



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**DOKTORA TEZİ**

**REKOMBİNANT *ESCHERİCHIA COLI* HÜCRELERİ  
ARACILIĞIYLA NUKLEOSİT TRİFOSFATIN ENZİMATİK  
SENTEZİ**

**Sevgi BİNAY**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Programı**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Ercan ARICAN**

**II. DANIŞMAN  
Unvan Ad SOYAD**

Tarih girmek için burayı tıklatın.

**İSTANBUL**

Bu çalışma, 30.07.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

### Tez Jürisi

Prof. Dr. Ercan ARICAN(Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Özgür ÇAKIR  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Veysel SABRİ HANÇER  
İstinye Üniversitesi  
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Sabriye PERÇİN  
ÖZKORUNCUKLU  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Sinan MERİÇ  
İstanbul Kültür Üniversitesi  
Fen- Edebiyat Fakültesi

## **İntihal Programı Beyanı**

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

## **Proje Destekleri**

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FDK-2021-38061 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, 119C162 numaralı Tübitak 2244 Sanayi Doktora programı projesi ile desteklenmiştir.

## **Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri**

--

## ÖNSÖZ

Doktora eğitimim süresince tüm hoşgörölü ve samimi tavrı ile kıymetli bilgi, birikim ve tecrübelerini benimle paylaşan, her konuda beni destekleyen ve yardımcı olan, gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Ercan ARICAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi birikimini ve fikirlerini her zaman paylaşarak her konuda tüm gülyüzlülüğü ile yardımcı olmaya çalışan değerli hocam Prof. Dr. Sabriye PERÇİN ÖZKORUCUKLU'ya, HPLC yöntem ve analiz kısmında samimiyeti ve ilgisi ile destek olan Öğr. Gör. Dr. Gizem YILDIRIM BAŞTEMUR'a ve tüm biyokimya laboratuvarı ekibine teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmam sırasında TÜBİTAK-2244 - Sanayi Doktora Programı ve TÜBİTAK-2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında maddi desteği ile yanımda olan TÜBİTAK'a teşekkür ederim

Bu günlere gelmemde en büyük desteği sağlayan, her zaman arkamda olan ve bana güvenen sahip olduğum en değerli varlık canım annem Tekcihan BİNAY'a, bu hayattaki iki iyikilerim canım ablalarım Çiğdem BİNAY'a ve İpek BİNAY'a teşekkürü bir borç bilirim ve minnetlerimi sunarım.

Kalbimin en güzel ve en derin yerinde taşıdığım kıymetli babam Ali BİNAY'a bugün olduğum kişi olabilmemi sağladığı için teşekkür ederim.

Temmuz 2025

Sevgi BİNAY

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ .....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ .....	vii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	x
ÖZET .....	xiii
SUMMARY .....	xiv
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL KISIMLAR.....</b>	<b>3</b>
2.1. REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ .....	3
2.2. NÜKLEOTİT YAPILARI .....	6
2.3. NÜKLEOTİT ANABOLİZMASI.....	8
2.3.1. De novo ve salvage purin biyosentezi .....	9
2.3.2. De novo ve salvage pirimidin biyosentezi.....	11
2.4. NÜKLEOTİTLERİN KİMYASAL SENTEZİ .....	12
2.5. NÜKLEOTİTLERİN ENZİMATİK SENTEZİ.....	12
2.6. GLİKOZ METABOLİZMASI TEKTİKLENEREK ATP REJENERASYON SİSTEMİ ARACILIĞIYLA NÜKLEOTİT SENTEZİNİN DÜZENLENMESİ.....	13
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM.....</b>	<b>18</b>
3.1. DNMP ELDESİ .....	18
3.2. DATP VE DTTP’NİN ENZİMATİK SÜREÇ İLE ELDESİ .....	18
3.2.1. <i>E.coli</i> Top10 suşu için hücre kültürü;.....	18
3.2.2. Kompetan Hücre Hazırlığı .....	19
3.2.3. ADK1 ve CDC8 Genlerinin Kompetan Hücreye Transformasyonu .....	19
3.2.4. pEX-A128-ADK1 ve pEX-A128-CDC8 Plazmitlerinin İzolasyonu .....	20
3.2.5. pEX-A128-ADK1 ve pEX-A128-CDC8 Plazmitlerinin ve Ekspresyon Vektörü pRSETA’nın Restriksiyon Endonükleazları ile Kesimi .....	21
3.2.6. pEX-A128-ADK1 ve pEX-A128-CDC8 Plazmitlerinin ve Ekspresyon Vektörü pRSETA’nın Agaroz Elektroferez Yöntemi ile Görüntülemesi.....	22
3.2.7 Endonükleaz ile kesilmiş ADK1 ve CDC8 Gen Bölgelerinin ve pRSETA’nın Agaroz Jelden Saflaştırması .....	22

3.2.8. Ekspresyon vektörü pRSETA ile ADK1 ve CDC8 gen bölgelerinin Ligasyonu	22
3.2.9. ADK1 ve CDC8 Gen Bölgelerinin İfade Olması	23
3.3. DATP’NİN GLİKOLİZ YOLAĞI VE ATP REJENASYONU İLE ELDESİ	23
3.3.1. <i>E.coli</i> hücrelerinde glikoliz yolağının tetiklenmesi ile dATP eldesi yöntemi	23
3.3.2. <i>S.cerevisiae</i> hücrelerinde glikoliz yolağının tetiklenmesi ile dATP eldesi yöntemi	24
3.3.3. MCF-7 ve MDA-MB-231 Meme kanseri hücre hatlarında glikoliz yolağının tetiklenmesi ile dATP eldesi yöntemi	24
3.4. HPLC YÖNTEMİ İLE DNMP VE DNTP ANALİZİ	25
3.5. İSTATİKSEL ANALİZLER	26
<b>4. BULGULAR</b>	<b>27</b>
4.1. PEX-A128-ADK1 VE PEX-A128-CDC8 PLAZMİTLERİNİN RESTRİKSİYON ENZİMLERİ İLE KESİMİ	27
4.2. PRSETA-ADK1 VE PRSETA-CDC8 PLAZMİTLERİNE SAHİP REKOMBİNANT E.COLİ HÜCRE KOLONİLERİ	28
4.3. PRSETA PLAZMİTİNDE ADK1 VE CDC8 GEN AKTARIMININ KANITLANMASI	29
4.4. DAMP İLE DATP’NİN KROMATOGRAFİK OLARAK SAPTANMASI VE STANDART GRAFİĞİNİN OLUŞTURULMASI	30
4.5. DTMP İLE DTTP’NİN KROMATOGRAFİK OLARAK SAPTANMASI VE STANDART GRAFİĞİNİN OLUŞTURULMASI	31
4.6. ENZİMATİK SÜREÇ İLE DATP ELDESİNİN GÖSTERİMİ	32
4.7. ENZİMATİK SÜREÇ İLE DTTP ELDESİNİN GÖSTERİMİ	33
4.8. <i>E.COLİ</i> HÜCRELERİNDE GLİKOLİZ YOLAĞI TETİKLENEREK DATP ELDESİ	35
4.9. <i>S.CEREVISIAE</i> HÜCRELERİNDE GLİKOLİZ YOLAĞI TETİKLENEREK DATP ELDESİ	37
4.10. MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA GLİKOLİZ YOLAĞI TETİKLEYEREK DATP ELDESİ	39
4.11. MDA-MB-231 MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA GLİKOLİZ YOLAĞI TETİKLEYEREK DATP ELDESİ	40
4.12. DATP VE DTTP ELDELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI	41
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	<b>42</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>47</b>
<b>EKLER</b>	<b>55</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>56</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Rekombinant DNA Teknolojisinin gösterimi. Rekombinant DNA Teknolojisi, istenilen gen bölgesini içeren DNA fragmenti ile bakteri hücresinden elde edilmiş plazmitin restriksiyon enzimeleri ile kesilmesi daha sonra kesilmiş gen bölgesi ve plazmitin bir araya getirmesi ve son olarak konak hücre içerisine aktarılması ile gerçekleşir. Konak hücre içerisinde plazmitin içerisine aktarılan gen bölgesinin ifade olması hedeflenir (Gill ve diğ., 2023).....4
- Şekil 2.2:** Pürin ve Pirimin kimyasal yapılarının gösterimi. DNA'daki pürinler RNA ile ortak olarak adenin ve guanin'dir. DNA'da bulunan pirimidinler sitozin ve timin iken RNA'da bulunan pirimidinler sitozin ve urasildir. (Balasubramaniyam ve diğ., 2021'den alınmıştır) .....7
- Şekil 2.3:** Organik bazların deoksiriboz şekeri ile N-glikozidik bağ oluşturması ile nükleozit yapısı oluşur ve nükleozitlerinde fosforile olması ile nükleotit yapısı oluşmaktadır (Giuliani ve diğ., 2019).....8
- Şekil 2.4:** Pürin ve Pirimidin sentezinin de nova ve salvage yollarının gösterimi.....9
- Şekil 2.5:** Nükleotitlerin enzimatik süreç ile eldesi. İlk olarak DNA nükleaz ile kesime uğratılır ve dNMP eldeleri sağlanır. Daha sonra fosfatlayıcı enzimler aracılığıyla dNMP'tan dNDP'a ve dNTP dönüşümü sağlanır. ....13
- Şekil 3.1:** Klonlama vektörü pEX-A128'in yapısının gösterimi.....19
- Şekil 3.2:** Ekspresyon vektörü pRSETA'nın yapısının gösterimi.....21
- Şekil 4.1:** KpnI ve EcoRI restriksiyon enzimi ile kesime uğratılmış pEX-A128-CDC8 ve pEX-A128-ADK1 plazmitlerinin %1'lik agaroz jeldeki görünüşleri. 1.kuyu) 1 kb DNA marker 2. Kuyu) 100 bp plus DNA marker 3.kuyu) 669 bp ADK1 gen bölgesini içeren 2450 bp pEX-A128 plazmitinin EcoRI ve KpNI ilekesimi 4. Kuyu) 650 bp CDC8 gen bölgesini içeren 2450 bp pEX-A128 plazmitinin EcoRI ile kesim sonucu gösterilmiştir. ....27
- Şekil 4.2:** prSET- CDC8 ve prSET-ADK1 gen ligasyonunun amfisilin içeren besiyerinde koloni oluşturması. LB + Agar + 100mg/ml ampisilin içeren katı besiyerine ligasyon ürünü olan prSET-CDC8 ve prSET-ADK1 genin aktarılması sonucunda prSET plazmiti ampisilin direnç geni aracılığıyla koloni oluşumunu sağlamıştır.....28
- Şekil 4.3:** *E.coli* hücrelerinden izole edilen rekombinant prSET-ADK1 ve prSET-CDC8 ligasyonun başarıyla gerçekleştiğinin gösterimi; 1) Boyutları bilinen DNA parçaları (1kb'lik) 2) prSET-ADK1 ligasyon sonucu 3) prSET-CDC8 ligasyonu gösterilmiştir.....29

- Şekil 4.4:** A) dAMP'nin alıkonma zamanı 8.044 dk B) dATP alıkonma zamanı 5.590 dk şeklinde saptanması C) dATP için oluşturulmuş standart eğri grafiği. Standart seyreltmeleri 2µg/µl, 10µg/µl, 20µg/µl, 100 µg/µl, 200 µg/µl olacak şekilde hazırlandı. D) Standart seyreltme oranlarının piksel karşılaştırılmaları.....30
- Şekil 4.5:** A) dTMP'nin alıkonma zamanı 3.301 B) dTTP alıkonma zamanı 2.403 dk şeklinde saptandı C) dTTP için oluşturulmuş standart eğri grafiği. Standart seyreltmeleri 2µg/µl, 10µg/µl, 20µg/µl, 100 µg/µl, 200 µg/µl olacak şekilde hazırlandı. D) Standart seyreltme oranlarının piksel karşılaştırılmaları.....31
- Şekil 4.6:** a) pRSET-ADK1 içeren rekombinant *E.coli* hücrelerinin LB besiyerinde 37C'de inkübe edilmesi b) Deney besiyeri (400 mM KCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.5 U/ml PK, 100mM dAMP) veya 3.1 dNMP eldesi kısmında açıkladığımız üzere elde ettiğimiz kırık DNA, 250 mM PEP ve 1mM dATP c) Deney besiyeri (400 mM KCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.5 U/ml PK, 100mM dAMP) ve endüstriyel dAMP ile muamele edilmesi ile 2.5 saat 30°C'de inkübasyonu sonucu dATP sonuçlarının HPLC ile kromatografik gösterimi. d) pRSETA-ADK1 kontrol (mavi), pRSETA-ADK1+kırık DNA+deney besiyeri (siyah) ve pRSETA-ADK1+Damp+deney besiyeri (pembe) sonuçlarından elde edilen dATP piklerinin karşılaştırılması.....32
- Şekil 4.7:** a) pRSET-CDC8 içeren rekombinant *E.coli* hücrelerinin LB besiyerinde 37C'de inkübe edilmesi b) Deney besiyeri (200mM KCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.26 U/ml PK, 200 mM PEP ve 1mM dATP) ve 3.1 de bahsettiğimiz gibi elde ettiğimiz kırık DNA c) Deney besiyeri (200mM KCl, 50 mM Magnezyum Klorür (MgCl<sub>2</sub>), 0.26 U/ml PK, 200 mM PEP ve 1mM dATP) ve endüstriyel dTMP ile muamele edilmesi ile 3 saat 30°C'de inkübasyonu sonucu dTTP eldesinin HPLC ile kromatografik gösterimi. d) pRSET-CDC8 kontrol (siyah), pRSET-CDC8+kırık DNA+deney besiyeri (mavi) ve pRSET-CDC8+Damp+deney besiyerinden (pembe) sonuçlarından elde edilen dTTP piklerinin karşılaştırılması (sağda) .....33
- Şekil 4.8:** pRSET-CDC8 içeren rekombinant *E.coli* hücrelerinin LB besiyerinde 37°C'de inkübe edilmesi. Rekombinant *E.coli* kontrol 139,2 ± 9,116; Kırık DNA+ deney besiyeri 212,1 ± 25,98 ; dTMP+ deney besiyeri 288,5 ± 8,103. Kırık DNA+ deney besiyeri anlamlılık, \* p≤0,05. dTMP+ deney besiyeri, \*\*\* p≤0,001.....34
- Şekil 4.9:** a) Negatif kontrol olarak *E.coli* hücreleri LB besiyeri içerisinde inkübe edilmesi ile elde edilmiş dATP piki b) Zenginleştirilmiş deney besiyeri (30g/L glikoz, 31,2g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2g/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1,2g/L KCl, 1g/L NH<sub>4</sub>Cl ve 6.7ml/L Asetaldehit), kırık DNA eklenerek 7 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra elde edilen dATP gösterimi c) zenginleştirilmiş deney besiyerine kırık DNA yerine endüstriyel dAMP eklenmesi sonucu dATP'nin kromatografik olarak gösterimi. d) *E.coli* kontrol (siyah), *E.coli* Kırık DNA+Deney Besiyeri (pembe), *E.coli* Endüstriyel dAMP + deney besiyeri (mavi) sonuçlarından elde edilen dATP piklerinin karşılaştırılması .....35
- Şekil 4.10:** *E.coli* hücrelerinde glikoliz yolağının tetiklenmesi ile dATP eldesinin gösterimi. *E.coli* kontrol besiyeri 5,892 ± 0,4942; Kırık DNA + deney besiyeri 35,83 ± 7,027; ; dAMP + deney besiyeri 50,54 ± 25,51. kırık DNA+ deney besiyeri, \* p≤0,01. endüstriyel dAMP+ deney besiyeri, \*\* (p≤0,05) .....36

- Şekil 4.11:** a) *S.cerevisiae* hücreleri negatif kontrol olarak LB besiyeri ve b) deney besiyeri (1.4 g/L dAMP, 30g/L glikoz, 31,2g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2g/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1,2g/L KCl, 1g/L NH<sub>4</sub>Cl ve 6.7ml/L Asetaldehit) ve kırık DNA eklenerek 7 saat 30°C’de inkübe edildikten sonra elde edilen dATP’nin kromatografik olarak gösterimi. c) *S.cerevisiae* kontrol (siyah) ve *S.cerevisiae* Kırık DNA+Deney Besiyeri (pembe) sonuçlarından elde edilen dATP piklerinin karşılaştırılması.....37
- Şekil 4.12:** *S.cerevisiae* hücrelerinde glikoliz yolağının tetiklenmesi ile dATP eldesinin gösterimi. *S.cerevisiae* kontrol besiyeri 4,684 ± 0,7744; Kırık DNA+ deney besiyeri 59,17 ±11,48. Kırık DNA+ deney besiyeri, \*\* p≤0,01.....38
- Şekil 4.13:** MCF-7 meme kanseri hücre hattında kontrol besiyeri ve deney besiyeri (1.4 g/L dAMP, 30g/L glikoz, 31,2g/L Monosodyum Fosfat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 2g/L Magnezyum klorür heksahidrat (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O), 1,2g/L Potasyum Klorür (KCl), 1g/L Amonyum Klorür (NH<sub>4</sub>Cl) ve 6.7ml/L Asetaldehit) içerisinde 5 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra elde edilen sonuçların kromatografik olarak gösterimi. ....39
- Şekil 4.14:** MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında kontrol besiyeri ve deney besiyeri (1.4 g/L dAMP, 30g/L glikoz, 31,2g/L Monosodyum Fosfat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 2g/L Magnezyum klorür heksahidrat (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O), 1,2g/L Potasyum Klorür (KCl), 1g/L Amonyum Klorür (NH<sub>4</sub>Cl) ve 6.7ml/L Asetaldehit) içerisinde 5 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra elde edilen MDA-MB-231’nin kromatografik olarak gösterimi. dATP eldesi gerçekleşmemiştir.....40
- Şekil 4.15:** dATP ve dTTP’nin total konsantrasyon grafiği.....41

## SİMGE VE KISALTIMA LİSTESİ

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>ADK</b>	: Adenozin kinaz
<b>ADK1</b>	: Adenilat kinaz enzimi
<b>ADP</b>	: Adenozin difosfat
<b>ADSL</b>	: Adenilat süksinat liyaz
<b>ADSS</b>	: Adenilat süksinat sentaz
<b>AIR</b>	: 5-aminoimidazol nükleotiti
<b>AMP</b>	: Adenozin monofosfat
<b>APRT</b>	: Adenin fosforiboziltransferaz
<b>ATKaz</b>	: Aspartat karbamoilazı
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	: Kalsiyum Klorür
<b>CAD</b>	: Dihidroorotaz
<b>CDC8</b>	: Timidilat kinaz enzimi
<b>cDNA</b>	: Tamamlayıcı DNA
<b>CTP</b>	: Sitidin trifosfat
<b>dADP</b>	: Deoksiadenozin difosfat
<b>dAMP</b>	: Deoksiadenozin monofosfat
<b>dATP</b>	: Deoksiadenozin trifosfat
<b>DCC</b>	: Disikloheksokarbodiimid
<b>DHODH</b>	: Dihidroorotat dehidrogenaz (kinon)
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>DNazI</b>	: Deoksiribonükleaz I
<b>dNDP</b>	: Deoksiribonükleosit difosfat
<b>dNMP</b>	: Deoksiribonükleosit monofosfat
<b>DNPB</b>	: De novo purin biyosentezi
<b>dNTP</b>	: Deoksiribonükleosit trifosfat
<b>dTDP</b>	: Deoskitimidin difosfat
<b>dTMP</b>	: Deoksitimidin monofosfat
<b>dTTP</b>	: Deoksitimidin trifosfat
<b>EDTA</b>	: Etilendiamintetraasetik asit

