu metabolik yolak bilgisi ile genetik mühendisliğı pratiğini birleştirerek gerçekleştirmektedir. İstenilen son ürünün eldesi için metabolik yollarda yapılan değışiklikler şu şekilde sıralanabilir;

- 1) Ürüne giden metabolik yolda bulunan genlerin güçlü promotorlar kontrolü altında çoklu ifadesi,
- 2) Ürün ile aynı kaynakları paylaşan dallanma noktalarının (rekabetçi yolakların) tamamen elemine edilmesi, ancak hücrenin yaşamsal aktiviteleri için gerekli ise bu genlerin ifadesinin kontrollü bir şekilde azaltılması,
- 3) Üretimi sağılayan heterolog enzimlerin, yüksek üretici organizmalardan, tasarlanan yeni arka plan hücresinde ifadesi (Venayak ve Anesiadis 2015; Nielsen ve Keasling 2016).

Metabolizma mühendisliğı, orijinal kaynağından yeteri kadar elde edilemeyen ürünlerin pazar ihtiyacını karşılamak üzere üretimini gerçekleştirebilmektedir. Bu üretim bitki ve mikroorganizmalar başta olmak üzere genellikle bir arka plan hücresi olarak

mikroorganizmalarda gerçekleştirilmektedir. Mikroorganizma aracılı üretilen ürünlerin avantajları şu şekilde sıralanabilir,

1. Doğal yollarla az miktarlarda elde edilen ürünlerin mikroorganizmaların üreme hızları ve koşulları nedeni ile çok daha hızlı ve fazla miktarda üretilmesi,
2. Ürünün daha fazla üretiminin sonucunda piyasa değerinin düşmesi ve kolay erişim sağlanması,
3. İnsan sağlığı için takviye edici gıdaların hayvan ve bitki temelli üretiminde istenmeyen bazı yan ürünlerin olabilme sorununa karşılık metabolizma mühendisliği ile doğrudan sentezi,
4. Kişisel tıp imkanları kullanılarak insan sağlığı için en uygun ürün kombinasyonunun seçilmesi ve ürünün iyileştirilerek pazara sunulmasıdır (Yadav ve De Mey 2012).

Metabolizma mühendisliği son yirmi yılda, biyo-yakıt üretimi, tarım ürünlerinin iyileştirilmesi (böcek ilaçları), hayvansal gıdaların korunması, ilaç üretimi gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Tasarlanmış türler ile şu anda biyohidrojen, lignoselüloz, nişasta, biyoetanol, ilaç hammaddeleri ve bazı ilaçlar gibi biyo-ürünler ticari olarak üretilmektedir (Hollinshead, He ve Tang 2014).

Likopen sentezinde, doğal metabolik yolların optimize edilmesi veya yeni metabolik yolların entegrasyonu gibi metabolik mühendislik stratejileri kullanılmaktadır. Bu yöntemler, hücrelerin metabolik ağı üzerinde değişiklikler yaparak likopen sentezini daha verimli bir şekilde sağlamaktadır (Farmer ve Liao 2000).

Metabolizma mühendisliği stratejileri adımlarında hücre seçimi oldukça önemlidir. Sıklıkla, *Escherichia coli* veya *Saccharomyces cerevisiae* gibi mikroorganizmalar tercih edilmektedir. Seçilen mikroorganizmanın genomu üzerinde metabolizma mühendisliği teknikleri kullanılarak gerekli değişiklikler yapılmaktadır. Bu değişiklikler, likopen sentez yollarını optimize etmek veya güçlendirmek amacıyla gerçekleştirilir. Seçilen hücre hattında sentetik yolların entegrasyonu ile likopen sentez yolları hedef mikroorganizmanın genomuna entegre edilmekte veya plazmitlere klonlanmaktadır. Ayrıca likopenin sentezini sağlamak için gerekli olan enzimlerin ve metabolitlerin hücre içinde doğru sırayla üretilmesini de sağlanmaktadır (Alper ve Jin 2005; Kim ve Keasling 2001).

Arka plan hücrelerinde yapılan modifikasyonların ardından fermantasyon süreci ile genetik olarak müdahale edilmiş mikroorganizmalar, uygun besin ortamlarında fermantasyon sürecine tabi tutulmaktadır. Mikroorganizmalar bu süreçte likopen üretmeye başlamaktadır. Fermantasyon süresi ve şartları, likopen üretimini optimize etmek için kontrol edilmektedir. pH, sıcaklık, oksijen seviyeleri ve besin maddeleri gibi parametreler bu aşamada belirlenmektedir (Jing ve Guo 2021).

Üretimi gerçekleşen ürünün ayırma ve saflaştırma adımında, fermantasyon sürecinin sonunda likopen içeren hücreler ve diğer bileşenlerin ayrılması gerekmektedir. Bu genellikle filtrasyon veya santrifüj gibi çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Ardından, likopenin saflaştırılması için çeşitli kimyasal ve fiziksel işlemler uygulanmaktadır. Bu adımlar, likopenin izole edilmesi ve yüksek saflıkta bir ürün elde edilmesini sağlamaktadır. Likopen ürünlerinin analizi için çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), likopenin miktarını ve saflığını belirlemek için, UV-VIS spektrofotometri, likopenin özgün emisyonunu incelemek için kullanılmaktadır. Kütle spektrometrisi (MS) likopenin kütesini ve yapısal analizini sağlamaktadır. Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi likopenin kimyasal yapısını belirlerken, gaz kromatografisi (GC) likopen konsantrasyonunu ve diğer bileşenlerle etkileşimini incelemektedir. Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi (HRMS) likopenin kütesini belirlemek ve kimyasal formülü doğrulamak için kullanılmaktadır. Bu teknikler, likopen ürünlerinin kalitesini değerlendirmek ve gereksinimleri karşılamak için önem arz etmektedir (Naviglio ve Caruso 2008).

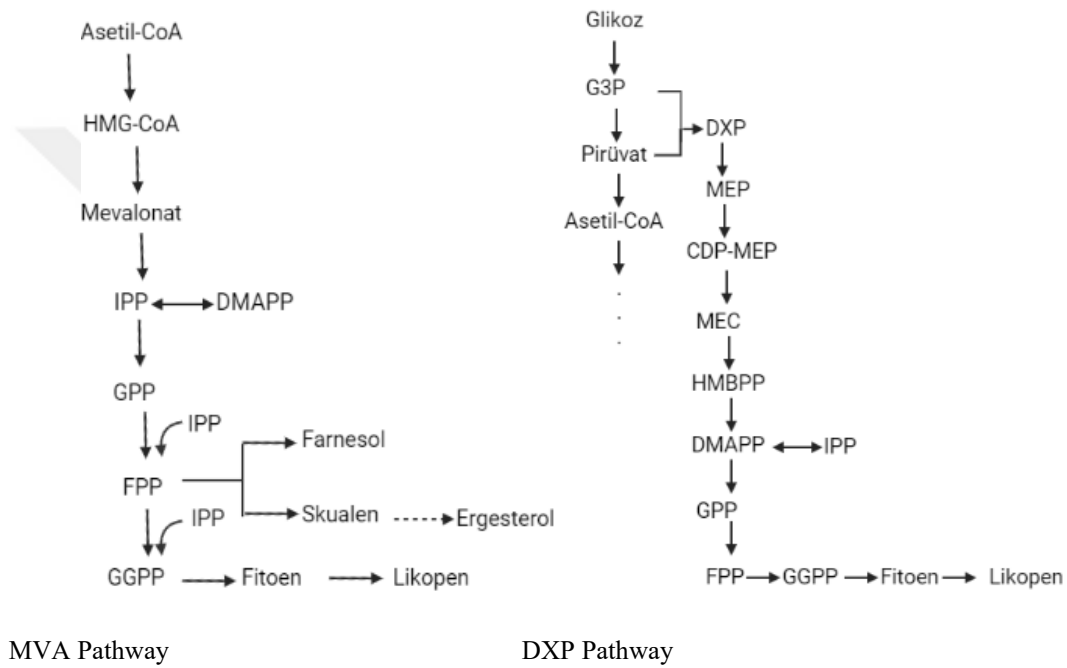
2.5. Likopen Üretim Yolakları

Metabolizma mühendisliği stratejileri ile terpenoid, alkaloid, poliketit, nonribozomal peptidler gibi çok sayıda sekonder metabolitin üretilmesi mümkündür. Bunların arasında terpenoidler en büyük sınıfı oluşturmaktadır. Canlılarda iki farklı yolak üzerinden sentezlenen terpenoidler; arkea, fungi, bitki sitoplazması ve diğer ökaryotlarda genel olarak mevalonat yolağı (MVA), prokaryotlarda 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP) yolağı üzerinden sentezlenmektedir (Madia ve V.N. 2021).

MVA yolağında kolesterol sentezinin yanı sıra izoprenoid sentezi, bitkilerde hidrokarbon emisyonunu, pigmentasyonu ve büyümeyi sağlarken; ökaryotlarda ise hücre zarının akışkanlığının düzenlenmesini, sinyal verici olarak ve hormonal düzenleyici

olarak iş görmesi nedeniyle oldukça önem arz etmektedir (Castaño-Cerezo ve Kulyk-Barbier 2019).

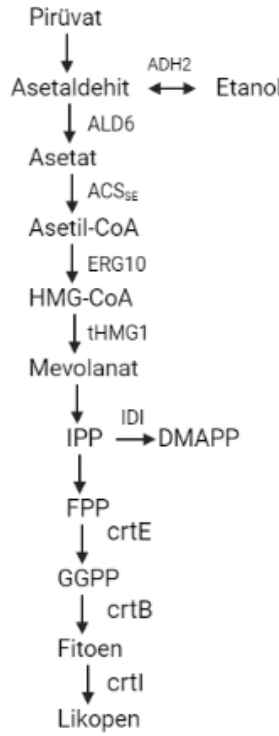
Ökaryotlar, arkeler ve bazı bakterilerin endoplazmik retikulumunda bulunan mevalonat yolağı kolesterol ve steroid sentezinden sorumlu HMGR enzimini kodlayan *HMG1* ve *HMG2* genlerine sahip olması sayesinde hücre metabolizması için temel kabul edilen yolaklardandır (Kuranda ve François 2009; Karlic ve Thaler 2015).



Şekil 2.1. Terpenlerin farklı organizmalarda üretim yolları olan MVA (mevalonat) yolağı ve DXP (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate) yolağı (Wang ve Sun 2020; Niu ve Lu 2017).

MVA yolağının ana bileşenleri arasında asetat, asetil-CoA ve mevalonat gibi moleküller bulunmaktadır. Mevalonat daha sonra izoprenoidlerin sentezinin yapı taşları olan izopentenil difosfat (IPP) ve dimetilalil difosfat (DMAPP) gibi ara ürünlere dönüştürülmektedir. MVA yolağında bulunan farnesil difosfat (FPP) ve geranylgeranyl difosfat (GGPP) likopenin yapı taşlarını oluşturmaktadır. Yolaktaki FPP ve GGPP'nin ifadesi artırılmakta ve likopen üretimi desteklenmektedir (Yang ve Guo 2014).

DXP yolağı, pentoz fosfat yolu olarak da bilinmektedir ve bakteriler ve bitkilerde bulunmaktadır. Yolağın başlangıç maddesi, glikolitik yolağın ürünlerinden biri olan G3P (gliserinaldehit-3-fosfat) veya pirüvat olmaktadır. G3P, glikoliz yolu boyunca üretilirken, pirüvat ise glikoliz sonunda elde edilmektedir. Bu bileşikler, DXP yolağının başlangıç reaksiyonunda kullanılmaktadır ve DXP sentezine yol açmaktadır. Yolağıdaki IPP ve DMAPP, izoprenoid sentezinde (likopen) kullanılan önemli ara ürünlerdir. DXP yolağı üzerinde yapılan modifikasyonlar özellikle mikrobiyal hücrelerde likopen sentezini artırmak için kullanılan stratejilerdir. Bu yolak, likopenin sentezi için geleneksel MVA (mevalonat) yolağına alternatif bir yaklaşım sunmaktadır (Ward, Chatzivasilieou ve Stephanopoulos 2018; Li ve Wen 2022).



Şekil 2.2 *S. cerevisiae*'de GGPP'ye kadar doğal olarak üretilirken *crtE*, *crtB* ve *crtI* genlerinin heterolog olarak klonlanması likopen üretimini artırmaktadır.

Anaerobik solunumun bir parçası olarak fermantasyon sürecinde maya hücrelerinde, pirüvattan asetaldehit sentezi gerçekleşmektedir. Bu reaksiyon, pirüvat dekarboksilaz enzimi tarafından katalizlenir ve alkol fermantasyonu sürecinin temelini oluşturmaktadır. Asetaldehit alkol dehidrogenaz enzimi tarafından etanol veya diğer alkol türevlerine indirgenmektedir. Asetaldehitten alkol fermentasyonunu gerçekleştirecek

olan *ADH2* geni baskılanarak metabolik yolak asetat sentezine ve dolayısı ile likopen aşırı ifadesine yönlendirilmektedir. Asetaldehitin Asetil-CoA'ya dönüşmesi için *ALD6* ve *ACS* genleri aşırı ifade edilmektedir. Asetil-CoA seviyelerinin artması, likopen sentezi için *tHMG1* geninin kodladığı, mevalonat öncüsü olan HMG-CoA sentezini artırmaktadır. Sonuç olarak, mevalonat sentezi artırılmış olacağından; sırası ile FPP'yi kodlayan gen olan *CrtE*'nin aşırı ifadesi, GGPP'yi kodlayan gen olan *CrtB*'nin aşırı ifadesi ve fitoenden likopen sentezini gerçekleştiren *CrtI* geninin aşırı ifadesi, likopen sentezini artıracak şekilde modifiye edilmiş olmaktadır (Andersen ve Llorente 2021; Schwartz, Frogue ve Wheeldon 2017).

Likopen üretmek için arka plan hücresi olarak *E. coli* veya *S. cerevisiae* kullanıldığında *CrtE* (geranil geranil di fosfat), *CrtI* (fitoen desaturaz) ve *CrtB* (fitoen sentaz) genlerinin bu arka plan hücrelerinde heterolog olarak ifade edilmesi gerekmektedir (**Şekil 2.2**) çünkü *CrtE*'nin kodladığı geranil geranil di fosfataz enziminin bu arka plan hücrelerinde katalitik aktivitesi düşük iken *CrtB* ve *CrtI* tarafından kodlanan enzimler bu arka plan hücrelerinde (*E. coli* ve *S. cerevisiae*) hiç ifade edilmemektedir. Dolayısıyla bu genlerin, likopenin doğal üreticisi olan organizmalardan arka plan hücrelerine aktarılması gerekmektedir (Niu ve F.-X. 2017).

2.6.Likopen Üreten Çalışmalar

Likopenin metabolizma mühendisliği ile üretimi için yapılan farklı araştırmacılardan Shi ve ark. (2019), *CrtB*, *CrtI* ve *CrtE* genlerini, bakteri, maya, fungus, alg ve bitki olmak üzere farklı kaynaklardan alarak, arka plan hücresi *S. cerevisiae*'ye ayrı ayrı transfer etmişler ve likopen üretim kapasitesini araştırmışlardır. *CrtE* için *Pantoea ananatis*'nin, *CrtB* için *Pantoea agglomerans*'nin, *CrtI* için ise *Blakeslea trispora*'yı kaynak olarak kullanmışlardır. *CrtB* ve *CrtI* kromozomda bir kez ifade edilirken *CrtE*'nin kopya sayısını ikiye çıkardıklarında daha yüksek üretim seviyesine ulaşmışlardır.

Çalışmalarının devamında NADPH dengesi için, *exg1* (hücre duvarında beta glukon birikimi ile ilgili gen) genini silmiş ve *POS5* (NADH 'ı NADPH' a çeviren gen) geninin ekspresyon seviyesini arttırmışlardır. NADPH, hücrelerde enerji üretiminden biyosenteze kadar birçok önemli süreçte kullanılan bir koenzimdir. Elektron taşıyıcısı olarak görev yapmakta ve hücrelerin oksidatif strese korunmasına yardımcı olmaktadır. *S. cerevisiae*' da likopen üretimi için NADPH dengesini korumak kritiktir. Likopen sentezi sürecinde, NADPH, likopenin bileşenlerinin oluşturulmasında kullanılmaktadır. Örneğin,

likopen sentezinde NADPH, GGPP'ın likopenin öncül maddelerine dönüştürülmesinde rol oynamaktadır. Dolayısıyla, yeterli miktarda NADPH sağlanması, hücrelerin likopen üretiminde verimli olmasını sağlamaktadır. Bu stratejiler sonucunda 258 mg/L likopen üretebilmişlerdir. Bu miktarı arttırabilmek için modifikasyonlara devam etmişler ve mevalonat yolağını besleyen asetil-KoA'yı arttırmak için sırası ile asetat, asetil-KoA ve etanolü kodlayan genler olan *ALD6*, *ACS* ve *ADH2'nin* ifadesini güçlü promotorlar kontrolü altında arttırmışlardır (**Şekil 2.2**) ve üretim miktarını 289 mg/L'ye çıkarmışlardır. Son olarak galaktoz metabolizmasında yaptıkları düzenleme ile çalkalamalı kültürde 310 mg/L ve aynı hücrenin 7L'lik biyoreaktörde geliştirilmesi ile 3.28 g/L üretim gerçekleştirmişlerdir (Shi ve Ma 2019).

Likopen için bir başka yüksek üretim kapasitesi Ma ve ark. (2019) tarafından elde edilmiş olup 2.37 g/'dir. Bu çalışmada da bir önceki çalışmadaki gibi bütünleştirici mühendislik stratejileri uygulanmıştır. Shi ve ark. (2019) ile ortak olarak, hücrenin galaktoz metabolizmasından sorumlu olan GAL promotorları (*GAL1*, *GAL7* ve *GAL10*) silinmiştir. MVA yolağında bulunan ve pirüvattan Asetil-KoA ve dolayısı ile likopen sentezini artıracak olan genlerden *ALD6*, *ACS* ve *ADH2* genlerinin ifadelerinin arttırılması, *POS5* geninin aşırı ifade edilmesi, *exg1* geninin silinmesi, *CrtB* için *P. agglomerans'* nin, *CrtI* için *B. trispora'*nin kaynak olarak kullanılması sıralanmıştır.

Ma ve ark. (2019), Shi ve ark. (2019) 'dan farklı olarak, *CrtE* için *Taxus x media* kaynak olarak kullanılmıştır. Ayrıca mevalonat yolağı üzerinde HMG-CoA, tHMG1 enzimi tarafından katalizlendiği için *tHMG1*'nin ekspresyonunun arttırmakta, mevalonat yolundaki reaksiyon hızını arttırarak izoprenoid bileşiklerin ve dolayısıyla likopen sentezini artırdığı düşünülmektedir.

Bunlar göz önünde bulundurularak Ma ve ark. (2019) *tHMG1*'nin ekspresyonunun arttırılması, asetat birikiminden kaynaklanabilecek toksisiteyi önlemek için NADP+-bağımlı alkol dehidrogenaz olarak adlandırılan ve etanolün oksidasyonunda ve ağır metal iyonlarının detoxifikasyonunda rol oynayan enziminin kodlanmasını sağlayan *yp1062w* genini silmişlerdir.

Likopenin hücre içinde depolanması, yağ damlacıkları sayesinde gerçekleşmektedir. Bu damlacıkların oluşması, belirli genlerin ifadesinin arttırılması ile ilişkilidir. Özellikle, *ACC* (asit CoA karboksilaz), *TAG* (trigliserid), *PAH1* (fosfatidik asit fosfataz) ve *DGA1*

(diacilgliserol asetiltransferaz) gibi genlerin ifadesinin artırılması likopenin hapsedildiği yağ damlacıklarının oluşumunu kolaylaştırmaktadır. *ACC* geni, yağ asitlerinin sentezinde yer alırken, *TAG* geni trigliseridlerin sentezini düzenler. *PAH1* geni hücre zarlarında ve lipid damlacıklarında bulunan fosfolipidlerin metabolizmasını kontrol ederken, *DGA1* geni diacilgliserollerin sentezine katkıda bulunur. Bu genlerin artan ifadesi, hücre içinde daha fazla yağ asidi ve diğer lipid bileşenlerinin sentezlenmesine neden olarak likopenin depolanmasını sağlamaktadır. Ma ve ark. (2019) bunları göz önünde bulundurarak *ACC*, *TAG*, *PAH1* ve *DGA1* geninin ifadesini arttırılmışlardır. Böylece likopenin biyolojik fonksiyonlarının korunması ve hücrel homeostazın sürdürülmesi sağlanmıştır (Ma ve ark., 2019).

Şimdiye kadar metabolizma mühendisliği ile en fazla likopen üretimi Shi ve çalışma arkadaşları tarafından 2019 yılında gerçekleştirilmiş olup 7 litrelik fermentörde 3.28 g/L likopen üretilmiştir. Araştırmacılar üretimi, metabolizma mühendisliği çalışmalarda kullanılan bütünleştirici mühendislik stratejileri ile gerçekleştirmişlerdir.

- Yolak üzerinde biyosentetik gen kopya sayılarının arttırılması,
- Bypassa sebep olan genlerin silinmesi,
- Hücre içi redoks dengesi için NADPH miktarının arttırılması,
- Mevalonat yolağını besleyen asetil-KoA miktarının arttırılması,
- GAL sistemi ile hücrenin karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesi ve
- Fermentör çalışmalarındaki parametrelerin iyileştirilmesi.

Shi ve ark (2019), bu stratejilerin her birini tek bir çalışmada, likopen üretecek bir hücre fabrikası oluşturmak için kullanılmışlardır.