<b>EMP</b>	: Embden-Meyerhoff-Parnas
<b>ER</b>	: Östrojen reseptörü
<b>FISH</b>	: Floresan in situ hibridizasyon
<b>GMP</b>	: Guanilat sentaz
<b>GMP</b>	: Guanozin 5'-monofosfata
<b>HER2</b>	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
<b>HGPRT</b>	: Hipoksantin guanin fosforiboziltransferaz
<b>HK II</b>	: Heksokinaz
<b>IMP</b>	: İnosin monofosfat
<b>IMPDH</b>	: Hipoksantin nükleotit dehidrogenaz
<b>K<sup>+</sup></b>	: Potasyum
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	: Dipotasyum hidrojen fosfat ( )
<b>KCl</b>	: Potasyum Klorür
<b>KFS II</b>	: 1-Karbamoil-Fosfat Sentetaz
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	: Mono potasyum fosfat)
<b>LB</b>	: Luria–Bertani Broth
<b>MEP</b>	: 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat yolu
<b>Mg<sup>+2</sup></b>	: Magnezyum
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnezyum Klorür
<b>MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</b>	: Magnezyum klorür heksahidrat
<b>MMR</b>	: DNA uyumsuzluk onarımı
<b>NaAc</b>	: Sodyum Asetat
<b>NaCl</b>	: Sodyum Klorür
<b>NAD</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
<b>NADH</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotit hidrit
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	: Monosodyum Fosfat
<b>NF-κB</b>	: Nükleer faktör-κB
<b>NH<sup>+4</sup></b>	: Amonyum
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	: Amonyum Klorür
<b>NTP</b>	: Nükleosit trifosfat
<b>OMP</b>	: Orotidin monofosfat
<b>OXPHOS</b>	: Oksidatif fosforilasyonu
<b>PEP</b>	: Fosfoenolpirüvat
<b>PFK-1</b>	: Fosfofruktokinaz-1

<b>PK</b>	: Pirüvat Kinaz
<b>PPP</b>	: Pentoz fosfat yolu
<b>PR</b>	: Progesteron reseptörü
<b>PRPP</b>	: Fosforibozil pirofosfat
<b>PZR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>rDNA</b>	: Rekombinant DNA
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>TAE</b>	: Tris-Asetat-EDTA
<b>TCA</b>	: Trikarboksilik asit
<b>UMP</b>	: Uridin monofosfat
<b>UMPS</b>	: Üridin Monofosfat Sentetaz
<b>UTP</b>	: Uridin trifosfat

## ÖZET

### DOKTORA TEZİ

#### REKOMBİNANT *ESCHERİCHIA COLI* HÜCRELERİ ARACILIĞIYLA NUKLEOSİT TRİFOSFATIN ENZİMATİK SENTEZİ

Sevgi BİNAY

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Ercan ARICAN

II. Danışman : Unvan Ad SOYAD

Deoksiribonükleotit trifosfatlar (dNTP) bir deoksirboz şekeri, organik baz ve fosfat grubundan oluşmaktadır. Doğal ve modifiye edilmiş dNTP'ler; Deoksironükleik asit (DNA) sentezi öncüsü, Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), Floresan in situ hibridizasyon (FISH), aptamer üretimi ve dizileme gibi moleküler biyoloji ve farmasötik araştırmalar için yapı taşıdır. Modifiye edilmiş dNTPler ise kimyasal ya da enzimatik olarak sentezlenmektedir. Kimyasal sentez sırasında kullanılan fosforlama ajanlarının çoğu toksiktir, üretim maliyeti yüksek ve çevre kirliliğine sebep olmaktadır. Bunun üstesinden gelmek için toksik olmayan enzimatik sentez sürecinde rekombinant hücreler ile gen anlatımı ve klonlaması gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bu çalışmada enzimatik sentez süreçleri ve glikoliz ile adenozin trifosfat (ATP) rejenerasyonu yöntemlerini kullanarak çevre ile uyumlu, oldukça düşük maliyetle, uzun prosedürlere ve saatlere ihtiyaç duymayan deoksiAdenozin trifosfat (dATP) ve deoksitimidin trifosfat (dTTP) eldesi amaçlanmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi ile dTTP, glikoliz yolağı ile dATP eldesi gerçekleştirilmiştir.

Temmuz 2025, 70. sayfa.

**Anahtar kelimeler:** dATP, dTTP, enzimatik sentez, glikoliz, *E.coli*, *S.cerevisiae*, cancer

## SUMMARY

### Ph.D. THESIS

#### ENZYMATIC SYNTHESIS OF NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATES VIA RECOMBINANT *ESCHERICHIA COLI* CELLS

Sevgi BİNAY

Istanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Ercan ARICAN

Co-Supervisor : Academic Title Name SURNAME

Deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs) consist of a deoxyribose sugar, an organic base, and a phosphate group. Natural and modified dNTPs; Deoxyribonucleic acid (DNA) synthesis precursor, Polymerase chain reaction (PCR), FISH, aptamer production and sequencing are the building blocks for molecular biology and pharmaceutical research. Modified dNTPs are synthesized chemically or enzymatically. Most phosphorylating agents used during chemical synthesis are toxic, have high production costs, and cause environmental pollution. To overcome this, methods such as gene expression and cloning with recombinant cells are used in the non-toxic enzymatic synthesis process. In this study, it was aimed to obtain deoxyadenosine triphosphate (dATP) and deoxythymidine triphosphate (dTTP) by using enzymatic synthesis processes and glycolysis and Adenosine triphosphate (ATP) regeneration methods, which are environmentally compatible, have a very low cost, and do not require long procedures and hours. dTTP was obtained by recombinant DNA technology and dATP was obtained by glycolysis pathway.

July 2025, 70 pages.

**Keywords:** dATP, dTTP, enzymatic synthesis, glycolysis, *E.coli*, *S.cerevisiae*, cancer

## 1. GİRİŞ

Nükleik asitler; büyüme, gelişme ve kendini yenilemesi için gerekli olan tüm genetik bilgiye sahip olmalarından dolayı oldukça önemli biyolojik moleküllerdir. Nükleik asitlerin yapı birimleri olan nükleotitler birçok biyokimyasal olayda görev almaktadır. Nükleosit trifosfatların (NTP) içeğinde bulunan adenin, guanin, sitozin ve timin veya urasil nükleobazları DNA ve RNA sentezi, replikasyonu ve transkripsiyonu sırasında önemli bir rol oynar (Espinasse ve diğ., 2020). dNTP konsantrasyonları DNA replikasyonu uygunluğu ve mutasyon oranlarının kontrolünü sağlamaktadır. Nükleotit havuzlarının belli konsantrasyonlarda tutulmasının; hücre döngüsü kontrolü, protoonkogen işlevi, mitokondriyal işlev, virüs enfeksiyonuna karşı savunma, DNA uyumsuzluk onarımı (MMR), telomer uzunluğu belirleme ve mikrosatelit tekrarlaması gibi birçok hücre süreçleriyle bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Mathews, 2014). Ek olarak nükleotitleri oluşturan nükleosit trifosfatlar pek çok enerji sağlayan metabolik yolların ürünleridir ve bu moleküller ile enerji gerektiren biyolojik süreçler gerçekleşmektedir. Metabolik yolların bir kısmı ATP, adenosin difosfat (ADP) ve adenosin monofosfat (AMP) gibi nükleotitler ile düzenlenmektedir (Chargaff, 2012; Hassinen, 2014). dTTP, DNA oluşturmak için kullanılan ham maddelerden biri olarak bilinir. Ayrıca, DNA'nın sentetik sentezi, PZR'ler ve diğer PZR tabanlı uygulamalar için temel öncül olarak modern moleküler biyolojik araştırmalarda da gereklidir. Ek olarak bazı sakkaritlerin biosentezinde dTTP ara madde olarak görev almaktadır. PZR uygulamalarına olan talebin artması ve DNA biosentezi ve şeker kimyası araştırmalarının ortaya çıkması nedeniyle, dTTP'ye olan ihtiyaç giderek artmaya devam etmektedir (Jiao ve diğ., 2015). dNTP'ler; FISH, tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi, aptamer üretimi ve DNA dizileme gibi genetik mühendisliği, moleküler biyoloji, yaşam bilimleri, genetik tıp vb. alanlarında kullanılmaktadır. Bu nedenle en çok ihtiyaç duyulan ürünler arasındadır (Espinasse ve diğ., 2020).

dNTP'lerin endüstriyel eldesinde yaygın olarak kullanılarak kimyasal süreçlerde organik çözücüler geri kazanılmalı, üretim maliyetini ve çevre kirliliğini azaltmak için geri dönüştürülmelidir. Kimyasal yöntemde ayrıştırma ve saflaştırma süreci pahalıdır ve çevre kirliliğine sebep olmaktadır. Bu dezavantajları dönüştürmek adına enzimatik dNTP eldesi amaçlanarak çalışmalar yapılmıştır. Bao ve Dewey (2006), timidilat kinaz geni CDC8 ve adenilat kinaz geni ADK1 ile ifade olan iki tür rekombinant suş hazırlamış ve bu enzimlerin

deoksiribonükleosit monofosfat (dNMP) ile reaksiyona girmelerini sağlayarak deoksiribonükleosit difosfat (dNDP) ve dNTP eldesini sağlamıştır. Deoksitimidin monofosfat (dTMP) ilk olarak timidilat kinaz ile deoksitimidin difosfat (dTDP) ve dTTP'a dönüştürülürken; deoksiadenozin monofosfat (dAMP) ise adenilat kinaz geni yardımıyla dATP'ya dönüştürülmüştür. Tüm canlı organizmalarda karbon metabolizmasını sağlayan en temel yolak Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) yolağıdır. EMP, bir glikoz molekülü başına iki pirüvat, iki net ATP ve iki nikotinamid adenin dinükleotit hidrit (NADH) molekülü üreten 10 enzimatik adımdan oluşan biyolojik süreçtir. ATP rejenerasyon hızının artırılmasıyla dATP sentez sisteminin hızına ulaştığında dATP'nin etkin biyosentezi gerçekleştirilebilmektedir (Lin ve diğ., 2018). Jian ve arkadaşları (2023), ATP rejenerasyon sistemini *S.cerevisiae*'de glikoliz yolağını tetikleyerek yaptıkları çalışmada dATP eldesini hedeflemiştirler. *Saccharomyces cerevisiae*'de dATP'nin biyokatalitik eldesi için hücre içerisindeki süreçleri kullanarak, verimli dATP sentezi gerçekleştirebilen ATP rejenerasyon sistemi kurulmuşlardır. Bu çalışmada, Rekombinant *E.coli* hücrelerinde enzimatik sentez sürecine ait yöntemler oluşturularak dTTP eldesi ile ATP rejenerasyon sürecini kullanan glikoliz yolağını tetikleyerek *Enterobacteriaceae* familyasının bir üyesi olan gram negatif bakteri *E.coli*, tomurcuklanan bir maya türü olan *S.cerevisiae*, metastatik meme adenokarsinomu orijinli triple negatif meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 ve östrojen pozitif meme kanseri MCF-7 hücre hattında dATP eldesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL KISIMLAR

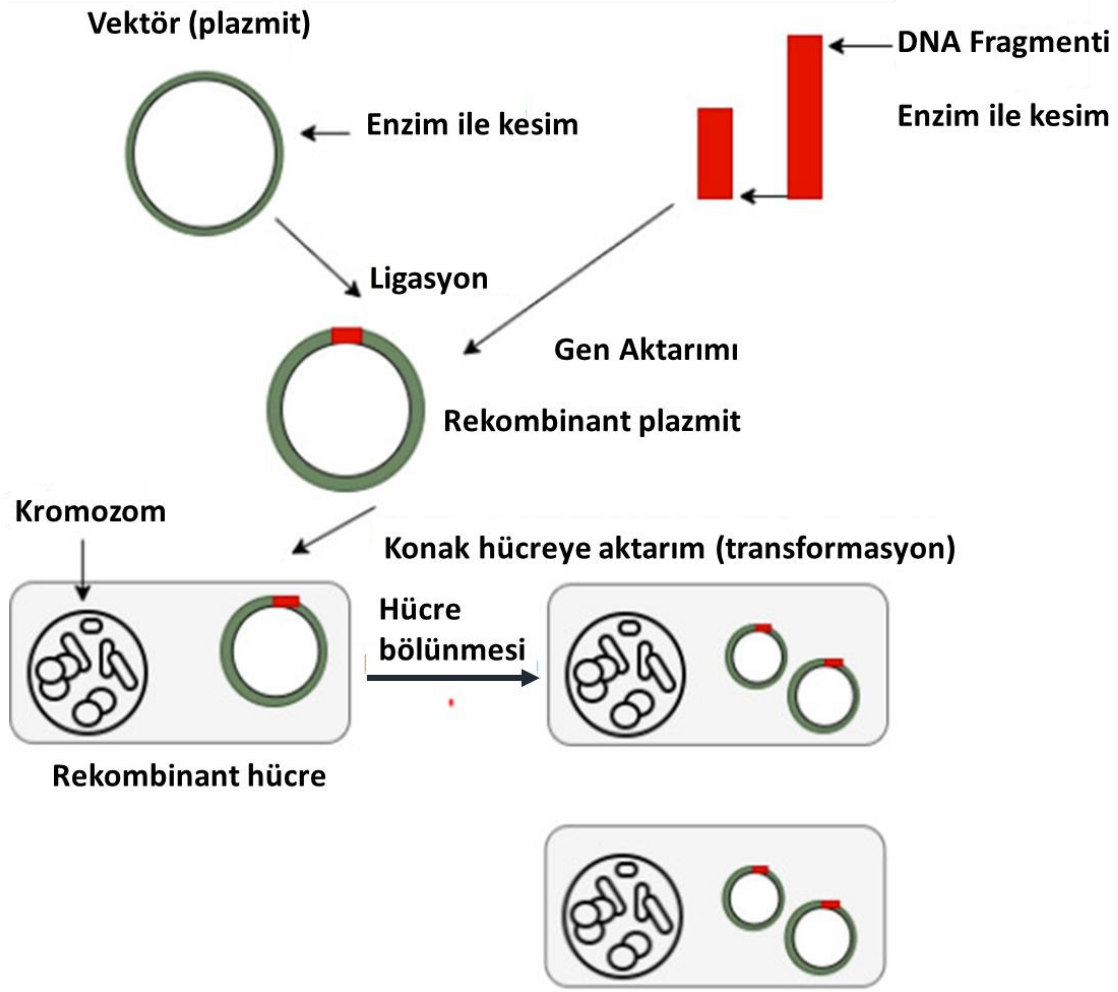
### 2.1. REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

Gıda, sağlık, temiz ve güvenli bir ortam temel insan gereksinimleridir. Sanayi ve teknoloji alanlarında meydana gelen gelişmeler gıda üretiminde artış ve sağlık sisteminde ilerlemeler gibi avantajlar sağlarken, hala daha tüm dünyaya yetebilecek kapasiteye sahip olmaması ve çok fazla çevre kirliliğine neden olması gibi dezavantajlara sahiptirler. Eski ve geleneksel yöntemler yerine artık daha az zaman alan ve daha güvenilir ürünlerin ortaya çıkarılmasını sağlayan moleküler klonlama ve transformasyon gibi, genetik mühendisliği araçları ve yaklaşımları kullanmaya başlanmıştır (Kumar ve Kumar, 2015).

Hastalıkların tedavilerinde en önemli rolü alan ilaçların çoğu biyoteknoloji alanında oluşturulmuş rekombinant ürünlerdir. Rekombinant DNA teknolojisiyle sentezlenen farmasötik ürünler sayesinde insan yaşamı tamamen değişmiştir (Firdos ve Wang, 2022). Ayrıca biyoyakıtlar ve biyoetanölün dönüştürülmesi, petrol sızıntılarını, karbon ve diğer toksik atıkları çevreye zarar vermeyecek şekilde geri dönüştürülmesi için de genetik mühendisliği uygulamaları kullanılmaktadır (Ullah ve diğ., 2015). Dolayısıyla tüm bu zorlukların üstesinden gelmek için çok büyük bir potansiyele sahiptir.

1975 yılında yapılan Asilomar Konferansında rDNA teknolojisinin geliştirilmesi, kullanım alanları ve güvenilirliği hakkında tartışmalar yapılmıştır. Bu konferansta konuşulanların aksine tarım ve ilaç geliştirmek için kullanılan rekombinant DNA yöntemleri tahmin edilemeyen deneysel zorluklar dolayısıyla daha uzun sürede ilerlemiştir. Süreç yavaş ilerlese de ilaçlar, hormonlar, aşular, terapötik ajanlar ve teşhis araçları gibi bir çok ürün sağlık alanında kullanılmak üzere sürekli olarak geliştirilmektedir (Bazan-Peregrino ve diğ., 2013).

Hücrenin içerisine dışarıdan yabancı bir DNA'nın girmesi ve hücre içerisinde ifade olmasının sağlanmasına aracı olan rekombinant DNA teknolojisinin ortaya çıkışı biyolojideki gelişmeyi kökten değiştirmiştir. Tıbbi genetik ve biyomedikal alanlarında mikroorganizmaları, hayvanları ve bitkileri kullanarak yararlı maddeler elde edilmesini sağlamış ve geniş bir yelpazede terapötik ürün üretmek için fırsatlar sunmuştur (Steinberg ve Raso, 1998).



**Şekil 2.1:** Rekombinant DNA Teknolojisinin basamakları. Rekombinant DNA Teknolojisi, istenilen gen bölgesini içeren DNA fragmenti ile bakteri hücrelerinden elde edilmiş plazmitin restriksiyon enzimeleri ile kesilmesi daha sonra kesilmiş gen bölgesi ve plazmitin bir araya getirmesi ve son olarak konak hücre içerisine aktarılması ile gerçekleşir. Konak hücre içerisinde plazmitin içerisine aktarılan gen bölgesinin ifade olması hedeflenir (Gill ve diğ., 2023).

Frederick Griffith'in 1928 yılında zatüreye sebep olan bakteriler üzerinde yaptığı çalışmalar sırasında ısı ile öldürülmüş patojenik bir bakterinin, patojeniteye sahip olmayan hücreleri dönüştürebildiğini ve dolayısıyla transformasyonu keşfetmiştir (Das ve Hirak, 2015). Bu çalışmaları İsviçreli biyolog Werner Arber ve meslektaşlarının DNA'yı belirli dizilerden kesen restriksiyon endonükleazları ve Arber ve Stuart'ın (1969) DNA ligazlarını keşfetmiştir. Stanford Üniversitesi'nde Stanley Cohen, plazmitlerin bağımsız bir şekilde kopyalayabildiklerini ve konjugasyon yolu ile DNA parça değişimini

gerçekleştirebildiklerini bulmuştur (Cohen ve diğ., 1972). Ulusal Sağlık Enstitüsü'nden Martin Gellert 1967 yılının başlarında, Escherichia coli özütünden elde edilen doğrusal olan  $\lambda$  (lamda) faj DNA'sının magnezyum ( $Mg^{+2}$ ) iyonları yardımıyla dairesel forma dönüştürülebileceğini göstermiştir (Gellert, 1967). Tüm bu çalışmalar Rekombinant DNA teknolojisinin temelini oluşturmuştur. İki farklı türden elde edilen DNA'ların bir araya getirilmesi ile hibrit DNA molekülünün oluşturulmasını sağlayan teknolojiye Rekombinant DNA Teknolojisi denilmektedir ve sonraki yıllarda bu çalışmalar daha da geliştirilmiştir. (Glick ve Cheryl, 2017).