2.7. Model Organizma Olarak *S.cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae, FDA tarafından GRAS (Generally Recognized As Safe) statüsünde kabul edilmiştir. Model organizma olduğu ve sıklıkla genetik mühendisliği çalışmalarında kullanıldığı için, metabolik yolakları detaylı bir şekilde incelenmiş ve haritalanmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi çalışmalarında sıklıkla tercih edildiği için avantaj sağlamaktadır. Likopen üretim endüstrisinde günümüzde yaygın olarak kullanılan organizma *Blakeslea trispora*'dan, fermentör kullanılarak yaklaşık 1 g/L likopen üretilmektedir. Likopenin birincil üreticisi Çin, *B. trispora* ile likopen pazarına önemli miktarda katkı sağlamaktadır. Ancak fermantasyon yoluyla üretilen likopenin

birçok kimyasal bileşiğe bağlı olarak veriminin artması ve kullanılan inhibitörlerin kalıntı seviyeleri oldukça önemli bir dezavantajdır (Sevgili ve Erkmen 2019).

S. cerevisiae bu dezavantajlara bir alternatif olarak birçok avantaj sağlamaktadır. Model organizma olarak kullanılan *S. cerevisiae* homolog rekombinasyonun verimliliği sayesinde kromozomlardaki hedef manipülasyonların kolaylığını sağlar bu nedenle metabolik mühendisliği çalışmalarında sıkça kullanılan ökaryotik bir organizmadır. *S. cerevisiae* 'de bulunan MVA yolu sayesinde izoprenoid ve türevlerinin öncüsü olarak kabul edildiği için üretim konakçısı olarak kullanılmaktadır (Nevoigt 2008) .

2.8. Galaktoz metabolizmasından sorumlu GAL promotorları

Mayadaki galaktoz metabolizması, hücrenin dış ortamında bulunan galaktozun etkili bir şekilde kullanılmasını sağlayan karmaşık bir süreçtir. Bu metabolizma, *GAL1*, *GAL7* ve *GAL10* gibi genlerin ifadesiyle kontrol edilmektedir. *GAL1*, *GAL7* ve *GAL10* genleri, galaktozun alınması ve metabolize edilmesi için gereken enzimleri kodlamaktadır. Bu genlerin ifadesi, *GAL1*, *GAL7* ve *GAL10* promotorları tarafından düzenlenmektedir. Galaktozun varlığında, bu promotorlar aktive olmakta ve genlerin ifadesi artmaktadır. *GAL1* geni, galaktozun hücre içindeki metabolik yollara girişini sağlayan galaktoz-1-fosfat üreten enzimi kodlamaktadır. *GAL7* geni, galaktozun glikolitik yolağa girişini sağlayan bir enzim olan Galaktoz-1-phosphate uridylyltransferazı kodlamaktadır. *GAL10* geni ise galaktozun metabolizması için gerekli diğer enzimler olan UDP-glukoz 4-epimeraz ve UDP-N-asetilglukozamin-2-epimerazı kodlamaktadır (de Jongh ve Bro 2008; Sellick, Campbell ve Reece 2008)

GAL1 promotoru, galaktoz varlığında *GAL7* ve *GAL10*'a göre daha hızlı bir şekilde aktive olmakta ve gen ifadesini hızla artırmaktadır. Bu nedenle, belirli bir genin galaktoz varlığında hızlı ve yüksek düzeyde ifade edilmesi istendiğinde, *GAL1* promotoru tercih edilmektedir (Štagoj, Comino ve Komel 2006).

Galaktoz metabolizmasından sorumlu genlerden diğerleri *GAL3*, maya hücrelerinde galaktoz varlığını algılayan bir protein olan galaktoz bağlayıcı proteindir. Bu protein, hücreye galaktozun bulunduğunu bildirir ve *GAL4*'ün aktivitesini düzenleyerek *GAL* genlerinin ifadesini kontrol etmektedir. *GAL4*, *GAL* promotorlarına bağlanarak *GAL* genlerinin ifadesini artıran bir transkripsiyon faktörüdür (Pilaury ve Bewley 2005).

GAL80 proteini, GAL4 transkripsiyon faktörünü inhibe etmekte ve onun GAL genlerini aktive etmesini engellemektedir. Galaktozun varlığında ise bu inhibisyon kaldırılmakta ve GAL4, GAL genlerinin ifadesini başlatmaktadır. Bu mekanizma, galaktozun varlığına veya yokluğuna bağlı olarak GAL genlerinin ifadesini hassas bir şekilde düzenlemektedir. GAL80, GAL genlerinin ifadesini negatif olarak düzenleyen bir inhibitör protein olarak işlev gördüğü için genomdan silinmesi durumunda GAL promotorlarının ifadeleri artırılmış olacaktır (Traven, Jelcic ve Sopta 2006).

2.9. Amaç

Bu tez çalışmasında likopen üretebilecek rekombinant kaset oluşturmak için, likopen üretim yolağında kilit rol oynayan *CrtE*, *CrtB* ve *CrtI* genlerinin indüklenabilir güçlü GAL promotoru ile ekspresyon seviyelerinin artırılması amaçlanmıştır. GAL promotorunun galaktoz yokluğunda çalışabilmesi için galaktoz metabolizmasını düzenleyen *GAL80* geni homolog rekombinasyon ile silinmesi hedeflenmiştir. Kaset daha sonra kullanılabilmek için pSP-GM1 vektörü ile *E.coli* DH5α suşuna klonlanmıştır.

1. Tasarım yapılırken öncelikle hedef stratejiye göre genomdan silinmek istenen genler belirlenmiştir. Silinmesi planlanan, *S.cerevisiae* genomik DNA'sında bulunan GAL80'in homolog rekombinasyon ile silinebileceği belirlenmiştir. Homolog rekombinasyonun gerçekleşebilmesi için *GAL80* geninin *S. cerevisiae* genomuna örtüşebileceği yaklaşık olarak ilk 373 baz çifti ve son 839 baz çifti (NCBI erişim no:NC_001145.3) NCBI referans alınarak alınmış, *GAL80up* ve *GAL80down* olarak adlandırılmıştır. Homolog kollar olan *GAL80up* ve *GAL80down* genleri tasarlanan kasetin iki ucunda olarak, kasetin transformasyonu ile *S. cerevisiae* genomundaki *GAL80* geni ile homolog olarak örtüşerek *GAL80'in* silineceği ve kasette bulunan diğer genlerin genoma entegre olması hedeflenmiştir.

2. *CrtE*, *CrtI* ve *CrtB* genlerinin aşırı ifadesi için galaktoz varlığında indüklenen GAL1 promotoru kullanılmıştır. Tasarıma göre GAL1 promotorları her üç genin önünde yer alarak ilgili genlerin sentezini başlatılacaktır. GAL1 (NCBI erişim no:NC_001134.8) promotoru NCBI referans alınarak yaklaşık olarak 442 baz çifti olacak şekilde kasete entegre edilmiştir.

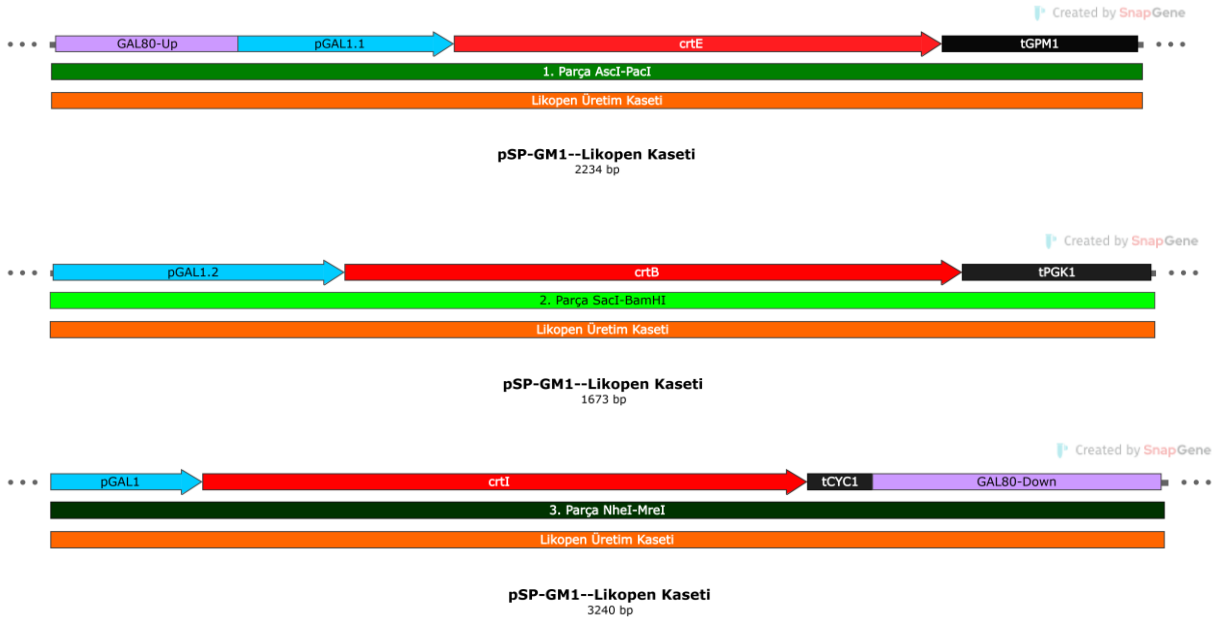
3. Kilit üç gen olan *CrtE* (*Sulfolobus acidocaldarius* kaynak kullanılarak) geni yaklaşık olarak 999 baz çifti, *CrtB* (*Blakeslea trispora* kaynak kullanılarak) geni

yaklaşık olarak 936 baz çifti, *CrtI* (*Panttoea agglomerans* kaynak kullanılarak) geni yaklaşık olarak 1755 baz çifti olarak sırası ile kasete entegre edilmiştir.

4. *CrtE*, *CrtI* ve *CrtB* genlerinin ifadesinin kontrolünü sağlamak için devamına terminasyon bölgeleri eklenmiştir. Her üç gen için farklı terminasyon bölgeleri seçilmiş ve böylece terminasyon bölgesinin spesifikliği sağlanmıştır. Kullanılan terminasyon bölgeleri *S.cerevisiae* genomuna uyumlu olup sırası ile GPM1 (NCBI erişim no:NC_001143.9) terminasyon bölgesi yaklaşık olarak 400 baz çifti, PGK1 (NCBI erişim no:NC_001135.5) terminasyon bölgesi yaklaşık olarak 285 baz çifti, CYC1 (NCBI erişim no:NC_001142.9) terminasyon bölgesi yaklaşık olarak 190 baz çifti olarak kasete entegre edilmiştir.

5. Homolog rekombinasyon ile kasetin entegre edildiği hücrelerin seçiciliğini sağlamak adına URA3 (NCBI erişim no:NC_001137.3) marker geni yaklaşık olarak 1536 baz çifti olarak kasete entegre edilmiştir.

Tasarlanan kaset *GAL80up*, *GAL1*, *CrtE* ve *tGPM1* bölelerini içeren 1.parça, *GAL1*, *CrtB* ve *tPGK1* bölelerini içeren 2. parça, *GAL1*, *CrtI*, *tCYC1*, *GAL80down* bölelerini içeren 3. parça olarak dizayn edilmiştir. Bunun sebebi büyük miktarlardaki genlerin (baz çifti olarak) tek seferde birleştirilmesinin oldukça karmaşık ve zor olmasıdır. Deneysel adımlarda kolaylık sağlanması için öncelikle her parçaya ait bölgelerin kendi içinde birleştirilmesi ve daha sonra 1. parça, 2. parça ve 3. parçanın birleştirilmesi amaçlanmıştır.