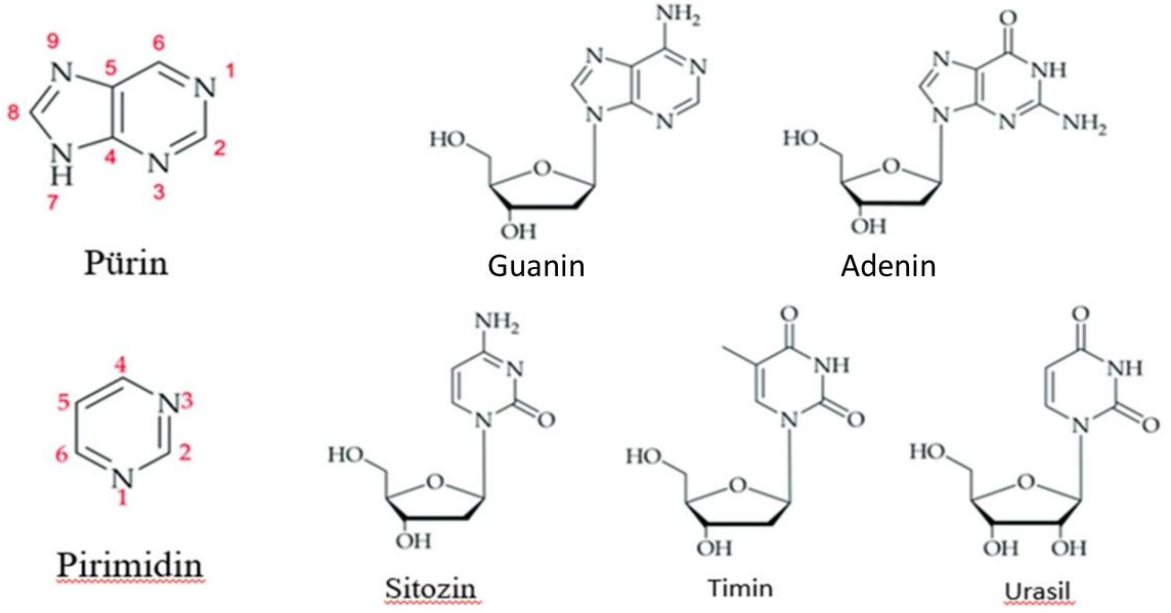
İlk yapılan çalışmalarda Rekombinant DNA teknolojisi ile klonlanmış insülin genlerinin bir maymun virüsü parçasının içine yerleştirilmesi yoluyla genetik ifadesi sağlanmıştır (Lomedico, 1982). Kanser çalışmalarında da rekombinant DNA teknolojisi kullanılmıştır. Tümör oluşumu, metastaza yol açan antianjiyojenik faktörlerden insan salgı formunu kodlayan gen adenoviral vektör kullanılarak baskılanmıştır. Hedeflenen geninin baskılanması diğer konaklarda antitümör türevleri üretmek için teşvik edici olmuştur (Li ve diğ., 2013). Ek olarak rekombinant DNA teknolojileri kullanılarak daha uzun süre etkili olan terapötik proteinler geliştirilmiştir. Örneğin, FSH  $\beta$ -alt birim kodlama dizilerini ve hCG  $\beta$ -alt birim kodlama dizilerinin C-terminal peptidini içeren yeni bir kimerik gen geliştirilmiştir (Fauser ve diğ., 2009). Araştırmacılar ayrıca gen terapisi ve genetik modifikasyon yöntemlerine uygun ve daha etkili kompleks vektörleri geliştirmişlerdir. Şu anda, viral vektörler klinik ortamlarda büyük ilgi görmektedir ve bunlardan bazıları ticarileştirilmiştir. Virüslerden elde edilmiş olan vektörler klinik araştırmalar için daha güvenli hale getirilecek şekilde geliştirilmektedir. Kanser de dahil olmak üzere ciddi hastalıkların in vivo veya gen terapisi (ex vivo), aşılama ve protein transdüksiyonu yaklaşımları ile tedavisi de dahil olmak üzere çeşitli uygulamaları vardır (Merten ve Gaillet, 2016) . Klinik alanlarda kullanılan viral vektörlerin üretiminin geliştirilmesi ve iyileştirmesi ileri teknoloji kullanımı sayesinde daha kolaylaşmaktadır (Merten ve diğ., 2014). Ciddi yan etkiler oluşturması nedeniyle, retroviral vektörler yerinde özellikle kaslar olmak üzere belirli dokulara doğrudan enjekte edildiğinde DNA vektörleri kullanır ve en az yan etkiyle önemli düzeyde gen ifadesi üretmesi sağlanır (Ginn ve diğ., 2012). Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucu Rekombinant DNA elektroporasyon yöntemleri sayesinde başarıyla aktarılmaktadır. Bu yeni klonlama sistemi, başlangıçta ortalama 130-150 kb çift ek parçası boyutunda 15.000 klon kütüphanesi oluşturmak için kullanılır (Rivero-Müller ve diğ., 2007). Örneğin, pWSK29, pWKS30, pWSK129 ve pWKS130 gibi düşük kopya sayısına sahip vektörlerin inşası PZR ve rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu vektörler ayrıca ekzonükleaz

ile tek yönlü delesyonlar, tamamlayıcı analiz, DNA dizilemesi ve akış transkripsiyonu oluşturmak için de kullanılabilir (Metzger IV ve diğ., 2009).

Rekombinant DNA teknolojisi, canlı organizmalarda veya bunların ürünlerinde, gelişmiş ve istenen özellikleri elde etmek için bir organizmanın genetik materyalini değiştirmeyi içerir. Bu teknoloji, istenilen DNA dizisinin bir vektör içerisine eklenmesini ile gerçekleşmektedir (Berk, 2008). Organizma genomunda genlerin ve plazmitlerin bir araya getirilmesi sonucu gen ifadesinde düzenleme sağlanabilmektedir (Bazan-Peregrino ve diğ., 2013). Restriksiyon endonükleazları aracılığıyla olan enzimatik kesim sonucunda DNA bölgeleri belirli hedef dizilerden kesilir ve daha sonra birleştirilmek istenilen vektör içerisine DNA ligaz enzimi kullanılarak aktarılır. Daha sonra vektör, eklenen DNA parçasının birden fazla kopyasını üretmek için büyütülen bir konak organizmaya aktarılır ve son olarak ilgili bir DNA parçasını içeren klonlar seçilir ve alt kültürlenir (Venter, 2007).

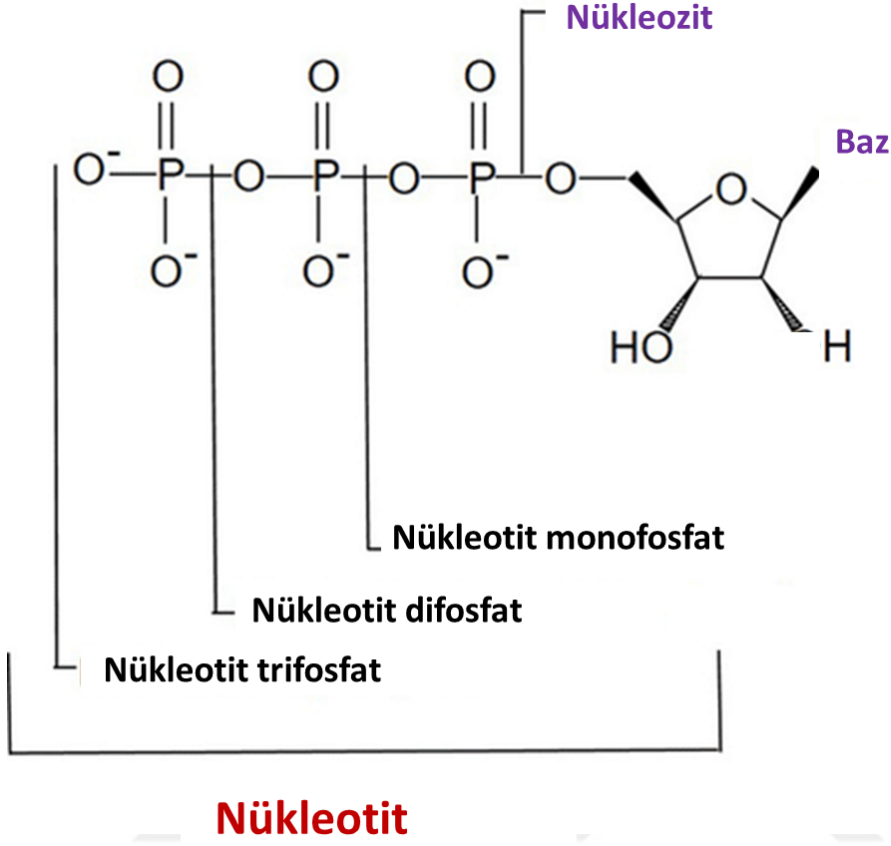
## 2.2. NÜKLEOTİT YAPILARI

Bir deoksirboz şekeri, organik baz ve bir fosfat grubu oluşan nükleotit, organizmadaki en önemli moleküllerden biridir. Bir nükleotit üç fosfat grubu içermektedir fakat DNA sentezi sırasında iki fosfat grubu ayrılır dolayısıyla oluşan DNA ipliği nükleotit başına bir fosfat grubu içerir. DNA'da organik bazlar pürin ve pirimidin bazları olarak iki tanedir. Pürinler ve pirimidinler, azot içeren heterosiklik aromatik bileşiklerden oluşmaktadır. Pirimidinler, iki azot atomu içeren heterosiklik halkası iken pürinler 4 ve 5 numaralı karbonlarında heterosiklik halkaların birleştiği bileşikleridir ve dört azot atomu içerir. Pürin, bir imidazol ( $\text{CH}_3\text{N}$ ) halkasına kaynaşmış bir pirimidin halkası olarak pirimidin türevi olarak adlandırılmaktadır (Mikhailopulo ve Miroshnikov, 2010). DNA ve RNA'da ortak olarak adenin ve guanin pürinlerdir. Sitozin ve timin DNA'da bulunan pirimidinler iken sitozin ve urasil RNA'da bulunan pirimidinlerdir.



**Şekil 2.2:** Pürin ve Pirimin kimyasal yapılarının gösterimi. DNA'daki pürinler RNA ile ortak olarak adenin ve guanin'dir. DNA'da bulunan pirimidinler sitozin ve timin iken RNA'da bulunan pirimidinler sitozin ve urasildir. (Balasubramaniyam ve diğ., 2021'den alınmıştır)

DNA'da 2-deoksi-D-ribofuranoz'a (2'-Deoksiriboz) veya RNA'da D-ribofuranoz (D-riboz;) pentozlarının C1' karbonu ile purin içindeki N9 atomu ve pirimidin içindeki N1 atomu arasında N-glikozidik bağı oluşturması sonucu nükleozit yapısı meydana gelmektedir. Nükleozitlerin esterifikasyonu ile molekülün 5' ucundan fosforile edilmesi sonucu nükleotitler oluşmaktadır. Fosfatlar mono-, di- veya tri şeklinde ayrılmaktadır (Gupta ve Gupta, 2021).

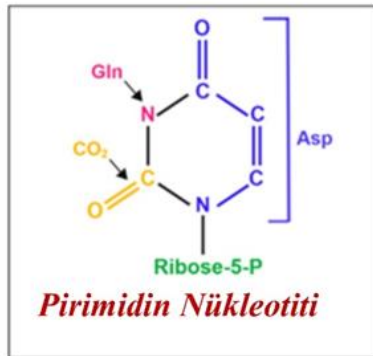
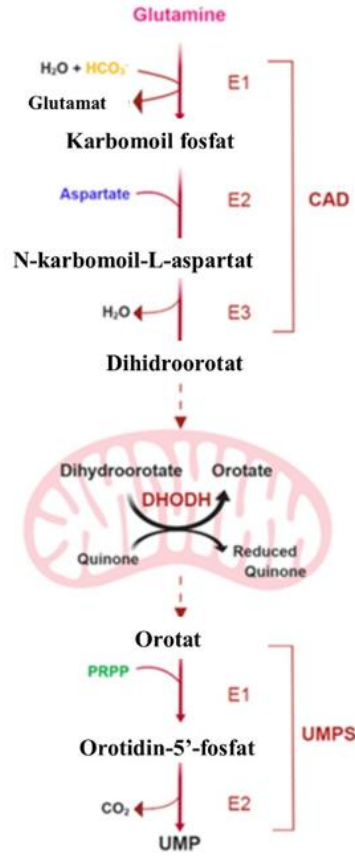


**Şekil 2.3:** Organik bazların deoksiriboz şekeri ile N-glikozidik bağ oluşturması ile nükleozit yapısı oluşur ve nükleozitlerinde fosfor ile olması ile nükleotit yapısı oluşmaktadır (Giuliani ve diğ., 2019 )

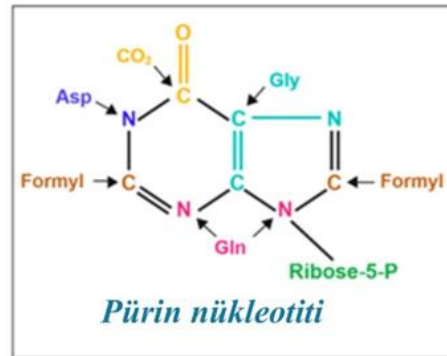
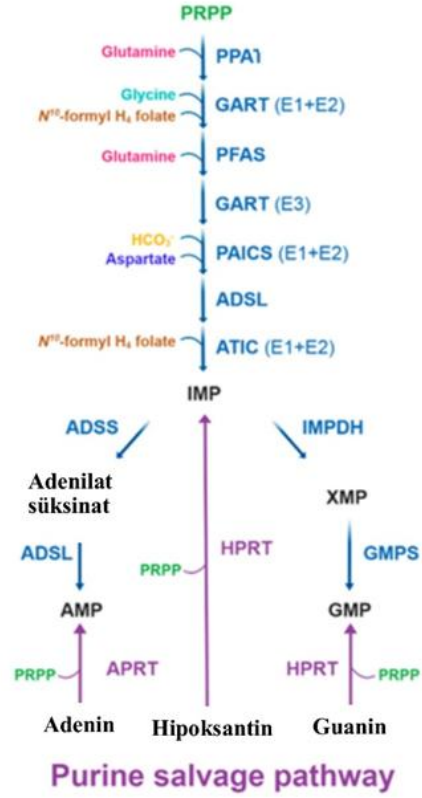
### 2.3. NÜKLEOTİT ANABOLİZMASI

Hücrelerde dNTP üretimi için *de novo* ve kurtarma yolu (salvage) olarak iki farklı biyosentetik yolak bulunmaktadır. *De novo* yolunda amino asitler ve glikozdan nükleotitler sentezlenmektedir. Kurtarma yolağında ise nükleotit oluşumu için DNA veya RNA yıkılması ile oluşan nükleozitler veya bazlar kullanılmaktadır (Walter ve Herr, 2022).

### De novo pirimidin sentezi



### De novo pürin sentezi



Şekil 2.4: Pürin ve Pirimidin sentezinin de nova ve salvage yollarının gösterimi.

#### 2.3.1. De novo ve salvage purin biyosentezi

*De novo* purin biyosentezi (DNPB), fazlaca konservatif ve enerji yoğunluğu ile karakterize edilir. Çok sayıda amino asit substratı, glutamin, ATP ve türevleri, gibi tek karbonlu üniteler

aracılığıyla 10 adımlı enzimatik bir süreç ile gerçekleşmektedir. Bu süreç farklı ortamlarda ve hücre çoğalması sırasında purinin homeostazını korumakta, hayatta kalma ve metabolizma ihtiyaçlarını karşılamaktadır. *De novo* purin biyosentezi tüm yüksek organizmalarda, altı farklı enzim kullanılarak fosforibozil pirofosfattan (PRPP) inosin monofosfata (IMP) dönüşümün katalize edilmesi ile gerçekleşmektedir. Birinci olarak pirofosfat glutaminin amino grubunun eklenmesi ile imidazol halkası oluşturulur. Daha sonra, glisin, metilchuanil ve amino grupları sırayla bağlanarak 5-aminoimidazol nükleotit (AIR) yapısı oluşturulur. Aspartik asit karboksilat, formil ve son olarak IMP oluşturmak için yıkılır ve amino grubu eldesi sağlanır. IMP amino grubunu kendine eklediğinde AMP'ye dönüştürülür. Amino grubu, adenilat süksinik asit oluşturan ve fumarik asidi serbest bırakacak olan aspartik asitten elde edilmektedir. İlk reaksiyonu katalizleyen enzim adenilat süksinat sentaz (ADSS) GTP ile enerji oluşmasını sağlar. İkinci reaksiyon adenilat süksinat liyaz (ADSL) enzimi aracılığı ile gerçekleşmektedir. IMP, hipoksantin nükleotit dehidrogenaz (IMPDH) tarafından oksitlenerek ksantin üretir. GMP üretimi ise glutaminin amino grubunu kabul etmek için guanilat sentaz (GMP) görev almaktadır. Sonuç olarak bu enzimlerin katalizlemeleri sonucu adenosin monofosfat (AMP) veya guanosin monofosfata (GMP) IMP'den dönüştürülür. Purin nükleotitlerinin remedial yolu adenosin kinaz (ADK), adenin fosforiboziltransferaz (APRT) ve hipoksantin guanin fosforiboziltransferaz (HGPR) enzimlerini içermektedir. Üç enzim de NMP üretimini katalize etmektedir. ADK' enziminin substratı ATP harcayan adenosin iken diğer iki enzimin substratı olarak purindir ve PRPP kullanmaktadır. Bir IMP molekülünün üretimi için beş ATP molekülü, iki glutamin ve format molekülü ve bir glisin, aspartat ve karbondioksit molekülü gereklidir. Öte yandan kurtarma yolunda PRPP serbest purin bazları hipoksantin, adenin ve guanine bağlanabilir ve kurtarma enzimleri hipoksantin guanin fosforiboziltransferaz (HGPR) ve adenin fosforiboziltransferaz (APRT) tarafından ilgili tek nükleotitlerine dönüştürülebilir (Allsop ve Watts, 1986). Çeşitli enzimlerin ortak etkisi ile yolak hızını arttırarak IMP'nin AMP'ye yıkımı sağlanır ve böylece AMP verimi GMP göre daha fazla artmaktadır. Purin doğal yollarla insan sağlığı için büyük öneme sahip olmasına karşın invaziv kanser türlerinde yüksek purin ihtiyacı ve üretimi bulunmaktadır (Robinson ve diğ., 2020).

Hücrede bulunan nükleobazlar ve nükleozitlerden kurtarma yolu ile purin sentezi sağlanmaktadır. Purin nükleozitlerinin karşılık gelen nükleobaz ve riboz-1-fosfata yıkımını purin nükleozit fosforilaz enzimi katalize etmektedir. Purin nükleobazları nükleobaz fosforibozil transferaz enzim aktivitesi aracılığıyla nükleozit monofosfata dönüştürülmektedir.

Nükleozit monofosfatın nükleozit difosfata veya trifosfata dönüşümünü nükleozit kinazlar katalize ederek nükleotit oluşumu gerçekleştirmektedir (Kumari ve Tripathi, 2021).