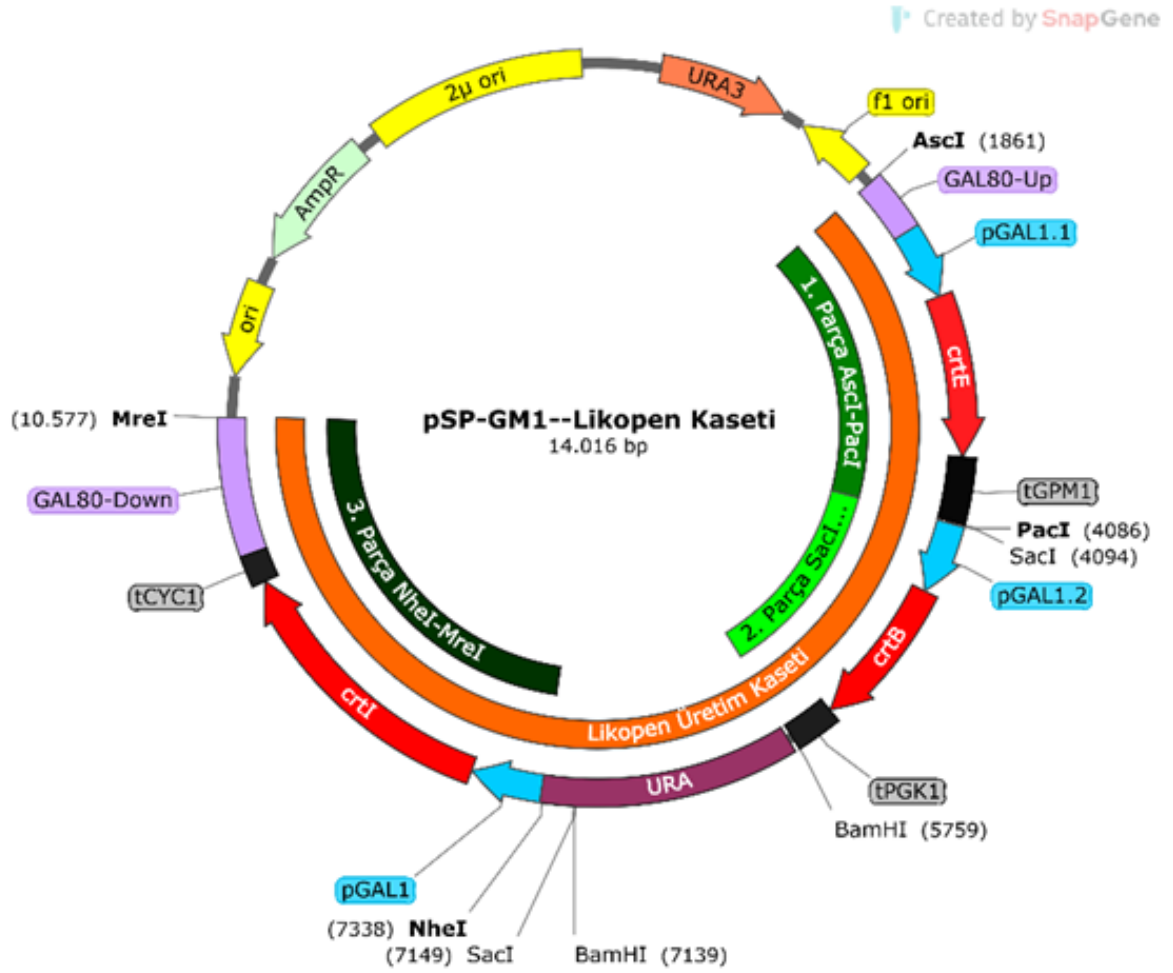


Şekil 2.3. Tasarımı yapılan 1. Parça, 2. Parça ve 3. Parçanın SnapGene haritası gösterilmektedir.

Her üç parçanın başında ve sonunda yapışkan uçlar bırakarak birleştirilebilmesi ve tekrar modifiye edilebilmesi için restriksiyon enzimlerini içerecek şekilde tasarımı yapılmıştır. Seçilen restriksiyon enzimleri spesifik (vektörü başka bir noktadan daha kesmemesi için) ve hızlı kullanıma uygun olabilecek (fastdigest enzimler) şekilde seçilmiştir. Kullanılan restriksiyon enzimleri 1. parça için AscI (SgsI) (Thermo, FD1894) AGCT dizisini tanımaktadır, PacI (Thermo, FD2204) TTAATG dizisini tanımaktadır, 2. parça için SacI (Thermo, FD1133) GAGCTC dizisini tanımaktadır, BamHI (Thermo, FD0054) GGATCC gen dizisini tanımaktadır, 3. parça için NheI (Thermo, FD0974) GCTAGC gen dizisini tanımaktadır, MreI (Thermo, FD2024) CGCCGGCG gen dizisini tanımaktadır.

Tasarımı yapılan kasetin laboratuvarımızda bulunan pSP-GM1 adlı vektöre klonlanması planlanmıştır. pSP-GM1 vektörü *E. coli* çalışmaları için AmpR (NCBI erişim no:NC_002516.2) direnç geni (Ampicillin'e direnç sağlayan marker), *S. cerevisiae* çalışmalarında kullanılmak üzere URA3 (NCBI erişim no:NC_001137.3) marker genini içermektedir. Vektörün hücre içinde çoğalmasını sağlayan orijin bölgeleri olarak vektörün çoğalmasını sağlayan asıl orijin bölgesi olan ori, genellikle maya hücrelerinde bulunan ve 2 mikron orijini olarak adlandırılan 2µ ori ve özellikle gen ifade deneyleri ve genetik varyasyonların incelenmesi gibi uygulamalarda kullanılan tek zincirli DNA

plazmitlerinin çoğalmasını sağlayan f1 ori bölgesi içermektedir. pSP-GM1 vektörü yaklaşık olarak 5280 baz çifti içermektedir. Tasarlanan kaset ile birleştirildiğinde yaklaşık olarak 14.016 baz çiftinden oluşan pSP-GM1-LÜK vektörü oluşturulmuştur.



Şekil 2.4. pSP-GM1-LÜK Snapgene Viewer haritası. 1. parça AscI-SacI ile, 2. parça PacI-BamHI ile ve 3. parça NheI-MreI restriksiyon enzimi ile kesilebilecek şekilde tasarlanmıştır.

3. YÖNTEM

3.1 Kullanılan suşlar, besiyerleri ve kültürasyon koşulları

Klonlama çalışmalarında kullanılan ticari *E.coli DH5α* suşu LB broth veya agar besi yerinde, klonlama yapılması durumunda seçiciliğin sağlanması için LB brtoh veya Agar'a Ampicillin eklenip (0.01L/L) 37 ° C'de gece boyu geliştirilmiştir.

3.2 Likopen Kasetinin Tasarlanması:

Likopen üretiminin sağlanması amaçlanan kasetin tasarımı Snapgene Viewer ve gen dizileri NCBI kullanılarak yapılmıştır. Likopenin aşırı üretimi için kilit roldeki *CrtE*, *CrtB* ve *CrtI* genlerini içeren bir vektör tasarlanmıştır. Tasarlanan vektörün *S. cerevisiae* genomuna entegrasyonu homolog rekombinasyon ile mümkün olmaktadır.

3.2.1 Kaset oluşturmak için kullanılan primerler

Tasarlanan kaset genlerini amplifiye edebilmek, birleştirebilmek için restriksiyon enzim dizilerini planlandığı gibi *AscI* (*SgsI*) restriksiyon enzimi *GAL80up* geninin ilk 4 baz çiftine, *SacI* restriksiyon enzimi *GPM1* terminasyon geninin son 6 baz çiftine, *PacI* restriksiyon enzimi *GAL1.2* promotor geninin ilk 6 baz çiftine, *BamHI* restriksiyon enzimi *PGK1* terminasyon geninin son 6 baz çiftine, *NheI* restriksiyon enzimi *GAL1.3* promotor geninin ilk 6 baz çiftine ve *MreI* restriksiyon enzimi *GAL80down* geninin son 8 baz çiftine entegre olacak şekilde primer tasarımı yapılmıştır.

Primer tasarımı SnapGene Viewer haritası kullanılarak dizi bilgisi bilinen genlerin yaklaşık 30-50 baz çifti başlangıç ve bitişlerini kapsayacak şekilde yapılmıştır. Primer tasarımı yapılırken primerlerin yüksek kararlılıkta olup güçlü bağlar oluşturabilmesi için seçilen baz çiftleri arasında minimum %50 oranında GC (Guanin ve Sitozin) içermesi, benzer TM sıcaklıklarına sahip olmaları sağlanmıştır.

Tablo 3.1. Likopen üretim kasetinde bulunan genlerin 5’-3’ primer dizileri.

GAL80up-Forward	GGCGCGCCGCGCTGCTGCTACGGAAAACC
GAL80up-Reverse	GGACGCACGGAGGAGAGTCTTCCTCGGAGGGCTGTACCCGCTCGGCGGCTTCTAATCCGGACGGGAGTGGA AAGAACGGGAAAACC
GAL1-Forward	CGGATTAGAAGCCGCCGAGCGGGTGACAGCCC
crtB-Forward	GGTTTGTATTACTTCTATTCAAATGTAATAAAAGTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAG GAGAAAACAATGTCACAACCACCATTTATTGGACCACG
crtI-Forward	GTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAACAATGTCTGATCAGAAGAAGCACA TTGTC
crtE-Forward	GTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAACAATGAGTTATTTCGACAACACTCTT CAACGAG
GAL1-Reverse	CTCCTTGACGTTAAAGTATAGAGGTATATTAACAATTTTTTGTG
crtE-Reverse	gtaagaaaaatggagggaaaagaatcatcaatcattcattcttcagacTTATTTCTCCTCTGATTGTAAATTCAGCCAGG
tGMP1-Forward	gtctgaagaatgaatgatttgatgatttcttttcctc
tGMP1-Reverse	ttaattaatattcgaactgccattcagctttcc
crtB-Reverse	cgatttcaattcaattcaattatttcttcgataaagaagcaacacctggcaattccttaTTAAACAGGTCTTTGCCATAAACCGGC
tPGK1-Forward	taaggaattgccaggtgttgcttcttatcc
tPGK1-Reverse	ggatccaatacgtcgaaccgaacatagaatatcg
crtI-Reverse	ggacctagacttcaggttgcttaactccttccttcggttagagcggatTTATATCCTAATATCGTTAGAGTTCTGTCTTGGGAAGACG
tCYC1-Forward	atccgctctaaccgaaaaggaagg
GAL80down-Forward	gtaacattatactgaaaaccttgcttgagaaggtttgggacgctcgaagAAGCATCTTGCCCTGTGCTTGG
tCYC1-Reverse	cttcgagcgtccaaaaccttctc
GAL80down-Reverse	cgccggcgTGAAACCTTGTAAGCTTTCTATGATGCACTTCATGAAC

3.3 Hedef gen, terminasyon ve promotör bölgelerinin amplifikasyonu, saflaştırılması ve kasetin oluşturulması

Hedef bölgeler (GAL1.1, *CrtE*, tGPM1, GAL1.2, *CrtB*, tPGK1, URA, GAL1.3, *CrtI*, tCYC1) *S. cerevisiae* genomik DNA’sı kalıp olarak kullanılarak ve kullanılan enzimlere bağlı gerekli optimizasyonlar yapılarak (primerlere bağlı olarak uygun TM sıcaklığı, TM süresi vb.) PCR ile yüksek miktarlarda amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon reaksiyonları verime bağlı olarak Phusion High-Fidelity Polymerase (Thermo, F-530XL), PrimeStar HS Polymerase (Takara, R010A) veya PrimeStar GXL Polymerase (Takara, R050A) ile yapılmıştır. Amplifiye edilen gen bölgeleri Agaro Jel Elektroforezi ile görüntülenmiştir (%0.8’lik) ve reaksiyon ürünlerindeki saflığa bağlı olarak PCR ürününden direk veya Agaro Jel’den beklenen büyüklükteki DNA kesilerek saflaştırma protokolü MN kit ile gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan genlerin uç uca örtüşecek şekilde birleştirilmesi için örtüşen PCR metodu uygulanmıştır.