### 2.3.2. De novo ve salvage pirimidin biyosentezi

*De novo* pirimidin sentezi altı enzim ve onların oluşturduğu altı reaksiyondan oluşur: Karbamoil Fosfat Sentetaz 2 (CFS II), Aspartat Transkarbamilaz, Dihidroorotaz (CAD), Dihidroorotat dehidrogenaz (kinon) (DHODH), 1-Orotat Fosforibozil Transferaz ve 2-Orotidin-5'-Dekarboksilaz/Üridin Monofosfat Sentetaz (UMPS) (Lane ve Fan, 2015). CFS-II *de novo* pirimidin biyosentezindeki ilk enzimdir ve CO<sub>2</sub>, glutaminin, aspartat karbamoilazı (ATKaz) ve karbamoil aspartat üretmek için aspartik asit ve karbamoil fosfatın katalizlerini sağlar. ATP tüketmez ve karbamoil fosfat hidrolizi ile çalışır (Simmer ve diğ., 1990). Karbamoil fosfatın oluşumu pirimidin sentezinin ilk basamağıdır. Glutamin ve bikarbonatın sırayla karbamoil-fosfat, karbonil-l-aspartat ve dihidroorotata dönüştüğü reaksiyonu düzenleyen enzim CAD enzimidir (Li ve diğ., 2021). İç mitokondriyal zarda lokalize olan DHODH, ubikinonu indirgeyerek dihidroorotatın orotata oksidasyonunu sağlar ve mitokondriyal elektron taşıma zincirini ve oksidatif fosforilasyonu (OXPHOS) düzenlemek için solunum kompleksleri II ve III ile etkileşime girer (Bajzikova ve diğ., 2019). Mitokondriyal iç zarın dış tarafında bulunan FMN ve demire (Fe<sup>2+</sup>) bu enzim ihtiyaç duymaktadır. Pirimidin sentezinde yer alan diğer beş enzim sitozolde bulunur. *de novo* pirimidin eldesi yolağının son 2 basamağında kullanılan enzim UMPS enzimidir. UMPS orotat fosforibosil transferaz aktivitesi aracılığıyla orotat ve orotidin monofosfat (OMP) üretilmesini sağlar. UMP üretimi için OMP dekarboksilaz, OMP dekarboksilasyonunu gerçekleştirir. Purin nükleozid trifosfatın sentezine benzer olarak uridin trifosfatın (UTP) sentezi gerçekleşmektedir. CTP sentaz tarafından katalize edilen UTP'ye amonyak eklenmesi sonucu sitidin trifosfat (CTP) oluşur. Hayvanlarda amino grubu glutamin tarafından sağlanırken, bakterilerde doğrudan amonyak eklenmesi sonucu gerçekleşir. OMP'nin dekarboksilasyonunun ürünü Uridin monofosfattır. UMP. UDP, UTP, dTTP, CTP ve dCTP'yi sentezlemek için kullanılan UMP, *de novo* ve kurtarma pirimidin sentez yollarında kullanılan ortak yapı birimidir (Löffler ve diğ., 2005).

Kurtarma yolağı ile pirimidin eldesinde, pirimidin bazları ve nükleozidleri kullanılmaktadır. Hücre içerisindeki nükleotitlerin yıkılması sonucu veya permeazlar tarafından dış ortamdan hücreye aktarılması sonucu pirimidin bazları veya nükleozitleri elde edilmektedir pirimidin nükleozid fosforilazları aracılığıyla üridin, sitidin ve timidin sırasıyla urasil, sitozin ve timine

dönüştürülür. Urasil fosforibozitransferaz enzimi urasili UMP'ye dönüştürür. Sitozin deaminaz enzimi Sitozini urasile deaminasyona uğratar. Sonuç olarak oluşan urasil de UMP'ye dönüştürülür. Urasil ve sitozin tarafından üretilen UMP; UDP, UTP ve CTP'ye dönüştürülür (Kumari ve Tripathi, 2021).

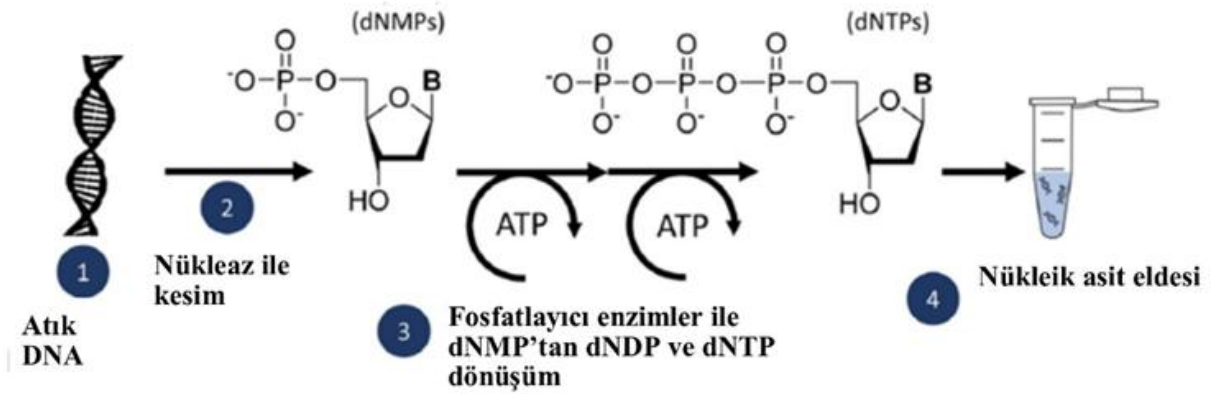
#### **2.4. NÜKLEOTİTLERİN KİMYASAL SENTEZİ**

Deoksinükleotit monofosfatlar başlangıç materyali olarak kullanılmaktadır. Pirofosforik asit ve disikloheksokarbodiimid (DCC) fosforlama ajanları olarak kullanılır. Kimyasal yöntemde kullanılan ajanların çoğu toksiktir. Reaksiyon sonucunda reaksiyona girmemiş dNMP, dNDP, pirofosfatlar ile DCC, ortofosforik asit ve deoksinükleositin ayrıştırılması gerekmektedir. Ek olarak, kimyasal sentez sırasında kullanılan piridin veya N, N-dimetilformamid gibi çözücüler geri kazanım sürecinden geçirilmeli, üretim maliyetini ve çevre kirliliğini azaltmak için geri dönüştürülmelidir. Dolayısıyla ayrıştırma ve saflaştırma süreci pahalıdır ve çevre kirliliğine sebep olmaktadır (Yang ve diğ., 2014; Zhang ve diğ., 2015).

#### **2.5. NÜKLEOTİTLERİN ENZİMATİK SENTEZİ**

Kimyasal sentezin ayrıştırma ve saflaştırma süreçlerinin uzun ve pahalı olması ve toksik içerikleri gibi sınırlamalarının üstesinden gelebilmek için enzimatik dNTP sentezi yöntemleri geliştirilmiştir (Zhang ve diğ., 2015). Enzimatik süreçte dNMP'lar biyolojik süreçlerde ilgili biyokimyasal aktiviteyi gösteren enzimler tarafından sentezlendiği için herhangi bir toksik ürün ortaya çıkmamaktadır. Enzimatik sentez süreci, dNMP eldesi ve dNMP'lara fosfat gruplarının eklenmesi ile dNDP ve daha sonra dNTP oluşumu ile ortaya çıkmaktadır (Oh ve diğ., 2003; Loan ve diğ., 2019). dNMP eldesi DNA'yı kesen enzimler aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. dNMP üretiminin kompleks ve pahalı bir süreç olması daha uygun fiyatlara eldesini sağlayan enzimatik kesim süreçlerine yönlendirmiştir. dNMP ve NMP üretim maliyetini düşürmeye yönelik ilk yaklaşım, nükleik asitleri dNMP'lara hidrolize edebilecek daha uygun mikrobiyal kökenli enzimlerin araştırılmasıdır. İkinci yaklaşım ise immobilize enzimlerin uygulamaları ve bunlara dayalı bir biyoreaktörlerin oluşturulmasıdır. Biyoreaktörler doğal bir enzimin benzersiz özelliklerini ve bir katalizörün avantajlarını birleştirir bunun yanı sıra reaksiyonun yüksek özgüllüğü, kesintisiz bir akış içerisinde reaksiyonu gerçekleştirme imkanı, reaksiyon ürünlerinin kolay ayrılması ve sürecin otomatik kontrolü olasılığı gibi özellikleri de sağlamaktadır (Bochkov ve diğ., 2006). Enzimatik süreç, kimyasal reaktiflerle ön işleme tabii

tutulan hücrelerden enzimleri izole etmek ve saflaştırmak için gereken zahmetli ve pahalı süreçleri ortadan kaldırmıştır. Kullanılan enzimlerin hücrelerin yüzeyinde olması ve substratla doğrudan temas edebilmesinden dolayı hücre geçirgenliğini arttırmak için deterjan muamelesi, enzim proteininin ayrıştırılması ve saflaştırılması gibi süreçler ortadan kaldırılmıştır. Dolayısıyla düşük maliyet ile yüksek verimlilikte dNTP üretimi sağlanmaktadır.



**Şekil 2.5:** Nükleotitlerin enzimatik süreç ile eldesi. İlk olarak DNA nükleaz ile kesime uğratılır ve dNMP eldeleri sağlanır. Daha sonra fosfatlayıcı enzimler aracılığıyla dNMP'tan dNDP'a ve dNTP dönüşümü sağlanır.

## 2.6. GLİKOZ METABOLİZMASI TETİKLENEREK ATP REJENERASYON SİSTEMİ ARACILIĞIYLA NÜKLEOTİT SENTEZİNİN DÜZENLENMESİ

Tüm canlı organizmalarda ortak bir merkezi karbon metabolizması glikoliz, pentoz fosfat yolu ve trikarboksilik asit (TCA) döngüsü gibi her biri oldukça korunan farklı reaksiyonlardan oluşmaktadır. Evrimsel olarak merkezi metabolizma, yolak uzunluğu, uygun termodinamik koşullar, metabolik ara maddelerin kimyasal özellikleri, radikal enzimlerden kaçınma ve toksik ara maddeler dahil olmak üzere belirli bir biyokimyasal kısıtlama kümesi altında temel hücresel metabolitleri birbirine dönüştürmek için optimum bir çözüm oluşturulduğu düşünülmektedir. Bu senaryoda, optimum ATP verimi EMP veya en yüksek oranları Entner-Doudoroff (ED)

sağlayanlar olarak rekabette diğer yolları geride bırakmış olduğu varsayılmaktadır (Iacometti ve diğ., 2022).

Bakteriyel glikoz metabolizması EMP, ED, pentoz fosfat yolu (PPP) ve oksidatif yol (glukonik asit yoluyla) dahil olmak üzere birden fazla yolun düzenlenmiş eylemlerini içermektedir (Romano ve Conway,1996). Bu yollar pirüvat, NADH ve/veya (NADPH) kullanarak ve enerji (ATP) üretimini sağlayarak bir biyoüretim merkezi olarak görev almaktadırlar (Fraenkel ve Vinopal, 1973). Tüm canlı organizmalarda karbon metabolizması için temel yapıyı EMP yolu sağlamaktadır. EMP yolağı bir glikoz molekülünün kullanıldığı sırada iki pirüvat, iki ATP, iki NADH molekülü oluşumunu sağlayan ve 10 enzimatik adımda gerçekleşen bir süreçtir (Lin ve diğ., 2018). *Enterobacteriaceae* bakteri ailesinin bir üyesi olan *Escherichia coli* (*E.coli*), genellikle insanların ve sıcakkanlı hayvanların gastrointestinal sistemlerinin en yaygın bulunan en önemli patojenlerden biridir (Kaper ve diğ., 2004). En bilinen insan ve hayvan patojenlerinden olması dolayısıyla çeşitli birçok hastalıklardan sorumludur. *E. coli*'nin kolay çalışılabilir olması, tam genom haritasının bilinmesi ve oksijenli ya da oksijensiz ortamlara uyum sağlama gibi kendine özgü özellikleri, biyoteknoloji alanında çok önemli bir konak organizması yapmaktadır. *E. coli*, rekombinant DNA teknolojisi alanında en çok kullanılan mikroorganizma olması dolayısıyla hem endüstriyel hem de tıbbi alanda çok çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır ( Yoo ve diğ., 2009). Örneğin, EMP yolağı ve 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat yolağı (MEP) *E. coli*'de izoprenoid biyosentezi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Liu ve diğ., 2013).

Glikoliz yolağında ilk basamak olan glikozun fruktoz-1,6-bisfosfata dönüştürülmesi sırasında 2 ATP molekülü tüketilmektedir. Pirüvata dönüştürülen her şeker için 2 ATP ve 1 NADH üretilir. Dolayısıyla glikoliz yolağı sonucunda her glikoz için 2 ATP, 2 NADH ve 2 pirüvat molekülü oluşmaktadır (Bakker ve diğ., 2001). *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), güvenli gıda sınıfında yer alan tomurcuklanan bir mayadır. Fermente edici gıdaların (ekmek), içeceklerin (bira, şarap, içkiler), biyoyakıtların üretiminde, farmasötik ve diğer önemli biyokimyasal bileşiklerin üretimi için bir hücre fabrikası olarak kullanılmaktadır (Parapouli ve diğ., 2020). *S. cerevisiae*'de pirüvatın daha fazla parçalanması solunum veya fermantasyon yoluyla meydana gelebilir. Solunum yolu, pirüvat dehidrogenaz ve TCA döngüsü yoluyla pirüvatın CO<sub>2</sub>'ye tamamen oksidasyonunu içerir ve ATP ve mitokondride oksitlenerek daha fazla ATP üretebilen indirgenmiş kofaktörler (örneğin NADH) sağlar. Pirüvat pirüvat

dekarboksilaz tarafından asetaldehite dekarboksile edilip alkol dehidrogenaz tarafından etanole indirgenir. *S. cerevisiae*'deki solunum yolu, glikoz başına yaklaşık 16 ATP üretirken, fermantasyon yolu, glikoz başına yalnızca iki ATP'lik net bir kazançla sonuçlanır. Solunum yolu tarafından sağlanan daha büyük ATP-glikoz oranına rağmen, *S. cerevisiae*, bu şeker büyüme ortamında bol miktarda olduğunda, yine de oksijen varlığında glikozu fermente eder (Pfeiffer ve Morley, 2014).

Warburg etkisi kanser hücrelerinin oksijen varlığında glikozu anaerobik yolağın olan laktik asit fermantasyonuna yönlendirerek glikozu laktata dönüştürmesi olayıdır (aerobik glikoliz) (Vander Heiden ve diğ., 2009). Glikoz iki ATP molekülü harcayarak glikoz-6-fosfat ve ardından fruktoz-6-fosfat ve fruktoz-1,6-bisfosfata dönüşerek glikoliz yolağını oluşturmaktadır. Daha sonra Fruktoz-1,6-bisfosfat, iki üç karbonlu bileşiğe (dihidroksiaseton fosfat ve gliseraldehit-3-fosfat) ayrılır. Son olarak Gliseraldehit-3-fosfat molekülleri daha sonra NADH ve ATP üretimiyle pirüvata dönüşümü sağlanarak tamamlanır. Kanser hücreleri, glikoliz yolunda üretilen glikoz 6-fosfatı ham madde olarak kullanırlar, nükleotit sentezi için ise 5-fosfat riboz üretmek üzere PPP veya metabolik ara maddeleri kullanırlar (Pei ve diğ., 2022).

Glikoliz; MYC, nükleer faktör- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), protein kinaz B, AKT ve RAS olarak bilinen birçok onkogen tarafından düzenlenir (Dang ve Semenza, 1999). Proliferasyon ve otofaji gibi çeşitli hücre aktivitelerini kontrol eden AKT bir serin/treonin protein kinazıdır. Ayrıca AKT, glikoliz yolağını GLUT1 ekspresyonu, fosfofruktokinaz-1 (PFK-1) ve heksokinaz (HK II) aktivitelerini artırarak etkilemektedir (Feng ve diğ., 2020; Robey ve Hay, 2006; Wieman ve diğ. 2007). PFK-1 ve HK-II'nin aktivitesinin artması glikoliz yolağının etkinliğini de etkilemektedir. 3-fosfoglisirik asit bir dizi reaksiyondan sonucunda serine dönüştürülür. Bu dönüşüm nükleotit *de novo* sentezi için bir karbon birimi sağlayan glisin oluşumunu tetikler. AKT, PPP'nin oksidatif olmayan yolunda TKT'nin fosforilasyonu yoluyla transketolazı aktive ederek 5-fosforiboz ve PRPP sentezini destekler ve purin ribonükleotit sentezini artırır (Saha ve diğ., 2014). Ayrıca Kanser hücrelerinde, DNA'yı sentezleyen ve hızlı hücre çoğalması sırasında transkriptomu koruyan ribozomal RNA'nın daha fazla oluşması gerektirir bu da nükleotit üretiminin büyük ölçüde artmasına neden olur (Aird ve diğ., 2013). Ek olarak nükleotitler neredeyse tüm kanser türlerinin önemli besin yollarının ve kemoterapötik hedefinin önemli bir metaboliti olarak rol oynamaktadır (Chon ve diğ., 2017). *De novo* nükleotit

biyosentetik yolunda görev alan birçok enzim kanserlerde de upregüle veya aşırı aktive olur (Goswami ve diğ., 2015; Ridder ve diğ., 2021; Chen ve diğ., 2019; Zhang ve diğ. 2021).

Meme kanseri, kadınlarda en sık teşhis edilen kanser ve kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir ve kadın kanseri vakalarının neredeyse üçte birini oluşturmaktadır (Ershler, 2006). MDA-MB-231 hücre hattı metastatik meme adenokarsinomu olan 51 yaşındaki bir kadının plevral efüzyonundan alınıp oluşturulan epitelyal insan meme kanseri hücre hattıdır. Klinik araştırmalarda en yaygın kullanılan meme kanseri hücre hatlarından biridir (Cailleau ve diğ., 1978). Östrojen reseptörü (ER) ile progesteron reseptörü (PR) ekspresyonları ve HER2 (insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2) amplifikasyonu olmaması dolayısıyla üçlü negatif meme kanseri (TNBC) hücre hattı olarak adlandırılan agresif ve invaziv bir soydur (Chavez ve diğ., 2010). İlk olarak ER ve PR ekspresyonu ve HER2 amplifikasyonundan yoksun olması dolayısıyla bazal meme kanseri hücre hattı olarak sınıflandırılmasına karşın klauidin-3 ve klauidin-4'ün aşağı düzenlenmesi, Ki-67 proliferasyon belirtecinin düşük ekspresyonunu, CD44+ CD24-/düşük fenotipi gibi meme kanseri kök hücreleriyle (CSC'ler) ilişkili özelliklerin ekspresyonunu sergilediği için klauidin-düşük moleküler alt tipine ait olduğu kabul edilmiştir (Holiday ve Speirs, 2011). Hücre hattı endotel benzeri morfoloji gösterir ve sıklıkla birden fazla hücre kolonisini birbirine bağlayan yıldız şekline sahip yayılımcı fenotipi ile hücre kültürü çalışmalarında gözlemlenmektedir (Harrell ve diğ., 2014; Kenny ve diğ.,2007).

MCF-7 meme adenokarsinomu hastası 69 yaşındaki bir kadının plevral efüzyonundan türetilerek oluşturulmuş bir meme kanseri hücre hattıdır. Adı Michigan Kanseri Vakfı'nın kısaltmasından oluşmaktadır ve en çok çalışılan insan meme kanseri hücre hattından biridir. Hücre hattı epitel benzeri bir morfolojiye sahiptir ve tek katmanlı hali ile kubbe oluşturması ile hücre kültüründe ayırt edilmektedir. Östrojen reseptörü alfa (ER- $\alpha$ )3-5'i ifade edebilen birkaç meme kanseri hücre hatlarında bir tanesidir (Comşa ve diğ., 2015).

Kanser belirtilerinden en bilineni hücrenin biyokimyasal sürecinde enerji metabolizmasının bozulmuş olmasıdır (Hanahan ve Weinberg, 2011). Bu metabolik fenotip, oksijenden bağımsız bir şekilde enerji verimi için glikolize öncelikli bağımlılığı göstermektedir. Glikoliz yoluyla oksidatif fosforilasyona göre net ATP üretiminde daha az verimli olsada kanser hücreleri bunu daha yüksek bir glikoz alımıyla avantaja dönüştürmektedir (Pelicano ve diğ., 2006).