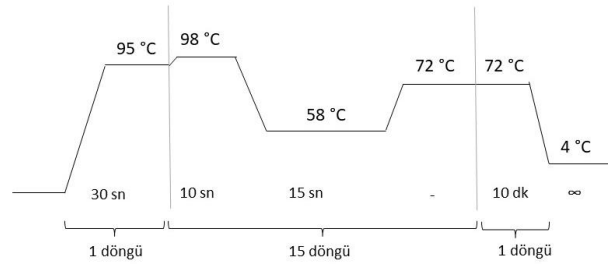
Reaksiyon iki aşamada erçekleşmiş olup;

F1 reaksiyonunda TM sıcaklığı 58 °C iken, F2 reaksiyonunda primer bağlanma sıcaklığına göre optimize edilmiştir. 72 °C uzama evresinde ise birleşecek DNA'ların toplam büyüklüğü baz alınarak PrimeStar HS Polymerase protokolüne göre (1kd/dk) süre optimizasyonu yapılmıştır.

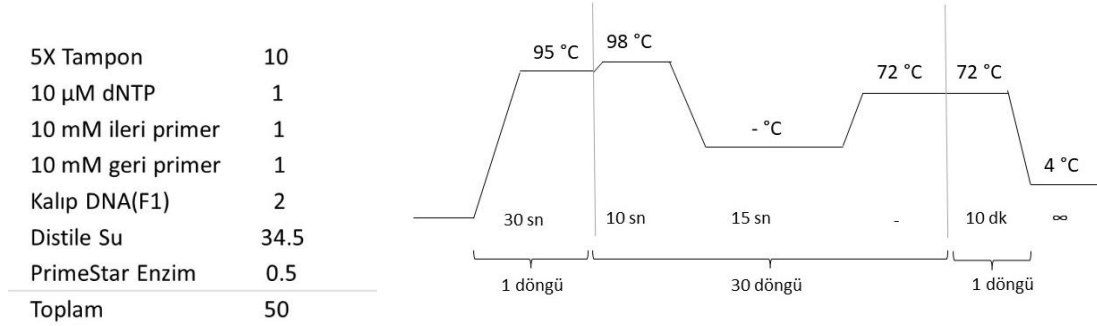
Saflaştırılan genler önce GAL80UP-GAL1.1-CRTE-TGPM1(1. parça) sırası ile ardından GAL1.2-CRTB-tPGM1(2.parça) ve son olarak GAL1.3-CRTI-tCYC1-GAL80DOWN (3. parça) sırası ile birleştirilmek üzere örtüşen PCR yöntemi kullanılmıştır. Örtüşen PCR yöntemi için PrimeSTAR HS Polymerase (Takara, R010A) kullanılmıştır ve şartlar tavsiye edilen protokol dikkate alınarak ayarlanmıştır. Örtüşen PCR stratejisine göre reaksiyon önce primersiz 15 döngü kurulmuştur. Bu adımda örtüşen bölgelerin primer gibi davranması (F1) ve bir sonraki adımda primerlerin örtüşen DNA'yı çokça üretmesi(F2) beklenmiştir. Örtüşen PCR şartları aşağıdaki gibidir:

F1:

5X Tampon	10
10 µM dNTP	1
Kalıp DNA(1)	-
Kalıp DNA(2)	-
Distile Su	50 ml'ye kadar
PrimeStar Enzim	0.5
Toplam	50



F2:



Birleştirilen kaset parçaları pSP-GM1 vektörüne klonlamak için önce vektöre sahip DH5α suşları gece boyu 10 mL LB Broth %1 Ampicillin içerecek şekilde geliştirilip izole edilmiştir. İzolasyon MN kit ile yapılmıştır. İzole edilen vektör ve birleştirilen kaset ligasyona alınmadan önce AscI ve MreI restriksiyon enzimleri ile kesilip yapışkan uçlu olmaları sağlanmıştır.

Distile Su	14	
10X FastDigest Tampon	2	37 °C 10 dakika
pDNA(1000ng)	2	70 °C 10 dakika
AscI	1	
MreI	1	

Distile Su	6	
10X FastDigest Tampon	2	37 °C 10 dakika
Kaset DNA(200ng)	10	70 °C 10 dakika
AscI	1	
MreI	1	

Restriksiyon enzimleri ile kesim şartları protokolde önerildiği gibi optimize edilmiştir. Kesim reaksiyonu ürünleri % 0.8'lik Agaroz jelde 90V'da yaklaşık 60 dakika yürütüldükten sonra istenen DNA büyüklüğü jelden kesilip saflaştırılmıştır. Saflaştırılan pDNA ve kaset DNA konsantrasyonu Nanodrop ile ölçüldükten sonra T4 DNA Ligase (Thermo, EL0011) kullanılarak ligasyona alınmıştır.

Ligasyona alınacak pDNA ve kaset DNA miktarı, pDNA yaklaşık 100 ng, Kaset DNA ise aşağıdaki formül baz alınarak hesaplanmıştır.

$$\frac{100\text{ng vektör} \times \text{insert büyüklüğü(baz çifti olarak)}}{\text{vektör büyüklüğü(baz çifti olarak)}} \times \frac{3}{1}$$

Ligasyon için reaksiyon şartları:

Distile su	13.2		
10X T4 DNA Ligase Tampon	2		
pDNA (132ng)	3	22 °C	20 dakika
Kaset DNA (105ng)	0.8	70 °C	5 dakika
T4 DNA Ligase	1		

Ligasyon ürünleri stok ve üretim için kompetent DH5α suşlarına transforme edilmiştir.

3.4. Stok ve üretim için *E. coli* hücrelerinin kompetent hale getirilmesi, transformasyon ve izolasyon aşamaları

DH5α hücreleri transformasyona hazır hale getirilmek için CaCl₂ kompetent hücre hazırlama protokolü uygulanmıştır. Hücreler -80 °C’de stoklanmıştır.

CaCl₂ kompetent hücre hazırlama protokolü şu şekilde gerçekleştirilmiştir.

-80 °C stoğundan alınan DH5α hücreleri 10 mL LB Broth’a ekilip 120 rpm 37 °C’de gecelik inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda kültürden 0.3-0.5 mL alınıp 100 mL’lik taze LB Broth’a inoküle edilip 120 rpm’de 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyona bırakıldıktan 70-80 dakika sonra spektrofotometrede OD₆₀₀ nm de ölçüm yapılmaya başlanıp 0.2-0.4 değerleri yakalanınca örnek 3000 g’de 15 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atıldıktan sonra pelet 25 mL 50 mM CaCl₂ ile çözülüp 15 dakika buzda inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda 3000 g’de 15 dakika santrifüj yapıp süpernatant atılmıştır. Pelet üzerine 4 mL 50 mM CaCl₂ ile çözüldükten sonra 0.3 mL %80 gliserol eklenmiştir. 200’er µL tüplere bölünüp -80 °C stoklanmıştır.

Ligasyon ürünü transformasyon için hazır hale getirilen kompetent DH5α hücrelerine ısı şoku protokolüne uygun şekilde transforme edilmiştir.

Isı şoku ile transformasyon protokolü:

-80 °C’den alınan kompetent DH5α hücreleri 5 dakika buzda inkübe edildikten sonra 5-10 µL ligasyon karışımı ile nazikçe karıştırılmıştır ve 30 dakika buzda inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hücreler 42 °C’de 2 dakika, buzda 3 dakika inkübe edilmiştir. 500 LB broth’a eklenen hücreler 37 °C’de 150 rpm de 30-60 dakika çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir. Süre sonunda 8000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilen hücrelerden yaklaşık 100 µL pelet-süpernatant alınarak LB Ampicillinli tabağa yayma ekim yapılmıştır. 37 °C’de gece boyu inkübe edildikten sonra gelişen koloniler taranmak

üzere önce master tabak yapıp gece boyu 37 °C'de geliştirildikten sonra koloni PCR yapılmıştır.

Koloni PCR da kalıp DNA olarak kolonilerin genomik DNA'sı kullanılmıştır. (Yaklaşık 25 µL dH₂O'ya koloni kürdan/öze yardımı ile inoküle edilmiştir ve yaklaşık 100 °C'de 5 dakika inkübe edilen hücreler 14.000 rpm de 1-2 dakika santrifüj edilmiştir, süpernatant kalıp DNA olarak kullanılmıştır.)

Dream Taq Polymerase (Thermo, EP0705) ile kurulan koloni PCR reaksiyon şartları enzimin protokolüne göre optimize edilmiştir. Kullanılan primerler transforme edilen vektörün içinde bulunan spesifik gen bölgelerini üretecek şekilde seçilmiştir.

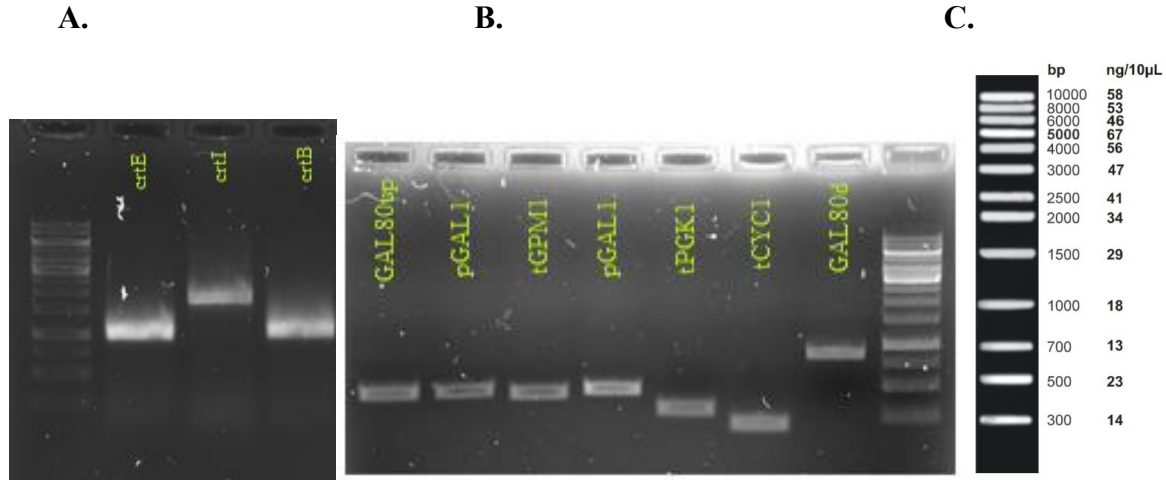
Koloni PCR yöntemi ile pozitif çıkan koloniler teyit için restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonuna alınarak beklenen büyüklüklerde kesilip kesilmediği kontrol edilmiştir. Restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonuna almak üzere pozitif çıkan kolonilerden plazmit izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon için koloniler Ampicillin içeren LB broth da 150 rpm de 37 °C de gece boyu inkübe edilmiş ve süre sonunda MN kit ile vektör saflaştırılmıştır.

Saflaştırılan vektöre uygun iki restriksiyon enzimi ile kesim yapıp beklenen büyüklükte bant verip vermediği doğrulanmıştır. Kesim reaksiyonunda da pozitif çıkan koloniler -80 °C'ye stoklanmıştır. Stok yapılan hücreler %15-20 gliserol içerecek şekilde hücre kültürü halinde hazırlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1.Kaset Genlerinin Amplifikasyonu ve pSP-GM1 Vektörüne Klonlanması

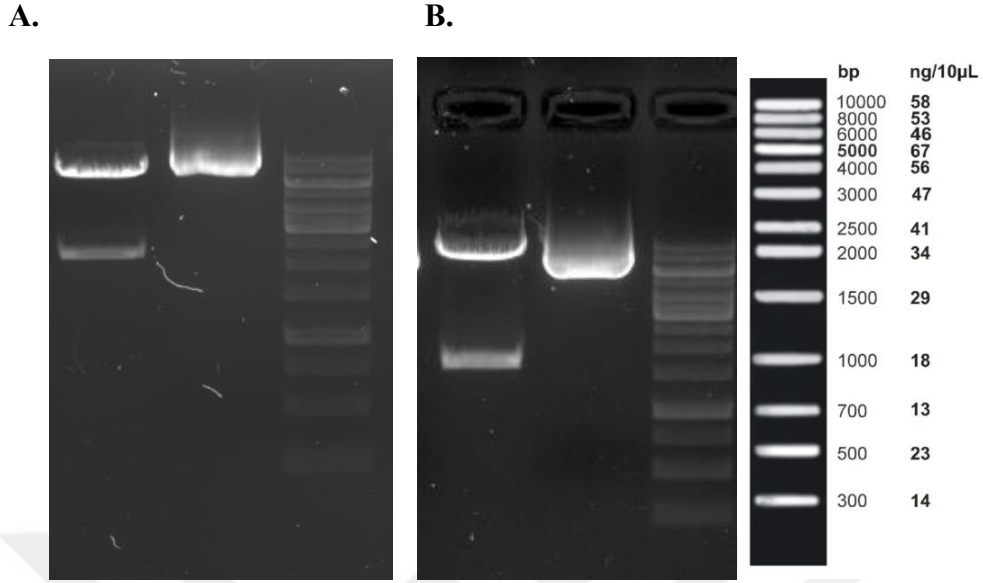
Likopen kaseti oluşturmak için herbir bölge; primerler, *S. cerevisiae* gDNA'sı kalıp olarak kullanılarak ve PrimeStar Polymerase (Takara, R010A) ile amplifiye edilmiştir.



Şekil 4.1. **A.** Genlerin PCR sonucunda agaroz jel görüntüleri. Sırası ile CrtE 999 bç, CrtI 1755 bç, CrtB 936 bç büyüklüğündedir. **B.** Kaseti oluşturan diğer gen bölgelerinin agaroz jel görüntüleri. Sırası ile GAL80up 442 bç, GAL1.1 442 bç, tGPM1 408 bç, pGAL1.2 448 bç, tPGK1 291 bç, tCYC1 190 bç, GAL80down 897 bç büyüklüğündedir. **C.** Goldbio 1kb plus ladder (D010500)

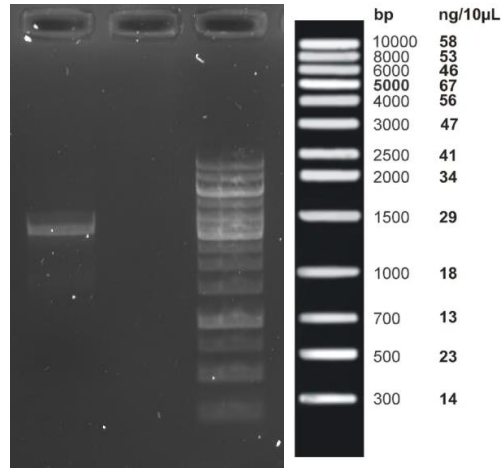
1., 2., 3., parça ya ait saflaştırılan bölgeler önce GAL80up-pGAL1.1-crtE-tGPM1 (1.parça), pGAL1.2-crtB-tPGK1 (2.parça), pGAL1-crtI-tCYC1-GAL80down (3.parça) birleştirilmiştir ve bu sıra ile vektöre entegre edilmiştir.

Birleştirilen her bir parça spesifik restriksiyon enzimleri ile kesilip ardından ligasyona alınmıştır ve pSP-GM1 vektörüne ısı şoku yöntemi ile entegre edilmiştir. Kompetent DH5α'ya transforme edilen pSP-GM1-1.parça entere edilip doğrulama reaksiyonları (koloni PCR, restriksiyon kesimi) ile doğrulandıktan sonra aynı vektöre 2. parça da entegre edilmiştir. 1 ve 2. parçanın eklendiği vektör restriksiyon enzimleri ile kesilip teyit edilmiştir. 1. parça için AscI-SacI enzimleri kullanılıp yaklaşık 2230 bç ve 2. parça için SacI-BamHI enzimleri kullanılıp yaklaşık 1675 bç bant verdiği doğrulanmıştır.

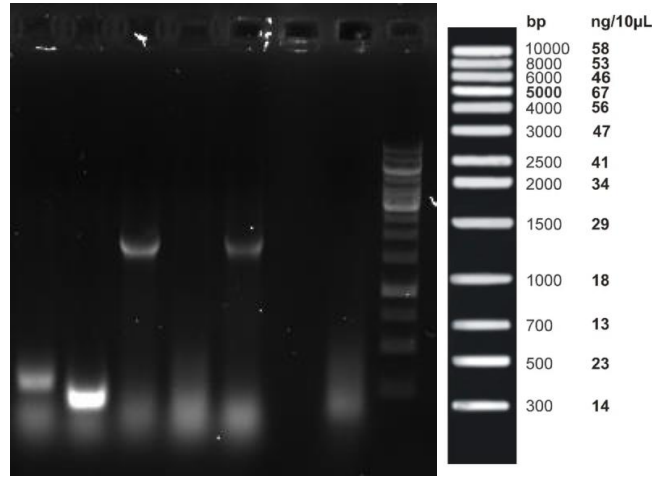


Şekil 4.2 A. İlk kuyu, Ascl-SacI enzimleri ile kesilmiş vektörü içermektedir. Kesim sonrası salınan 1. parça yaklaşık 2230 bç ve vektör 5295bç büyüklüğündedir. Restriksiyon enzimleri ile kesilmemiş vektör ikinci kuyuda olup yaklaşık 7525bç bant vermiştir. **B.** ilk kuyu, SacI-BamHI enzimleri ile kesilmiş vektörü içermektedir. Kesim sonrası salınan birinci parça yaklaşık 1675bç ve vektör birinci parçayda içermesi neddeni ile 7525bç büyüklüğündedir. Restriksiyon enzimleri ile kesilmemiş vektör ikinci kuyuda olup yaklaşık 9191bç bant vermiştir.

3. parça amplifiye edilip 1. ve 2. parçayı içeren vektöre transforme edilmek üzere hazır hale getirilmiştir.

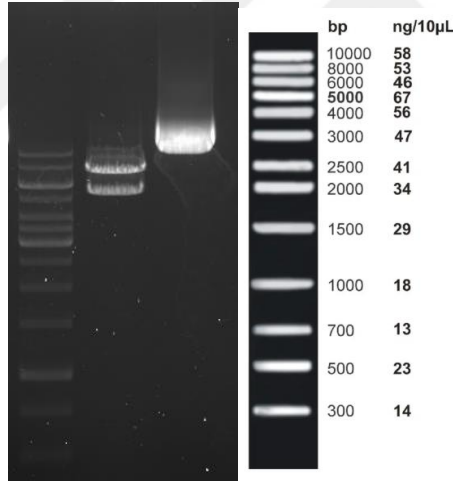


Şekil 4.3. 3. Parçanın amplifikasyonu yaklaşık 3224bç



Şekil 4.4. 3. Parçanın da transforme edildiği pSP-GM1-LÜK vektörünün klonlandığı koloni PCR taraması. *CrtI* ileri ve *CrtI* geri primerleri kullanılmış ve yaklaşık 1755bç bant olan koloni pozitif kabul edilmiştir.

3 parçanın klonlandığı pPS-GM1 vektörü pSP-GM1-LÜK olarak adlandırılmıştır. AscI-MreI restriksiyon enzimleri ile kesilip pozitif koloni teyit edilmiştir.

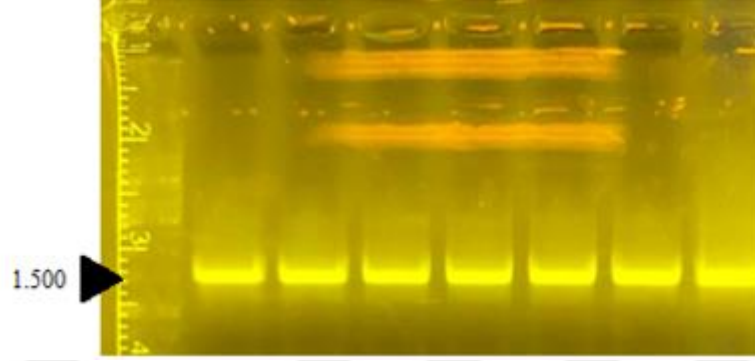


Şekil 4.5. pSP-GM1-LÜK' ün klonlandığı pozitif koloni AscI-MreI ile kesilip yaklaşık olarak 7148 bç ve 5292 bç iki bant, restriksiyon enzimleri ile kesilmemiş vektör 7148bç bant vermiştir.

Tüm parçaları içeren pSP-GM1 vektörü kompetent DH5α arka planına transforme edilmiştir. Transformasyon tabağındaki kolonilerden PCR reaksiyonu kurulup pozitif koloniler Ampicillin içeren LB broth da gece boyu 20 rpm de 37 °C'de inkübe edilmiştir. Yaklaşık 16 saatin sonunda 750 µL kültür örneği 250 µL %80 gliserol eklenip -80 °C stoklanmıştır.