Bu çalışmada, rekombinant DNA teknolojisi ile fosfatlayıcı gen bölgelerinin plazmit DNA içerisine aktarılması ve ifadesini sağlayarak dNMP'tan dNTP'a dönüşüm ile dATP ve dTTP eldesi hedeflenmiştir. Ayrıca, ATP rejenerasyon sisteminden yararlanılarak *E.coli*, bir maya türü olan *S.cerevisiae* ve meme kanseri hücre hatları olan MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri kullanılarak dATP eldesi amaçlanmıştır.



### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. DNMP ELDESİ

Bu tez çalışmasında, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvarlar çalışmalarından elde edilmiş olan bakteri ve maya atık DNA'larından dNMP eldesi için ilk olarak, çift zincirli atık DNA'ları denatüre etmek için 95°C su banyosu içerisinde 20 dk bekletildi. DNA'yı içeren ependorf tüpü 95°C'lik ortamdan alındıktan hemen sonra -196°C'deki sıvı azotun içerisine alınarak 20 dk bekletildi. Daha sonra ilk parçalama aşaması olarak bir endonükleaz olan Deoksiribonükleaz I (DNaz I) eklenip inkübatörde 37°C'de 10 dk tutuldu. dNMP eldesi için ikinci parçalama aşamasında ise; DNA'nın yalnızca 5' ucundaki fosfodiester bağlarının yıkımına sebep olacak bir nükleaz olan S1 nükleaz (Promega, ABD) enzimi eklendi ve ikbütörde 25°C'de 30 dk bekletildi. Son olarak enzim inaktivasyonu için Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) muamelesi ile su banyosunda 70°C'de 10 dk bekletildi.

#### 3.2. DATP VE DTTP'NİN ENZİMATİK SÜREÇ İLE ELDESİ

##### 3.2.1. *E.coli* Top10 suşu için hücre kültürü;

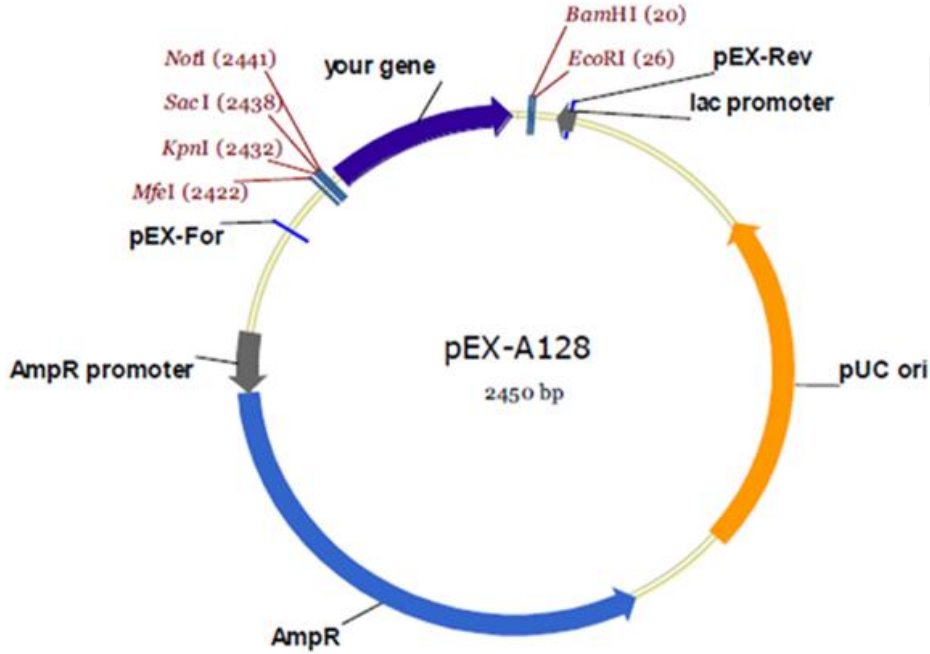
*E.coli* hücreleri; 121°C'de 1 atm basınçta, 15 dk olacak şekilde otoklavlanmış olan 20g/L Luria–Bertani Broth (LB) Lennox (Bioshop, Kanada) (LB içeriği; Trypton 10g/L, Yeast Extract 5 g/L, Sodyum Klorür (NaCl),) sıvı besiyerine ekilerek çalkalayıcı inkübatörde 37°C'de 16 saat inkübasyonuna bırakıldı. Hücreler ayrıca LB katı agarlı besiyerine ekildi ya da dondurularak -80°C'ye kaldırıldı. Katı agarlı besiyeri; 20g/L LB Lennox (Bioshop, Kanada) ve 3,5 g/L Agar içeren besiyeri otoklavlandı. Daha sonra petri kaplarına dökülerek katılaşması beklenip +4°C 'ye kaldırıldı. Kısa süreli saklama için sıvı LB besiyerinde çoğaltılmış olan hücreler öze yardımıyla katı besiyerine yayma ekim yapılarak ekildi. 37°C de 16 saat bekletildikten sonra katı besiyeri +4°C dolaba kaldırılarak saklandı. Daha uzun süre saklama için hücreler %20 gliserol içeren LB besiyeri ile dondurularak -80°C'ye kaldırıldı.

### 3.2.2. Kompetan Hücre Hazırlığı

*E.coli* Top10 hücreleri 5 ml LB sıvı besiyeri içeren 15 ml falkon tüpleri içerisine ekildi ve çalkalayıcı inkübatörde 37°C 180 rpm de bir gece bekletildi. Ertesi gün ilk etapta falkon tüpler 10 dk buzda bekletildi. Daha sonra 5000 rpmde 5 dk santirifüj edildi ve süpernatant döküldü. Pellet üzerine 1 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (Kalsiyum Klorür) eklenerek çözüldü ve 30 dk buzda bekletilerek kompetan hale getirildi. Tekrar 5000 rpmde 5 dk santirifüj edilip üst sıvı döküldü ve 200µl CaCl<sub>2</sub>'de çözüldürüldü. Hazırlanan kompetan hücreler %20 gliserol eklenip -20°C'ye kaldırılıp daha sonra kullanılmak üzere stoklandı.

### 3.2.3. ADK1 ve CDC8 Genlerinin Kompetan Hücreye Transformasyonu

*S. cerevisiae*'den elde edilmiş, ADK1 ve CDC8 genini içeren iki ayrı rekombinant DNA pEX-A128-ADK1 ve pEX-A128-CDC8 plazmitleri hazır olarak sipariş edildi.



Şekil 3.1: Klonlama vektörü pEX-A128'in yapısının gösterimi.

pEX-A128-ADK1 ve pEX-A128-CDC8 plazmitleri önceden hazırlanmış 200 µl kompetan hücre içeren 2 ayrı ependorf tüpünden birine 2 µl pEX-A128-ADK1 ve diğerine 2 µl pEX-

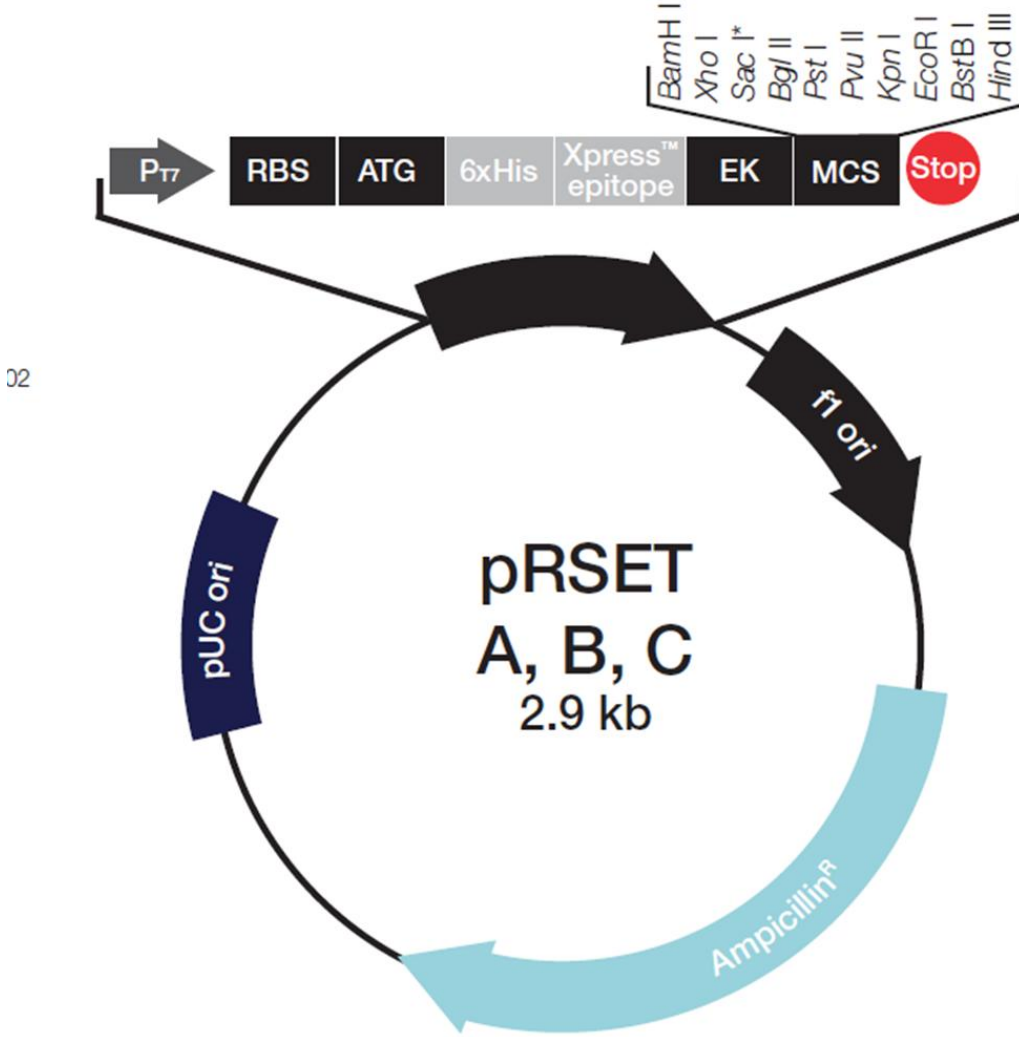
A128-CDC8 plazmitleri eklenecek şekilde 20 dk buzda bekletildi. Her iki tüpe ısı şoku uygulaması yapılarak 90 sn 42°C'de su banyosunda ve sonra 2 dk buzda bekletildi. 800 µl LB besiyeri içerisine aktarılıp çalkalayıcı inkübatörde 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Son olarak 100 µg/ml ampisilin içeren 2 ayrı katı agarlı LB besi içeren pleyte yayma ekim ile ekildiler ve 1 gece 37°C'de inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

### 3.2.4. pEX-A128-ADK1 ve pEX-A128-CDC8 Plazmitlerinin İzolasyonu

pEX-A128-ADK1 içeren ve pEX-A128-CDC8 içeren koloniler ayrı ayrı alınarak 100 µg/ml ampisilin içeren 5 ml LB besiyeri ekildi ve daha sonra çalkalayıcı inkübatörde 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda rekombinant *E.coli* süspansiyonu 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant döküldü. 100 µl lizis tamponu bakteri çökelti üzerine eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Üzerine 200 µl Alkali SDS çözeltisi eklendi ve 5 dk oda ısısında tutuldu. 150 µl soğuk potasyum asetat (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K) eklenerek 5 dk buz içersinde bekletildi ve 14000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi ve süpernatant yeni bir tüpe alındı. Süpernatant üzerine 1 ml %99 etanol eklendi ve 14000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Pellet üzerine 30 µl Tris-EDTA tamponu eklenip çözündürüldü ve 4 µl RNaz eklenip inkübatörde 37°C'de 30 dk bekletildi. Elde edilen pEX-A128-ADK1 ve pEX-A128-CDC8 plazmitlerinin miktar tayini için nanodropta (Nanodrop 2000C, Thermo Fisher Science) ölçüldü ve daha sonra kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

### 3.2.5. pEX-A128-ADK1 ve pEX-A128-CDC8 Plazmitlerinin ve Ekspresyon Vektörü pRSETA'nın Restriksiyon Endonükleazları ile Kesimi

pEX-A128-ADK1 ve pEX-A128-CDC8 plazmitlerinden endonükleaz enzimler kullanılarak ekspresyon vektörü pRSETA' aktarılmak üzere restriksiyon kesim yapıldı. pEX-A128-ADK1 ,pEX-A128-CDC8 ve pEX-A128 için KpnI ve EcoRI enzimleri kullanıldı.



Şekil 3.2: Ekspresyon vektörü pRSETA'nın yapısının gösterimi.

İlk olarak 1X Tango Buffer ile 100 ng DNA 10U/µl KpnI son konsantrasyonu 20µl olacak şekilde hazırlandı ve 2 saat inkübatörde 37°C'de bekletildi daha sonra 2X Tango Buffer kullanılarak 10U/µl EcoRI restriksiyon enzimi eklenerek son konsantrasyon 30 µl olacak

şekilde inkübatörde 37°C'de 16 saat bekletildi. Enzim inaktivasyonu için 80°C'de 5 dk bekletildi.

### **3.2.6. pEX-A128-ADK1 ve pEX-A128-CDC8 Plazmitlerinin ve Ekspresyon Vektörü pRSETA'nın Agaroz Elektroferez Yöntemi ile Görüntülemesi**

Agaroz jel 100ml Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu içerisine 1 gr agaroz eklenerek %1'lik olacak şekilde hazırlandı. 100bp plus ve 1 kb markerlar ile restriksiyon enzimleri ile kesime uğratılmış pEX-A128-ADK1, pEX-A128-CDC8 ve pRSETA örnekleri jele yüklendi. Marker kullanılarak örnek boyutları belirlendi. ADK1 gen bölgesinin boyutu 669 bp CDC8 gen bölgesinin boyutu 650 bp olduğundan 600bp ve 700bp arası bölgede bulunan kısımlar ile 2.9 bp olan kesilmiş pRSETA plazmiti jelden kesilip çıkartıldı.

### **3.2.7 Endonükleaz ile kesilmiş ADK1 ve CDC8 Gen Bölgelerinin ve pRSETA'nın Agaroz Jelden Saflaştırması**

Agaroz jelden kesilip çıkarılan ADK1, CDC8 gen bölgeleri ve pRSETA ekspresyon vektörü örnekleri ilk olarak filtreleri tüplere aktarılarak 15000 rpmde 10 dk santrifüj edildi. Filtreden tüp içerisine akan sıvı kısım üzerine ph:5.5 olan 3M Sodyum Asetat (NaAc) ve %99 Ethanol eklenip 15000 rpmde santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı ve %70 alkol ile yıkama yapılarak tekrar santrifüj edildi. Üst sıvı atılıp çökelti TE buffer eklenerek çözdürüldü.

### **3.2.8. Ekspresyon vektörü pRSETA ile ADK1 ve CDC8 gen bölgelerinin Ligasyonu**

1 µl T4 DNA Ligaz (TransGen, Çin) enzimi ve 6 µl T4 Ligaz tamponu aracılığıyla pRSETA plazmitine ADK1 ve CDC8 genleri ayrı ayrı aktarıldı ve 16°C'de 1 gece inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Ligasyon ürünleri *E.coli*'ye transforme edildi, transforme edilen hücreler ampisilin içeren katı besiyeri ortamına ekildi. Ampisilinli ortamda oluşan kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldı ve agaroz jelde yürütülerek ligasyonun başarılı olup olmadığı kontrol edildi. pRSETA-ADK1 veya pRSETA-CDC8 içeren Rekombinant *E.coli* hücrelerinden stoklar oluşturulup daha sonraki deneyler dondurularak için -80°C'ye kaldırıldı.

### 3.2.9. ADK1 ve CDC8 Gen Bölgelerinin İfade Olması

pRSETA-ADK1 veya pRSETA-CDC8 içeren Rekombinant *E.coli* hücreleri 5ml sıvı LB besiyerine ekilerek 1 gece çalkalayıcı inkübatörde 37°C’de inkübe edildi. Ertesi sabah EDTA ile 1 saat muamele edip 5 dk 5000 rpm santrifüj edilerek LB besiyeri ile rekombinant *E.coli* hücreleri ayrıştırıldı.

dAMP’den dATP’ye dönüşüm için gerekli olan steril deney besiyeri (400 mM KCl, 100 mM Magnezyum Klorür (MgCl<sub>2</sub>), 5.5 U/ml Pirüvat Kinaz, 100mM dAMP veya kırık DNA, 250 mM fosfoenolpirüvat (PEP) ve 1mM dATP) hazırlandı. pRSETA-ADK1 içeren rekombinant *E.coli* hücreleri bu sıvı besiyerine ekildi ve çalkalayıcı inkübatörde 30°C’de 150 dk bekletildi.

dTMP’den dTTP’ye dönüşümü sağlayacak steril deney besiyeri (200mM KCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.26 U/ml Pirüvat Kinaz, 50mM dTMP veya kırık DNA, 200 mM PEP ve 1mM dATP) hazırlandı. pRSETA-CDC8 içeren Rekombinant *E.coli* hücreleri çalkalayıcı inkübatörde 30°C 180 dk bekletildi (Bao ve Dewey, 2007).

Örnekler 5 dk 5000 rpm’de santrifüj edildi. Besiyeri atıldı pellet üzerine 3 ml RNaz DNaz free su eklener 16000 rpmde 25 dk santrifüj edildi. Süpernatant HPLC’de görüntülenmek üzere kaldırıldı (Bird ve diğ., 2023).

## 3.3. dATP’NİN GLİKOLİZ YOLAĞI VE ATP REJENASYONU İLE ELDESİ

### 3.3.1. *E.coli* hücrelerinde glikoliz yolağının tetiklenmesi ile dATP eldesi yöntemi

*E.coli* hücrelerinde glikoliz yolağını tetikleyerek dATP eldesi için deney besiyeri (1.4 g/L dAMP, 30g/L glikoz, 31,2g/L Monosodyum Fosfat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 2g/L Magnezyum klorür heksahidrat (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O), 1,2g/L Potasyum Klorür (KCl), 1g/L Amonyum Klorür (NH<sub>4</sub>Cl) ve 6.7ml/L Asetaldehit) şeklinde hazırlandı (Xiong ve diğ., 2023) ve 0,22mm’lik şırınga filtrelerinden geçirilerek steril edildi.

*E.coli* hücreleri ilk olarak 1 gece 37C’de inkübatörde çoğaltıldı. Daha sonra deney besiyeri ile 37°C’de 7 saat muamele edildi.

Örnekler 5000 rpm'de 5 dk olacak şekilde santrifüj edildi. Medyum atıldı çökelti üzerine 3 ml RNaz DNaz free su eklenerek 16000 rpmde 25 dk santrifüj edildi. Üst sıvı HPLC'de kromatografik olarak görüntülenmek üzere kaldırıldı.

### 3.3.2. *S.cerevisiae* hücrelerinde glikoliz yolağının tetiklenmesi ile dATP eldesi yöntemi

*S.cerevisiae* hücre kültürü için YPD besiyeri Bacto Yeast Extract 10g/L (Bacto Peptone 20g/L ve 100 ml/L %20 D-Glikoz) hazırlandı. *S.cerevisiae* YPD sıvı besiyerinde 30°C'de 16 saat inkübe edildi. *S.cerevisiae* katı besiyeri YPDA, YPD besiyerine ilave olarak 3,75g/L Agar eklenilerek hazırlandı. *S.cerevisiae* sıvı besiyerinden katı besiyerine öze yardımı ile ekilip 30°C'de 1 gece bekletilir. Hücreleri dondurmak için %20 gliserol eklenip -80°C'ye kaldırıldı.