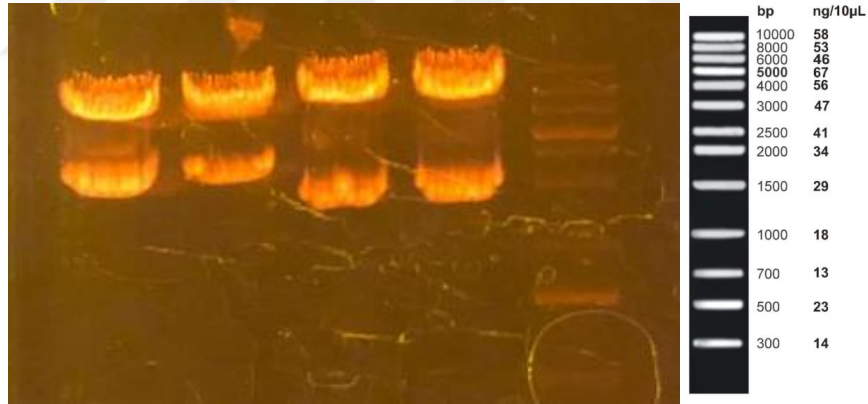
4.2.Likopen Üretim Kasetine URA Marker'ının Eklenmesi:

Kasetin transforme edildiği kolonilerin seçiciliğinin sağlanması için URA gen bölgesi laboratuvarımızda bulunan p-X2 plazmiti kaynak olarak kullanılarak optimize edilmiş primerler ile amplifiye edildikten sonra saflaştırılmıştır.



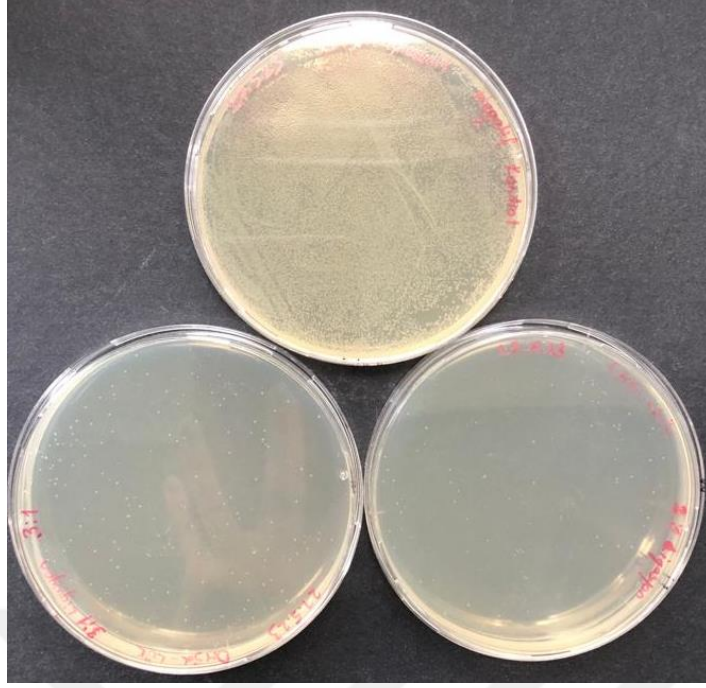
Şekil 4.6. URA gen bölgesi yaklaşık 1536bp, agaroz jelden kesilerek saflaştırılmıştır.

pSP-GM1-LÜK vektörü AscI-BamHI ve NheI-MreI restriksiyon enzimleri ile 1-2. parça ve 3. parça arasına URA marker geni klonlanmak üzere kesim reaksiyonu kurulmuş ve Agaroz Jelden saflaştırılmıştır.



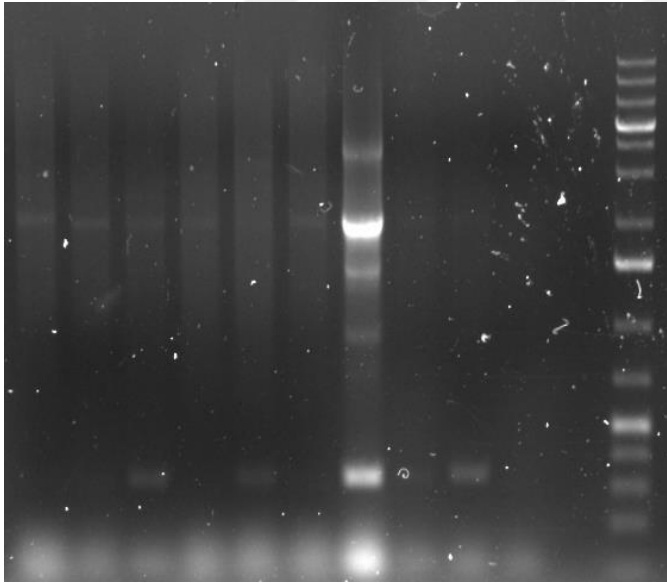
Şekil 4.7. İlk 2 kuyu 1 ve 2. Parçayı içeren AscI-BamHI kesimli bantlar 3924 bp bant vermiştir. Son 2 kuyu 3.parçayı içeren NheI-MreI kesimli bantlar 3224 bp bant vermiştir.

URA ile birleştirilen pSP-GM1-LÜK vektörü, kompetent DH5α transforme edilip Ampicillin içeren LB agar tabağına ekilmiştir. Oluşan kolonilerden PCR yapıp pozitif koloniler -80 °C stoklanmıştır.

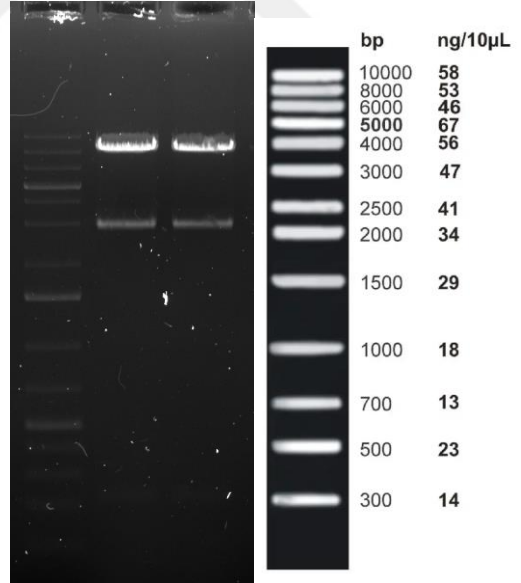


Şekil 4.8. URA marker geninin klonlandığı pSP-GM1-LÜK'ün DH5α arka planına transformasyon Ampicillinli LB tabakları gösterilmiştir. 2:1 ve 3:1 oranında yapılan ligasyonlar ve negatif kontrol tabağında kaset içermeyen pSP-GM1 transformasyonları içermiştir.

A.



B.



Şekil 4.9. A. URA marker geninin klonlandığı pSP-GM1-LÜK'ün DH5α arka planına transformasyon SDS-URA tabaklarındaki kolonilerin PCR ile taranmıştır. tPGK1 ileri ve tCYC1 geri primerleri kullanılmıştır ve yaklaşık 4336bp bant beklenmiştir. **B.** SacI-NheI kesim sonucunda 3211bp ve 10805bp bant vermiştir.

Pozitif kabul edilen koloniden pDNA izolasyonu yapıp PacI-NheI restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu kurulup doğru bantlar verdikleri teyit edilmiştir.

5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Likopen insan sağlığı, tarım, kozmetik gibi alanlarda sık kullanılan bir terpenoid grubudur (Takeoka ve Dao 2001; Bhuvaneswari ve Nagini 2005) Bitkiler, özellikle kırmızı olan sebze ve meyvelerin ekstraksiyonları ile likopen üretilebilir (Parveen ve Iqrah 2016). Ekstraksiyon sırasında kullanılan kimyasallar ve üretilen likopenin saklama koşulları nedeni ile oldukça maliyetli olan tarımsal üretim likopen üretimi için alternatif başka kaynak arayışına yönlendirmiştir (Saini ve A. Bekhit 2019) .

Son yıllarda popülerliği artan metabolizma mühendisliği aracılığı ile likopen bakterilerde, mikroalglerde ve mantarlarda üretilebilmektedir(Li ve Liu 2020; Jing ve Guo 2021).

S.cerevisiae tüm genomuna erişim kolaylığı genetik manipülasyonun kolaylığı sayesinde metabolizma mühendisliği çalışmalarında yaygın kullanılan model bir organizmadır (Ma ve Shi 2019). Daha önce likopen aşırı üretimi için yapılan çalışmalarda; (Xie ve Lv 2015) Xie ve arkadaşları *crtE* ve *crtI* genlerinin 1,61 g/L likopen üretmişlerdir. (Chen ve Xiao 2016) Chen ve arkadaşları *S.cerevisiae* de *crtI*,*crtB* ve *crtE* genlerinin metabolik mühendislik stratejileri ile ifadesini artırmış ve 5 L'lik biyoreaktörlerde 55,56 mg/g likopen üretmişlerdir (Shi ve Ma 2019). Shi ve arkadaşları GAL promotorları ile düzenlenebilen mutant *S.cerevisiae* suşlarında 7 L'lik bir fermentörde 3,28 g/L likopen üretmişlerdir (Shi ve Ma 2019).

Galaktoz katabolizması için gerekli enzimleri kodlayan beş yapısal genin galaktoz ile indüklenebilir ekspresyonunu kontrol eden GAL80, negatif düzenleyici bir sistemdir. Varlığı GAL genlerinin ekspresyonunu baskılar, ortamda galaktoz yokken GAL genlerinin ekspresyonunu engeller. (Zhou ve Fang 2021) Yapılan daha önceki çalışmalarda da belirtildiği üzere, birçok ürünün fermentasyonu için tek bir karbon kaynağı olarak galaktozu kullanmak ekonomik olarak uygun olmadığından tüm GAL promotorlarının çeşitli karbon kaynakları altında işlevsel olmasına izin vermek için GAL80 geni silinmektedir (Deng ve Wu 2021). Su ve ark., (2022), Shi ve ark., (2019), Hong ve ark., (2019), Chen ve ark., (2016) likopen üretmek üzere yaptıkları çalışmada GAL80'nin silindiği arka plan hücrelerini kullanmışlardır.

Likopen hücre için toksik bir bileşiktir. Likopenin hücre gelişiminin eksponansiyel fazında üretilmesi, toksik olması nedeni ile hücre gelişimini bloklamaktadır (Jing ve Guo 2021). Bu tez çalışmasının dayandığı strateji likopen üretimini sağlayacak olan genler *CrtE*, *CrtI* ve *CrtB*' nin ifadesinin, GAL1 promotoru altında, GAL80 açısından eksik bir arka plan hücresinde sağlanmasıdır. Arka plan hücresinde GAL80 silindiğinde, GAL1 promotoru altındaki likopen üretiminden sorumlu olan genler “*CrtE*, *CrtI* ve *CrtB*” ortamda glikoz seviyesi azaldığında yani

eksponansiyel fazın sonuna doğru ifade edilmektedir. Çünkü GAL promotorlarının verimli indüksiyonu için düşük glikoz seviyesinin korunması önemlidir. Böylece hücreler yeteri kadar geliştikten sonra kendisi için toksik olabilecek bir ürünü üretebilmektedir (Chen ve Wang 2019; Li ve Wang 2019).