*S.cerevisiae*'de glikoliz yolağını tetikleyerek dATP eldesi için deney besiyeri (1.4 g/L dAMP, 30g/L glikoz, 31,2g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2g/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1,2g/L KCl, 1g/L NH<sub>4</sub>Cl ve 6.7ml/L Asetaldehit) şeklinde hazırlandı (Xiong ve diğ., 2023) ve 0,22mm lik şırınga filtrelerinden geçirilerek steril edildi.

*S.cerevisiae* hücreleri ilk olarak sıvı YPD besiyerinde çalkalayıcı inkübatörde 1 gece 30°C'de çoğaltıldı. Daha sonra deney besiyeri ile 30°C'de 7 saat muamele edildi.

Örnekler 5 dk 5000 rpm'de santrifüj edildi. Medyum atıldı pellet üzerine 3 ml RNaz DNaz free su eklener 16000 rpmde 25 dk santrifüj edildi. Süpernatant HPLC'de görüntülenmek üzere kaldırıldı.

### 3.3.3. MCF-7 ve MDA-MB-231 Meme kanseri hücre hatlarında glikoliz yolağının tetiklenmesi ile dATP eldesi yöntemi

Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumunu (DMEM) ve F12 medyumunu 1:1 oranında içeren, %10 fetal sığır serum (FBS) ve penisilin streptomisin (100 U/ml penisilin G, 100 µl/ml streptomisin (PES)) içeren flasklarda 37°C'de, 1 atmosfer basınçta, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörlerde çoğaltıldı. Hücre yoğunluğu arttığında, flasttaki medyum çekilip PBS ile yıkandı. Steril TrypLE(Gibco) solüsyonu flaska eklenip 3 dakika etüvde bekletilerek hücrelerin kaldırılması

sağlandı ve sonra medyum ilave edilerek TrypLE'nin aktivitesi inhibe edildi. TrypLE ve medyum içeren solüsyon 1500g'de 5 dakika santrifüj edildi. Çöken hücrelere medyum eklenerek yeni flasklara ekim yapıldı. Çöktürülen hücreler medyumla süspansiyon edilerek uygulanacak yönteme göre ekimleri yapıldı. Hücreler uzun süre kullanılabilmesi adına donduruldu. Hücreler ilk olarak kaldırılıp falkon tüpe alınıp 1500g'de 5 dakika santrifüj edilerek toplandı. Dondurma medyumunu %90 soğuk fetal sığır serumu (FBS) ile %10 oranında kriyoprotektan ajan olarak dimetilsülfoksit (DMSO) oranlarında hazırlandı. Her kriyotüpte 1 milyon hücre olacak şekilde hücreler alikotlandı. Kriyotüpler bir gece  $-86^{\circ}\text{C}$ 'de tutulup ertesi gün  $-153^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırıldı.

Glikoliz yolağını tetikleyerek dATP eldesi için deney besiyeri (1.4 g/L dAMP, 30g/L glikoz, 31,2g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2g/L  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1,2g/L KCl, 1g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ve 6.7ml/L Asetaldehit) şeklinde hazırlandı (Xiong ve diğ., 2023) ve 0,22mm lik şırınga filtrelerinden geçirilerek steril edildi.

MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları ilk olarak DMEM-F12 besiyerinde inkübatörde 1 gece  $37^{\circ}\text{C}$ 'de çoğaltıldı. Daha sonra deney besiyeri ile  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 5 saat muamele edildi.

Örnekler scraper ile kazınıp toplandı ve 5 dk 5000 rpm'de santrifüj edildi. Medyum atıldı çökelti üzerine 3 ml RNaz DNaz free su eklener 16000 rpmde 25 dk santrifüj edildi. Üst sıvı HPLC'de görüntülenmek üzere kaldırıldı.

### **3.4. HPLC YÖNTEMİ İLE DNMP VE DNTP ANALİZİ**

Enzimatik ve glikoliz yolağı tetiklenerek elde ettiğimiz verilerin kromatografik olarak ölçümü için reaksiyon karışımları 5000 rpmde 5 dk santrifüj edilerek medyumdan ayrıştırıldı daha sonra steril su eklenerek 16000 rpm 25 dk santrifüj edilerek hücrelerin mekanik olarak parçalanması sağlandı. Süpernatant toplandı ve pH 5.0 olan 1 mM mono potasyum fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ve dipotasyum hidrojen fosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) içeren bir çözelti ile HPLC analizleri gerçekleştirildi. Mobil fazın elüsyon akış hızı, ortam sıcaklığında 1.0 mL / dk ve absorbans 254 nm olacak şekilde izlendi. C18 Kolonu, HPLC Diode Array Dedektör (SPD), HPLC gaz giderme ünitesi (DGU), HPLC kolon fırını (CTO-10AS), HPLC pompa (LC-10AD VP) (Shimadzu) kullanılmıştır.

### 3.5. İSTATİKSEL ANALİZLER

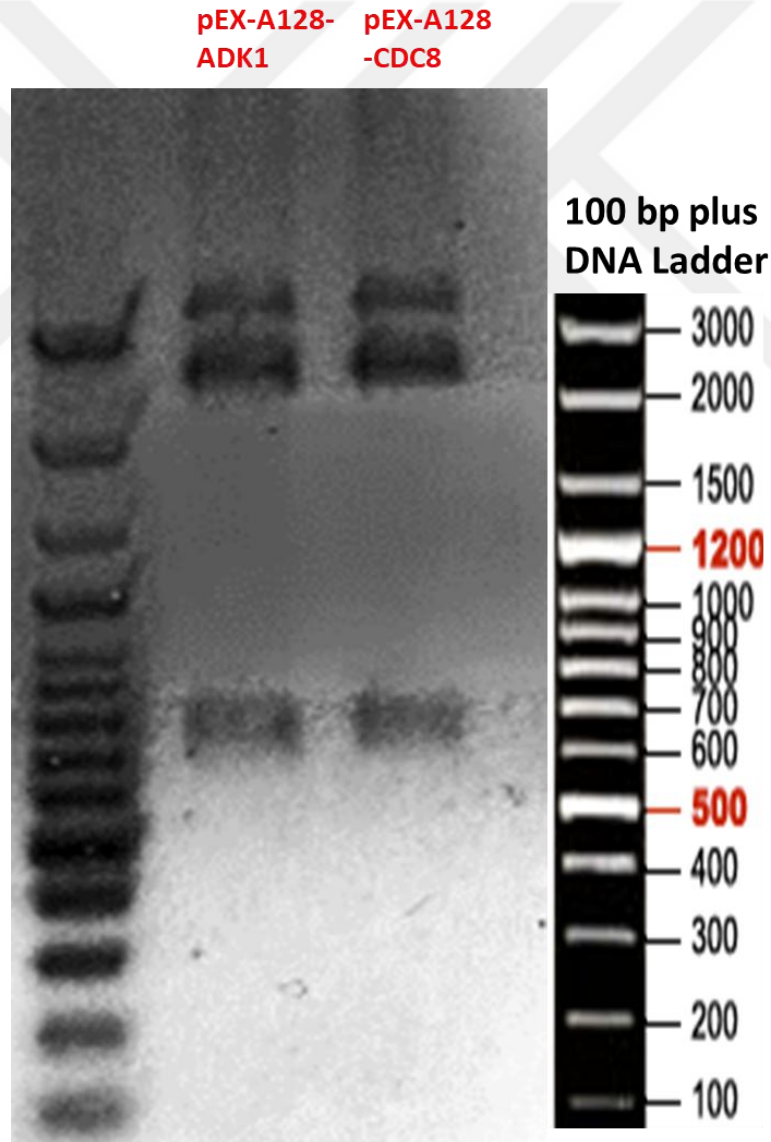
HPLC verileri Graphpad Prism (10) programında istatistiksel olarak hesaplandı. Deney ve kontrol grupları T-testi ile kıyaslanıp, istatistiksel anlamlılık dereceleri analiz edildi.



## 4. BULGULAR

### 4.1. PEX-A128-ADK1 VE PEX-A128-CDC8 PLAZMİTLERİNİN RESTRİKSİYON ENZİMLERİ İLE KESİMİ

pEX-A128-ADK1 ve pEX-A128-CDC8 klonlama vektörlerinin KpnI ve EcoRI endonükleazları ile kesimini agaroz jelde görüntüledi (Şekil 4.1). ADK1 gen bölgesinin boyutu 669 bp, CDC8 gen bölgesinin boyutu 650 bp ve klonlama vektörü olan pEX-A128'in boyutu 2450 bp olması dolayısıyla restriksiyon enzimleri KpnI ve EcoRI ile kesimlerin başarıyla gerçekleştiği gösterildi.

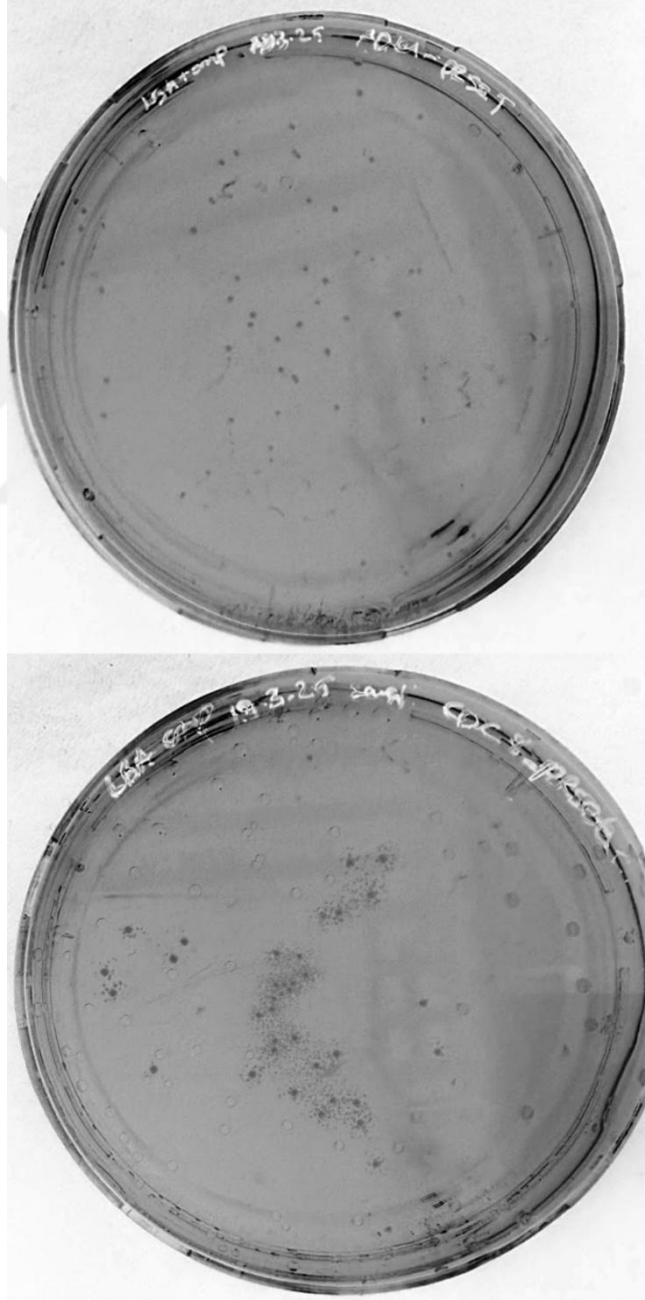


Şekil 4.1: KpnI ve EcoRI restriksiyon enzimi ile kesime uğratılmış pEX-A128-CDC8 ve pEX-A128-ADK1 plazmitlerinin %1'lik agaroz jeldeki görünüşleri. 1.kuyu) 1 kb DNA marker 2. Kuyu) 100 bp plus DNA Ladder 3. kuyu) 669 bp ADK1 gen bölgesini içeren 2450 bp pEX-A128 plazmitinin

EcoRI ve KpnI ilekesimi 4. Kuyu) 650 bp CDC8 gen bölgesini içeren 2450 bp pEX-A128 plazmitinin EcoRI ve KpnI kesim sonucu gösterilmiştir.

#### 4.2. PRSETA-ADK1 VE PRSETA-CDC8 PLAZMİTLERİNE SAHİP REKOMBİNANT E.COLİ HÜCRE KOLONİLERİ

ADK1 ve CDC8 gen bölgeleri pRSETA vektörüne ligasyon yöntemi ile aktarılıp daha sonra kompetan *E.coli* hücrelerine transforme edildi ve başarı ile aktarımı gerçekleşen *E.coli* hücrelerinin ampisilinli katı besiyeri ortamında koloni oluşturmaları gösterildi (Şekil 4.2).

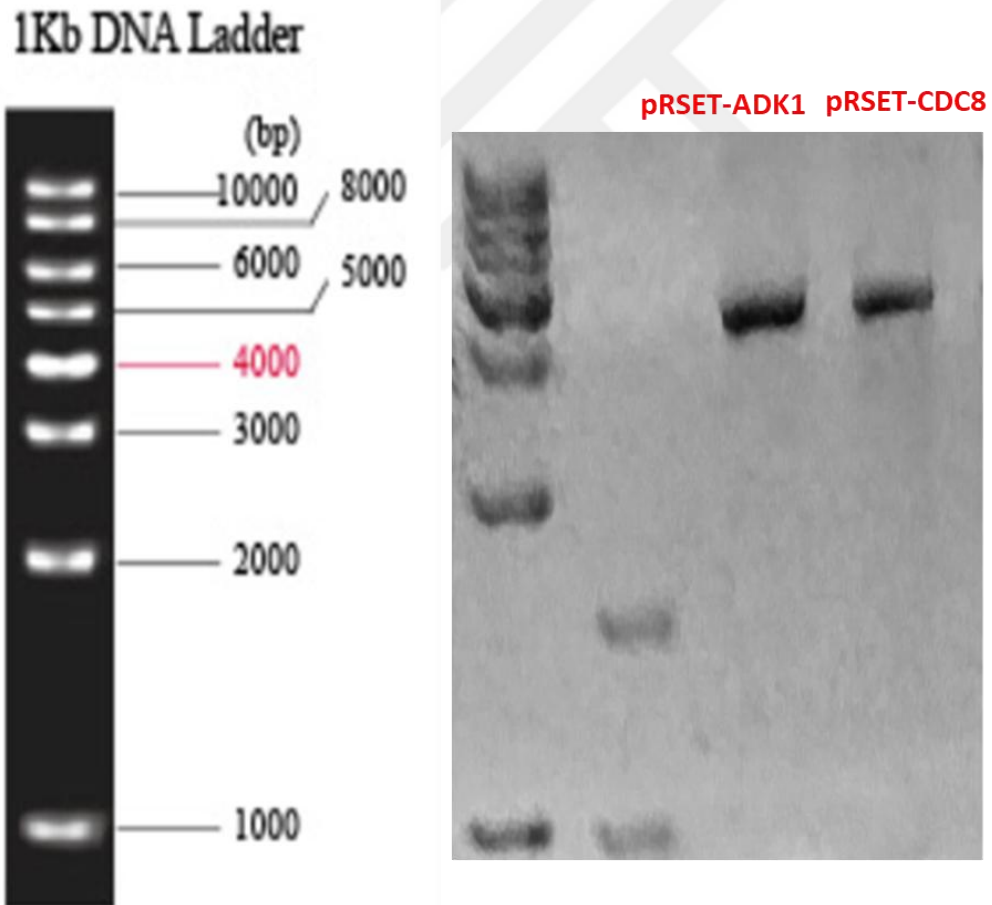


Şekil 4.2: prSET- CDC8 ve prSET-ADK1 gen ligasyonunun amfisilin içeren besiyerinde koloni oluşturmaları. Üstte; LB + Agar + 100mg/ml ampisilin içeren katı besiyerine ligasyon ürünü olan

prSET-ADK1 genin aktarılması sonucu koloni oluşumu. Altta; LB + Agar + 100mg/ml ampisilin içeren katı besiyerine ligasyon ürünü olan prSET-CDC8 ekimi sonucu koloni oluşumu

#### 4.3. PRSETA PLAZMİTİNDE ADK1 VE CDC8 GEN AKTARIMININ KANITLANMASI

pEX-A128-ADK1 ve pEX-A128-CDC8 ile ekspresyon vektörü pRSETA aynı restriksiyon enzimleri ile kesildi. Kesime uğramış ADK1 ve CDC8 gen bölgeleri ligasyon yöntemi ile pRSETA plazmitine aktarıldı. Daha sonra transformasyon, koloni seçilimi ve plazmit izolasyonu yöntemleri ile elde edilen pRSETA-ADK1 ve pRSETA-CDC8 plazmitleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü (Şekil 4.3). 669 bp ADK1 gen bölgesi ve 650 bp CDC8 ile 2.9 kb ekspresyon vektörü pRSETA'nın bir araya gelmesi oluşan plazmitin boyutlarıyla ligasyonun başarı ile gerçekleştiği gösterilmiştir.

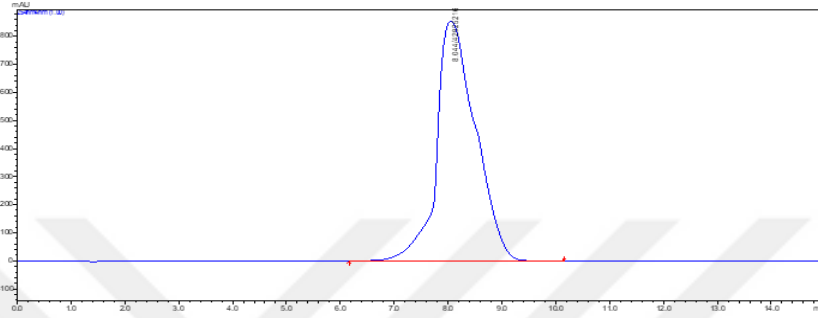


**Şekil 4.3:** *E.coli* hücrelerinden izole edilen rekombinant pRSET-ADK1 ve pRSET-CDC8 ligasyonun başarıyla gerçekleştiğinin gösterimi; 1) Boyutları bilinen DNA parçaları (1kb'lik) 2) pRSET-ADK1 ligasyonu sonucu 3) pRSET-CDC8 ligasyonu gösterilmiştir.

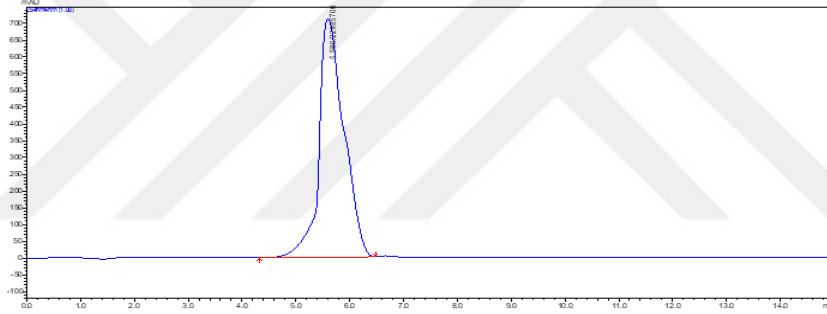
#### 4.4. DAMP İLE dATP'NİN KROMATOĞRAFİK OLARAK SAPTANMASI VE STANDART GRAFİĞİNİN OLUŞTURULMASI

dAMP ile dATP'nin kromatografik olarak alıkonma zamanları saptandı ve dATP'nin miktar tayini için standart eğri grafiği oluşturuldu (Şekil 4.4).

##### A) dAMP

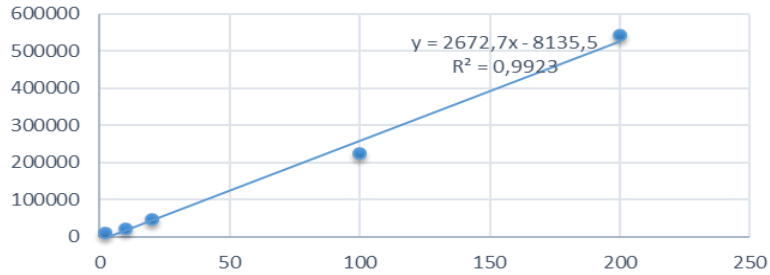


##### B) dATP

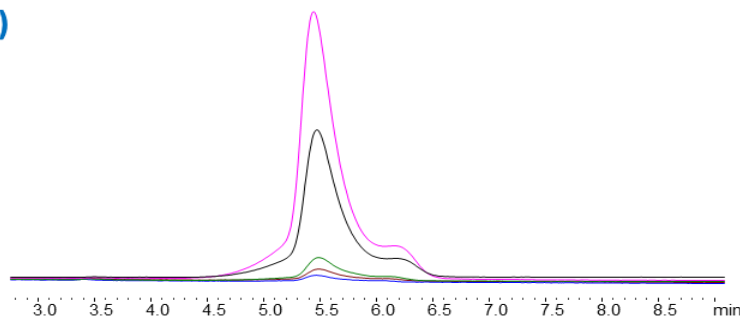


##### C)

##### dATP Standart Eğrisi



##### D)



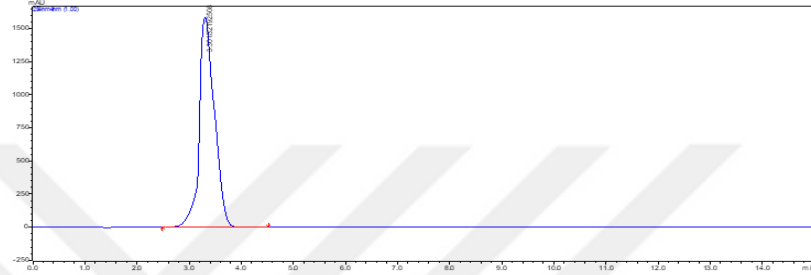
Şekil 4.4: A) dAMP'nin alıkonma zamanı 8.044 dk B) dATP alıkonma zamanı 5.590 dk şeklinde saptanması C) dATP için oluşturulmuş standart eğri grafiği. Standart seyreltmeleri 2µg/µl,

10µg/µl, 20µg/µl, 100 µg/µl, 200 µg/µl olacak şekilde hazırlandı. D) Standart seyreltme oranlarının piksel karşılaştırılmaları.

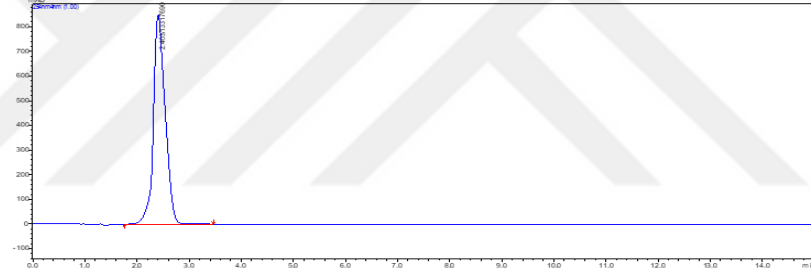
#### 4.5. DTMP İLE DTTP’NİN KROMATOĞRAFİK OLARAK SAPTANMASI VE STANDART GRAFİĞİNİN OLUŞTURULMASI

Endüstriyel dTMP ile dTTP’nin kromatografik olarak alıkonma zamanları saptandı ve dTTP’nin miktar tayini için standart eğri grafiği oluşturuldu (Şekil 4.5).

##### A) dTMP

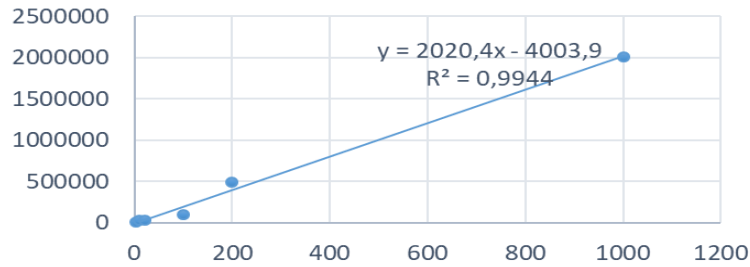


##### B) dTTP

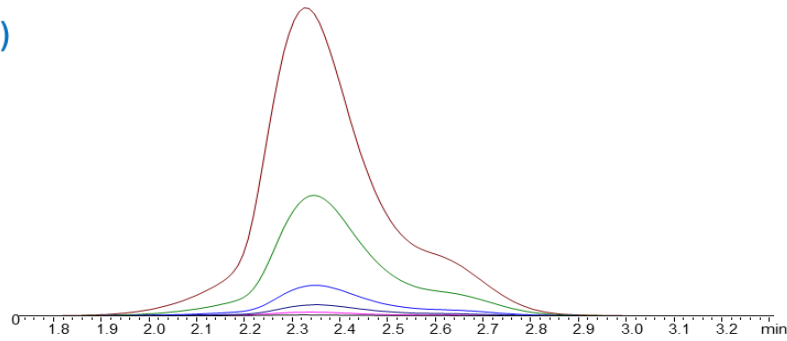


##### C)

##### dTTP standart eğrisi



##### D)

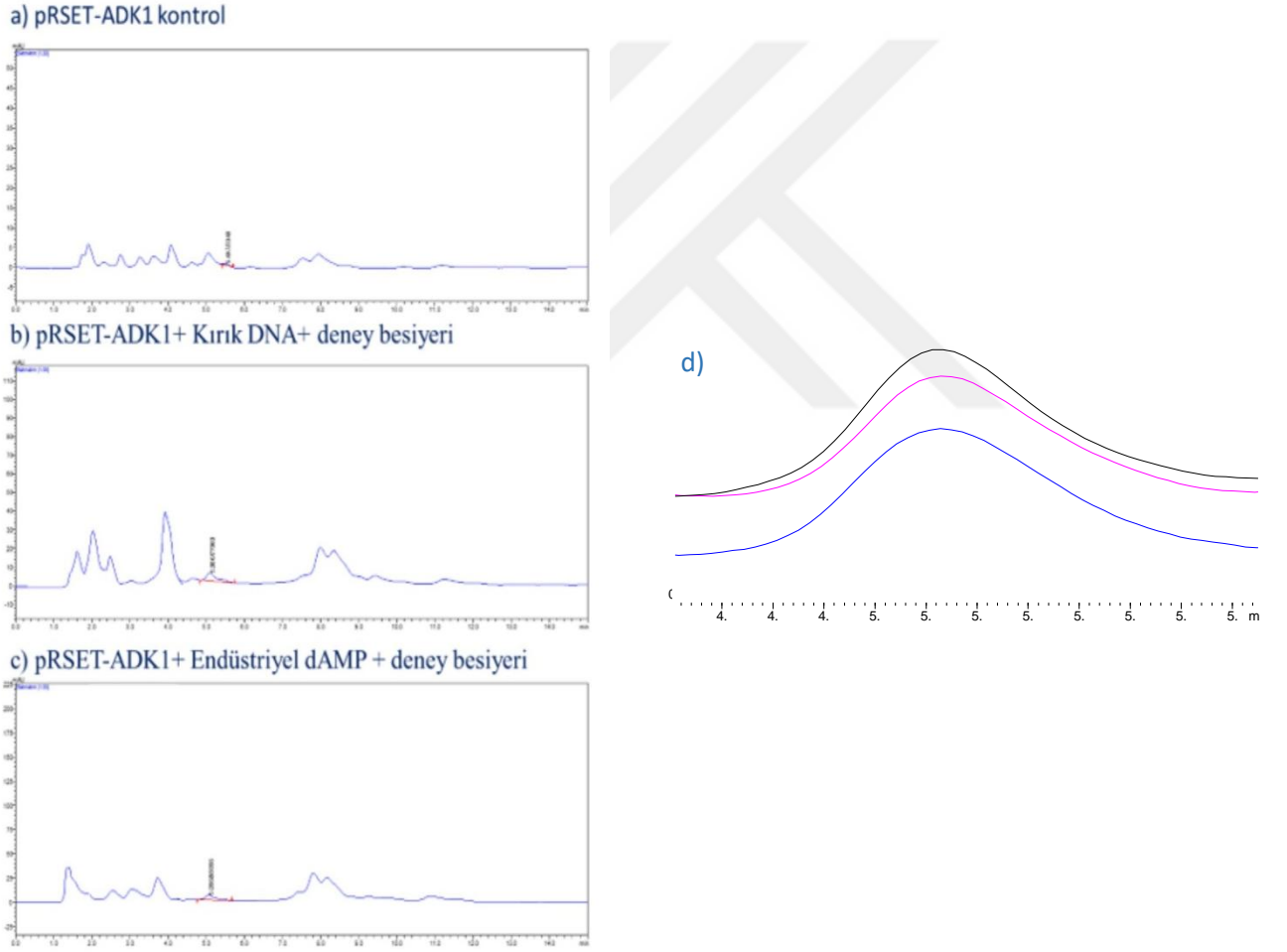


Şekil 4.5: A) dTMP’nin alıkonma zamanı 3.301 B) dTTP alıkonma zamanı 2.403 dk şeklinde saptandı C) dTTP için oluşturulmuş standart eğri grafiği. Standart seyreltmeleri 2µg/µl, 10µg/µl, 20µg/µl,

100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  olacak şekilde hazırlandı. D)Standart seyreltme oranlarının piksel karşılaştırılmaları.

#### 4.6. ENZİMATİK SÜREÇ İLE DATP ELDESİNİN GÖSTERİMİ

prSET-ADK1 plazmitini içeren rekombinant *E.coli* hücreleri negatif kontrol olarak LB besiyerinde, deney besiyeri ve endüstriyel dAMP ile ve deney besiyeri ve kırık DNA ile 2,5 saat 30°C’de inkübasyonu sonucu dATP eldeleri kontrol edildi (**Şekil 4.6**). Enzimatik süreç ile dATP eldesi verimli gerçekleşmemiş olup kontrole göre anlamlı değişiklikler olmadığı için glikoliz yolağı ile dATP eldesi yöntemleri ile çalışmaya devam edildi.

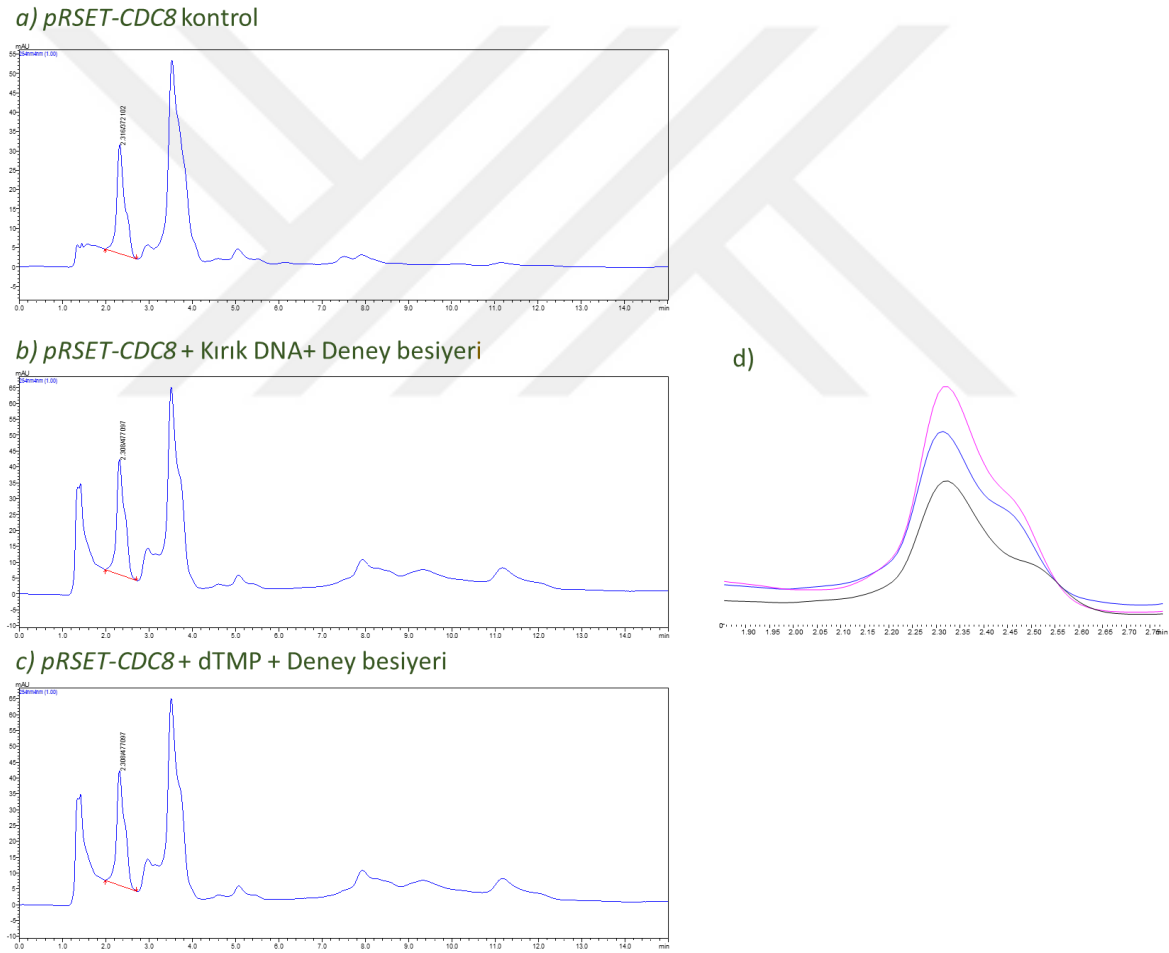


**Şekil 4.6:** a) prSET-ADK1 içeren rekombinant *E.coli* hücrelerinin LB besiyerinde 37C’de inkübe edilmesi b) Deney besiyeri (400 mM KCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.5 U/ml PK, 100mM dAMP) veya 3.1 dNMP eldesi kısmında açıkladığımız üzere elde ettiğimiz kırık DNA, 250 mM PEP ve 1mM dATP c) Deney besiyeri (400 mM KCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.5 U/ml PK, 100mM dAMP) ve endüstriyel dAMP ile muamele edilmesi ile 2.5 saat 30°C’de inkübasyonu sonucu dATP sonuçlarının HPLC ile kromatografik gösterimi. d) prSETA-ADK1 kontrol (mavi), prSETA-

ADK1+kırık DNA+deney besiyeri (siyah) ve pRSETA-ADK1+Damp+deney besiyeri (pembe) sonuçlarından elde edilen dATP piklerinin karşılaştırılması.

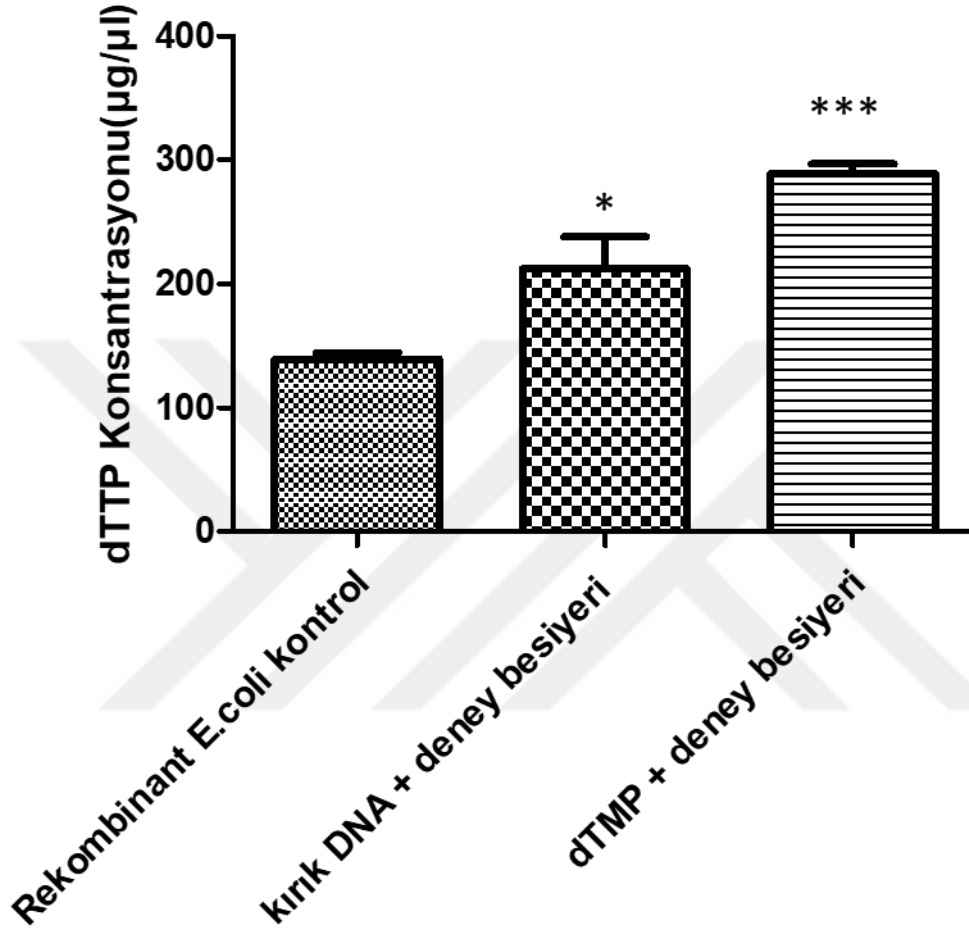
#### 4.7. ENZİMATİK SÜREÇ İLE DTTP ELDESİNİN GÖSTERİMİ

prSET-CDC8 plazmitini içeren rekombinant *E.coli* hücreleri negatif kontrol olarak LB besiyerinde, deney besiyeri ve endüstriyel dTMP ile ve deney besiyeri ve kırık DNA ile 3 saat 30°C'de inkübasyonu sonucu dTTP eldeleri HPLC ile kromatografik olarak kontrol edildi (Şekil 4.7). Kontrole göre anlamlı bir şekilde dTTP eldesi sağlandı (Şekil 4.8).



**Şekil 4.7:** a) pRSET-CDC8 içeren rekombinant *E.coli* hücrelerinin LB besiyerinde 37C'de inkübe edilmesi b) Deney besiyeri (200mM KCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.26 U/ml PK, 200 mM PEP ve 1mM dATP) ve 3.1 de bahsettiğimiz gibi elde ettiğimiz kırık DNA c) Deney besiyeri (200mM KCl, 50 mM Magnezyum Klorür (MgCl<sub>2</sub>), 0.26 U/ml PK, 200 mM PEP ve 1mM dATP) ve endüstriyel dTMP ile muamele edilmesi ile 3 saat 30°C'de inkübasyonu sonucu dTTP eldesinin HPLC ile kromatografik gösterimi. d) pRSET-CDC8 kontrol (siyah), pRSET-CDC8+kırık DNA+deney

besiyeri (mavi) ve pRSET-CDC8+Damp+deney besiyerinden (pembe) sonuçlarından elde edilen dTTP piklerinin karşılaştırılması (sağda)

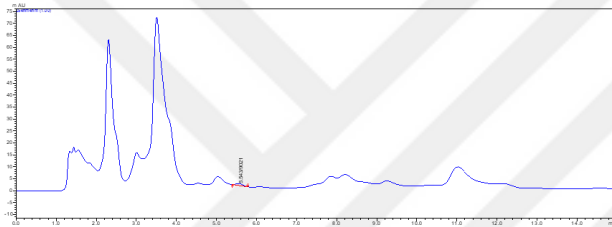


**Şekil 4.8:** pRSET-CDC8 içeren rekombinant *E.coli* hücrelerinin LB besiyerinde 37°C’de inkübe edilmesi. Rekombinant *E.coli* kontrol 139,2 ± 9,116; Kırık DNA+ deney besiyeri 212,1 ± 25,98 ; dTMP+ deney besiyeri 288,5 ± 8,103. Kırık DNA+ deney besiyeri anlamlılık, \* p≤0,05. dTMP+ deney besiyeri, \*\*\* p≤0,001.