Galaktoz metabolizması ile indüklenebilen ve likopen üretimi için kilit üç gene sahip olan kasetin tasarımında promotor olarak GAL1, likopen üretim genleri olarak *CrtE*, *CrtI* ve *CrtB*’ yi ve bu genlerin ifadesi için terminasyon bölgeleri olan sırasıyla tGPM1, tPGK1 ve tCYC1’yi içermiştir. Kasetin tasarımı, bu kaseti GAL80 bölgesine homolog rekombinasyon ile yerleştirecek şekilde gerçekleştirilmiştir böylece hem *GAL80* geninin silinebilecek hem de aynı anda *CrtE*, *CrtI* ve *CrtB* genleri promotor ve terminasyon bölgeleri yerleştirilebilmektedir. Bu tez çalışmasında *CrtE*, *CrtB* ve *CrtI* için sırası ile *Sulfolobus acidocaldarius*, *Panttoea agglomerans*, *Blakeslea trispora* kaynak olarak kullanılmıştır. *CrtE* için *S. acidocaldarius*’un tercih edilmesinin nedeni; bu gen ile laboratuvarımızda yapılan daha önceki tez çalışmalarında aynı yolak üzerinden başka bir metabolitin (taksadien) çok miktarda üretilmesidir. *CrtB* ve *CrtI* kaynakları ise literatürde sıklıkla likopen üretmek üzere tercih edilen kaynaklardır (Chen ve Xiao 2016) .

Kasetin transforme edildiği hücreler SDS-URA besi yerinde URA direnç kaseti sayesinde seçilmiştir. SDS-URA besi yerinde yalnızca URA direnç genine sahip hücreler gelişebilmektedir. URA orotidin-5'-fosfat dekarboksilazı kodlayan bir gendir ve ortamda urasil veya üridin olmadıkça hücre büyümesini engeller.(Siewers ve Mortensen 2010) *S.cerevisiae*’de URA geninin varlığı hücre büyümesini sağlarken URA’ya sahip vektörler sayesinde hücrelerin seçiciliğini sağlamış olur (Galvão ve de Lorenzo 2005).

Likopen üretim kasetini içeren pSP-GM1 vektörü DH5 α arka planına klonlanmış ve gerektiğinde plazmit izolasyonu yapılmak üzere -80 stoklanmıştır. pSP-GM1-LÜK vektörü homolog rekombinasyon ile *S.cerevisiae* suşlarına entegre edilmek için geliştirilmek üzere elde edilmiştir.

KAYNAKÇA

- Abir, M. H., et al. (2023). "Pharmacological potentials of lycopene against aging and aging-related disorders: A review." *Food Science & Nutrition*, 11(10), 5701-5735.
- Alper, H., et al. (2005). "Identifying gene targets for the metabolic engineering of lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*." *Metabolic Engineering*, 7(3), 155-164.
- Andersen, T. B., et al. (2021). "An engineered extraplastidial pathway for carotenoid biofortification of leaves." *Plant Biotechnology Journal*, 19(5), 1008-1021.
- Andreassi, M., et al. (2002). "A1. Evaluation of antioxidant activity of lycopene." *Journal of Cosmetic Dermatology*, 1(2), 105-105.
- Bacanli, M., et al. (2017). "Lycopene: Is It Beneficial to Human Health as an Antioxidant?"
- Bahieldin, A., et al. (2014). "Efficient production of lycopene in *Saccharomyces cerevisiae* by expression of synthetic crt genes from a plasmid harboring the ADH2 promoter." *Plasmid*, 72, 18-28.
- Bin-Jumah, M., et al. (2021). "Application of carotenoids in cosmetics." *Carotenoids: Structure and Function in the Human Body*, 747-756.
- Brahmachari, G. (2021). *Discovery and Development of Anti-Breast Cancer Agents from Natural Products*. Elsevier.
- Chen, D., et al. (2019). "A review for the pharmacological effect of lycopene in central nervous system disorders." *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 791-801.
- Ciocan, D. and E. Elinav (2023). "Engineering bacteria to modulate host metabolism." *Acta Physiologica*, 238(3), e14001.
- Couillaud, J., et al. (2021). "The terpene mini-path, a new promising alternative for terpenoids bio-production." *Genes*, 12(12), 1974.
- de Jongh, W. A., et al. (2008). "The roles of galactitol, galactose-1-phosphate, and phosphoglucomutase in galactose-induced toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*." *Biotechnology and Bioengineering*, 101(2), 317-326.
- Du, B., et al. (2023). "Recent Advances on Key Enzymes of Microbial Origin in the Lycopene Biosynthesis Pathway." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(35),

12927-12942.

Elango, P. and S. Asmathulla (2017). "A Systematic Review on Lycopene and its Beneficial Effects." *Biomedical and Pharmacology Journal*, 10(4), 2113-2120.

Eskandar, K. (2023). "Revolutionizing biotechnology and bioengineering: unleashing the power of innovation." *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*, 10(3), 81-88.

Farmer, W. R. and J. C. Liao (2000). "Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control." *Nature Biotechnology*, 18(5), 533-537.

Grandner, M. A., et al. (2014). "Sleep symptoms associated with intake of specific dietary nutrients." *Journal of Sleep Research*, 23(1), 22-34.

Ha, T. V. A., et al. (2015). "Antioxidant activity and bioaccessibility of size-different nanoemulsions for lycopene-enriched tomato extract." *Food Chemistry*, 178, 115-121.

Hollinshead, W., et al. (2014). "Biofuel production: an odyssey from metabolic engineering to fermentation scale-up." *Frontiers in Microbiology*, 5, 344.

Jing, Y., et al. (2021). "Recent advances on biological synthesis of lycopene by using industrial yeast." *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 60(9), 3485-3494.

Joshee, N., et al. (2019). *Medicinal Plants*. Springer.

Khan, U. M., et al. (2021). "Lycopene: Food sources, biological activities, and human health benefits." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021.

Kim, S. W. and J. Keasling (2001). "Metabolic engineering of the nonmevalonate isopentenyl diphosphate synthesis pathway in *Escherichia coli* enhances lycopene production." *Biotechnology and Bioengineering*, 72(4), 408-415.

Landrier, J.-F., et al. (2023). "Effect of tomato, tomato-derived products and lycopene on metabolic inflammation: from epidemiological data to molecular mechanisms." *Nutrition Research Reviews*, 1-43.

Li, M., et al. (2022). "Co-biosynthesis of germacrene A, a precursor of β -elemene, and lycopene in engineered *Escherichia coli*." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(24), 8053-8066.

Ma, T., et al. (2019). "Lipid engineering combined with systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-yield production of lycopene." *Metabolic*

Engineering, 52, 134-142.

Ma, T., et al. (2016). "Microbial production strategies and applications of lycopene and other terpenoids." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-9.

Machmudah, S., et al. (2012). "Lycopene extraction from tomato peel by-product containing tomato seed using supercritical carbon dioxide." *Journal of Food Engineering*, 108(2), 290-296.

Martínez-Cámara, S., et al. (2018). "Lycopene production by mated fermentation of *Blakeslea trispora*." *Microbial Carotenoids: Methods and Protocols*, 257-268.

Mozos, I., et al. (2018). "Lycopene and vascular health." *Frontiers in Pharmacology*, 9, 521.

Naviglio, D., et al. (2008). "Characterization of high purity lycopene from tomato wastes using a new pressurized extraction approach." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6227-6231.

Nevoigt, E. (2008). "Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(3), 379-412.

Nielsen, J. and J. D. Keasling (2016). "Engineering cellular metabolism." *Cell*, 164(6), 1185-1197.

Niu, F.-X., et al. (2017). "Metabolic engineering for the microbial production of isoprenoids: carotenoids and isoprenoid-based biofuels." *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2(3), 167-175.

Palozza, P., et al. (2011). "Lycopene prevention of oxysterol-induced proinflammatory cytokine cascade in human macrophages: inhibition of NF- κ B nuclear binding and increase in PPAR γ expression." *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(3), 259-268.

Peng, B., et al. (2018). "An expanded heterologous GAL promoter collection for diauxie-inducible expression in *Saccharomyces cerevisiae*." *ACS Synthetic Biology*, 7(2), 748-751.

Perveen, S. and A. Al-Taweel (2018). "Introductory chapter: Terpenes and terpenoids." *Terpenes and Terpenoids*, 1, 1-12.

Pilauri, V., et al. (2005). "Gal80 dimerization and the yeast GAL gene switch." *Genetics*, 169(4), 1903-1914.

Przybylska, S. (2020). "Lycopene—a bioactive carotenoid offering multiple health benefits: a review." *International Journal of Food Science & Technology*, 55(1), 11-32.

Rao, A. V., et al. (2006). "Lycopene." *Advances in Food and Nutrition Research*, 51, 99-164.

Schillberg, S. and H. Spiegel (2022). "Recombinant protein production in plants: A brief overview of strengths and challenges." *Recombinant Proteins in Plants: Methods and Protocols*, 1-13.

Schwartz, C., et al. (2017). "Host and vector engineering for improved production of recombinant proteins in yeast." *New Biotechnology*, 39, 174-181.

Sellick, C. A., et al. (2008). "Galactose metabolism in yeast—structure and regulation of the Leloir pathway enzymes and the genes encoding them." *International Review of Cell and Molecular Biology*, 269, 111-150.

Sevgili, A. and O. Erkmen (2019). "Improved lycopene production from different substrates by mated fermentation of *Blakeslea trispora*." *Foods*, 8(4), 120.

Shi, B., et al. (2019). "Systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lycopene overproduction." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(40), 11148-11157.

Shi, J. and M. L. Maguer (2000). "Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 1-42.

Štagoj, M. N., et al. (2006). "A novel GAL recombinant yeast strain for enhanced protein production." *Biomolecular Engineering*, 23(4), 195-199.

Tjahjodjati, et al. (2020). "The protective effect of lycopene on prostate growth inhibitory efficacy by decreasing insulin growth factor-1 in Indonesian human prostate cancer cells." *Research and Reports in Urology*, 137-143.

Traven, A., et al. (2006). "Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited." *EMBO Reports*, 7(5), 496-499.

Venayak, N., et al. (2015). "Engineering metabolism through dynamic control." *Current Opinion in Biotechnology*, 34, 142-152.

Wang, Z., et al. (2020). "Metabolic engineering *Escherichia coli* for the production of

lycopene." *Molecules*, 25(14), 3136.

Ward, V. C., et al. (2018). "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of isoprenoids." *FEMS Microbiology Letters*, 365(10), fny079.

Yadav, V. G., et al. (2012). "The future of metabolic engineering and synthetic biology: towards a systematic practice." *Metabolic Engineering*, 14(3), 233-241.

Yang, J. and L. Guo (2014). "Biosynthesis of β -carotene in engineered *E. coli* using the MEP and MVA pathways." *Microbial Cell Factories*, 13, 1-11.

Zhao, M., et al. (2024). "Engineering strategies for enhanced heterologous protein production by *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbial Cell Factories*, 23(1), 3