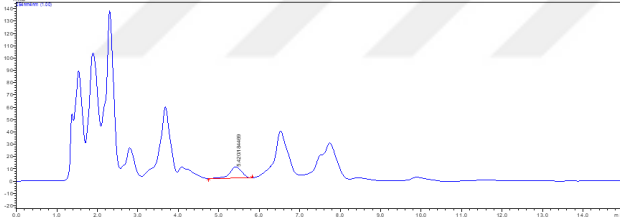
#### 4.8. *E.COLİ* HÜCRELERİNDE GLİKOLİZ YOLAĞI TETİKLENEREK DATP ELDESİ

*E.coli* hücrelerinde glikoliz yolağı ile ATP rejenarasyonunu tetikleyerek dATP eldesinin kromatografik olarak gösterimi. Negatif kontrol olarak LB besiyeri 1 gece 37°C’de ve deney besiyeri (1.4 g/L dAMP, 30g/L glikoz, 31,2g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2g/L MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 1,2g/L KCl, 1g/L NH<sub>4</sub>Cl ve 6.7ml/L Asetaldehit) ile 37°C’de 7 saat muamele edildi ve HPLC ile görüntülendi (Şekil 4.8) . Deney besiyerinde dATP eldesi başarılı bir şekilde sağlandı (Şekil 4.10).

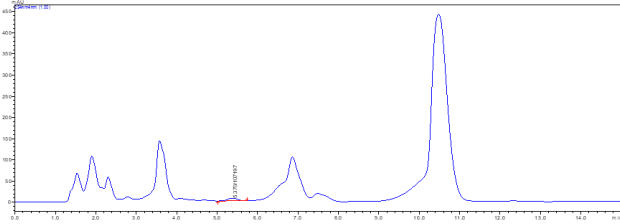
a) *E.coli* Kontrol



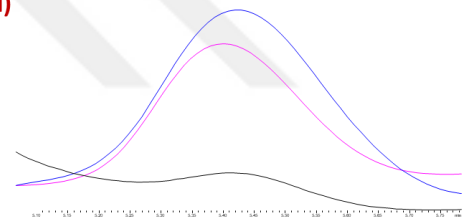
b) *E.coli* Kırık DNA + Deney Besiyeri



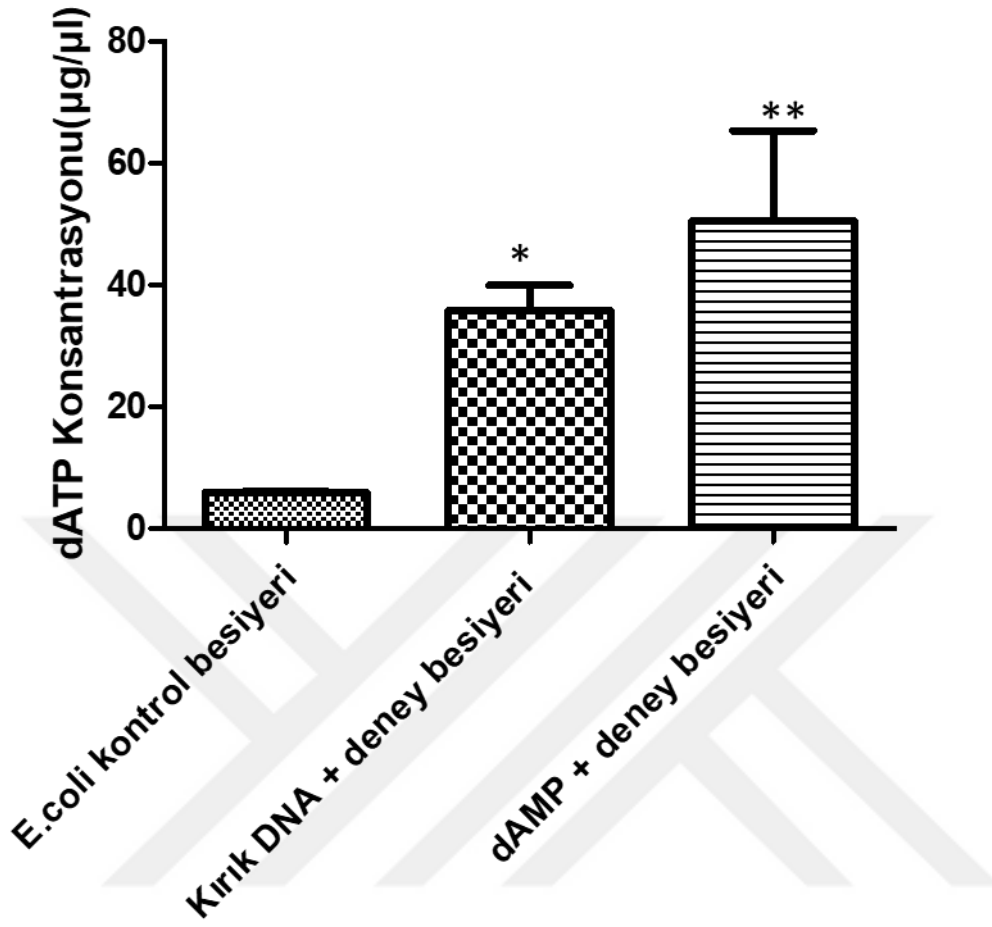
c) *E.coli* Endüstriyel dAMP + Deney Besiyeri



d)



**Şekil 4.9:** a) Negatif kontrol olarak *E.coli* hücreleri LB besiyeri içerisinde inkübe edilmesi ile elde edilmiş dATP piki b) Zenginleştirilmiş deney besiyeri (30g/L glikoz, 31,2g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2g/L MgCl<sub>2</sub>.6.H<sub>2</sub>O, 1,2g/L KCl, 1g/L NH<sub>4</sub>Cl ve 6.7ml/L Asetaldehit), kırık DNA eklenerek 7 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra elde edilen dATP gösterimi c) zenginleştirilmiş deney besiyerine kırık DNA yerine endüstriyel dAMP eklenmesi sonucu dATP’nin kromatografik olarak gösterimi. d) *E.coli* kontrol (siyah), *E.coli* Kırık DNA+Deney Besiyeri (pembe), *E.coli* Endüstriyel dAMP + deney besiyeri (mavi) sonuçlarından elde edilen dATP piklerinin karşılaştırılması

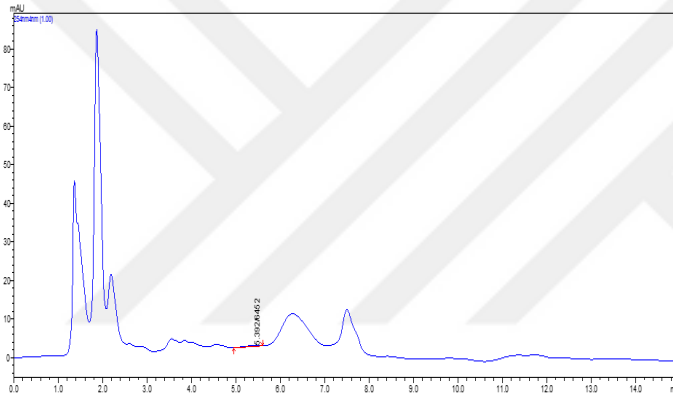


**Şekil 4.10:** *E.coli* hücrelerinde glikoliz yolağının tetiklenmesi ile dATP eldesinin gösterimi. *E.coli* kontrol besiyeri  $5,892 \pm 0,4942$ ; Kırık DNA + deney besiyeri  $35,83 \pm 7,027$ ; ; dAMP + deney besiyeri  $50,54 \pm 25,51$ . kırık DNA+ deney besiyeri, \*  $p \leq 0,01$ . endüstriyel dAMP+ deney besiyeri, \*\* ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.9. *S.CEREVISIAE* HÜCRELERİNDE GLİKOLİZ YOLAĞI TETİKLENEREK DATP ELDESİ

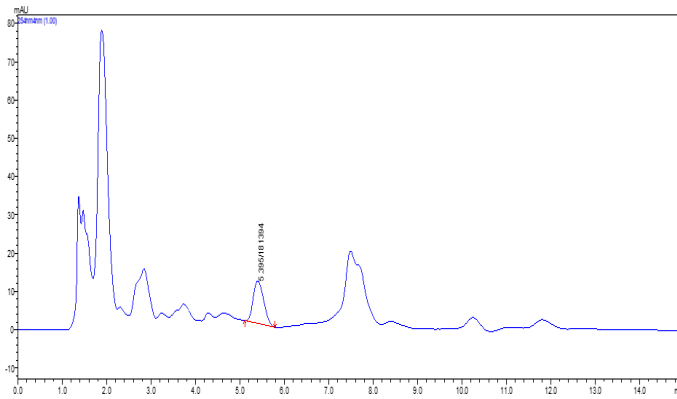
*S.cerevisiae* glikoliz yolağı tetiklenerek dATP eldesi için negatif kontrolünde YPD besiyerine ekilip 30°C’de 16 saat inkübasyona bırakılırken, deney besiyeri (1.4 g/L dAMP, 30g/L glikoz, 31,2g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2g/L MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O), 1,2g/L KCl, 1g/L NH<sub>4</sub>Cl ve 6.7ml/L Asetaldehit) ve kırık DNA eklenerek 30°C’de 7 saat muamele edildi ve HPLC ile görüntülendi (Şekil 4.11). Deney sonucunda glikoliz yolağı ile ATP rejenerasyon sistemi tetiklenerek anlamlı bir şekilde dATP eldesi sağlanmıştır (Şekil 4.12).

##### a) *S.Cerevisiae* Kontrol



c)

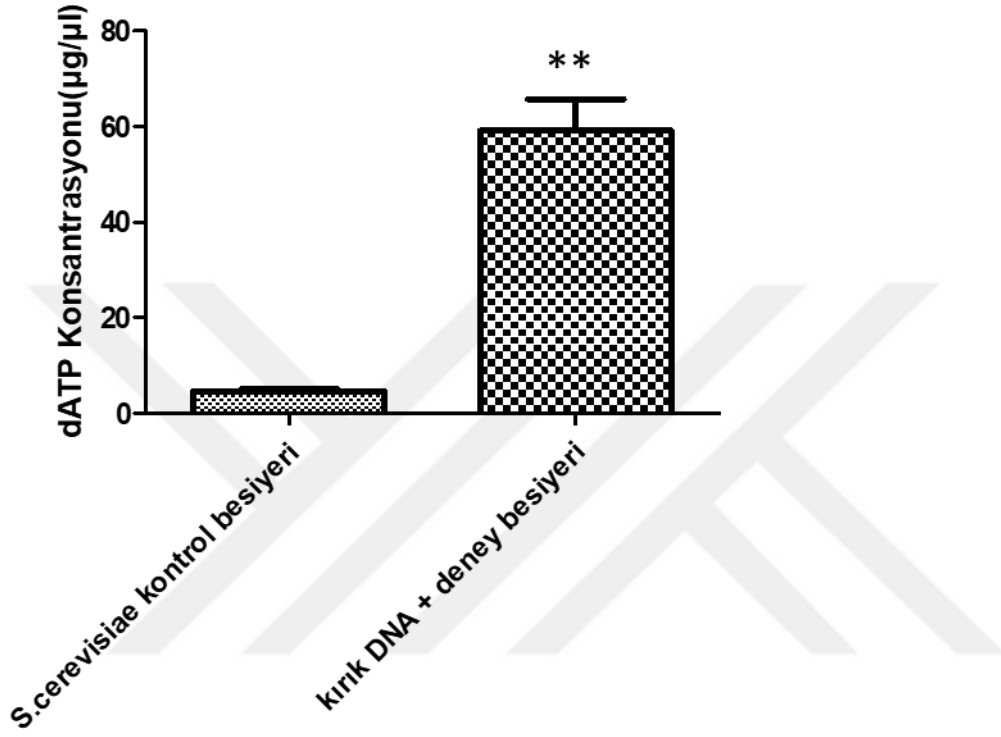
##### b) *S.Cerevisiae* Kırık DNA + Deney Medyum



4.95 5.00 5.05 5.10 5.15 5.20 5.25 5.30 5.35 5.40 5.45 5.50 5.55 5.60 5.65 5.70 5.75 5.80 min

**Şekil 4.11:** a) *S.cerevisiae* hücreleri negatif kontrol olarak LB besiyeri ve b) deney besiyeri (1.4 g/L dAMP, 30g/L glikoz, 31,2g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2g/L MgCl<sub>2</sub>.6.H<sub>2</sub>O, 1,2g/L KCl, 1g/L NH<sub>4</sub>Cl ve 6.7ml/L Asetaldehit) ve kırık DNA eklenerek 7 saat 30°C’de inkübe edildikten sonra elde edilen dATP’nin

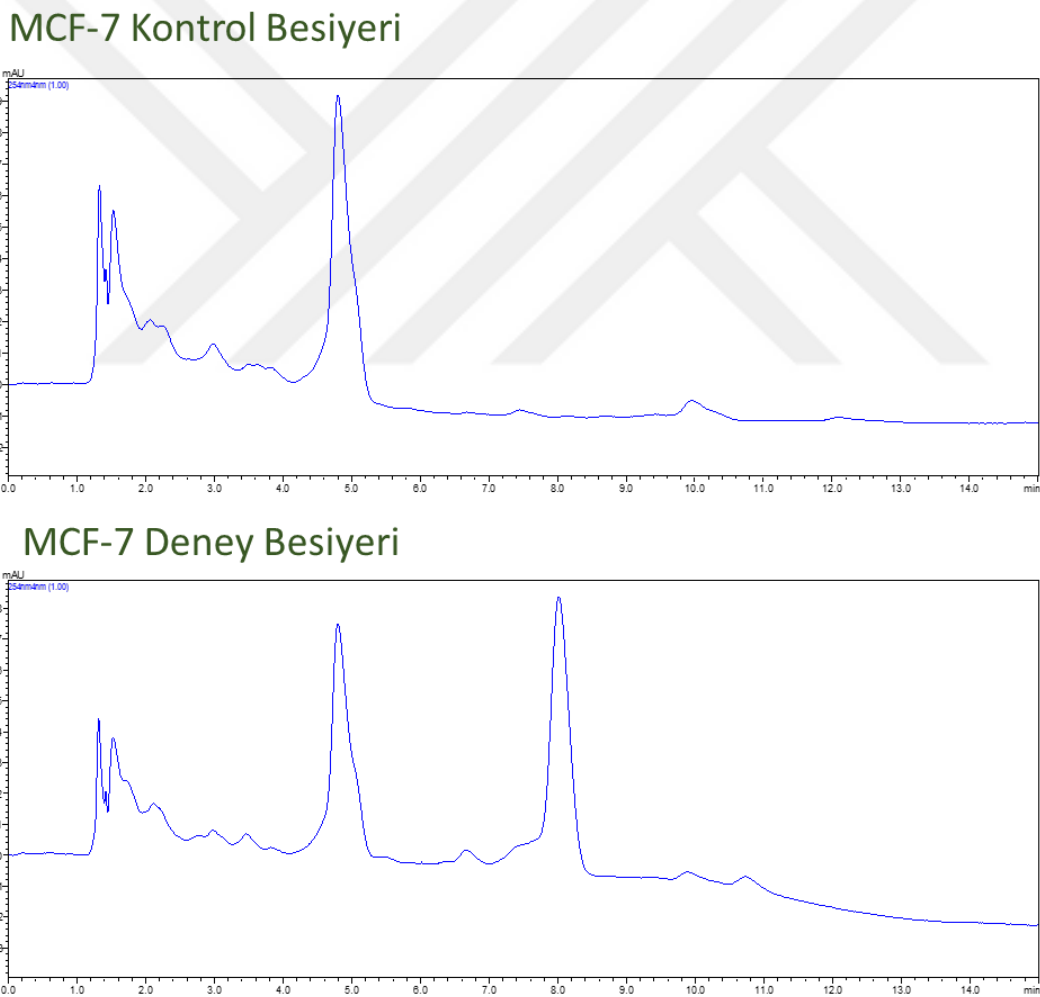
kromatografik olarak gösterimi. c) *S.cerevisiae* kontrol (siyah) ve *S.cerevisiae* Kırık DNA+Deney Besiyeri (pembe) sonuçlarından elde edilen dATP piklerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.12: *S.cerevisiae* hücrelerinde glikoliz yolağının tetiklenmesi ile dATP eldesinin gösterimi. *S.cerevisiae* kontrol besiyeri 4,684 ± 0,7744; Kırık DNA+ deney besiyeri 59,17 ± 11,48. Kırık DNA+ deney besiyeri, \*\* p≤0,01.

#### 4.10. MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA GLİKOLİZ YOLAĞI TETİKLEYEREK dATP ELDESİ

MCF-7 hücre hatları ilk olarak DMEM-F12 besiyerinde inkübatörde 1 gece 37°C’de çoğaltıldı. Daha sonra Glikoliz yolağını tetikleyerek dATP eldesi için deney besiyeri (1.4 g/L dAMP, 30g/L glikoz, 31,2g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2g/L MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 1,2g/L KCl, 1g/L NH<sub>4</sub>Cl ve 6.7ml/L Asetaldehit) ile 37°C’de 5 saat muamele edildi ve HPLC yöntemi ile kontrol edildi (Şekil 4.13). dATP eldesi gerçekleşmemiştir.

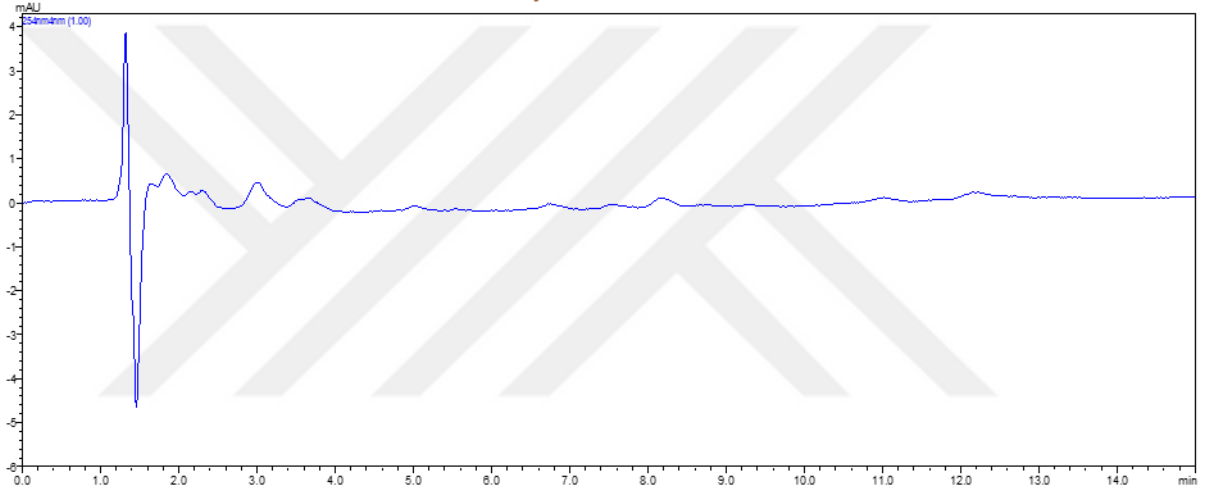


**Şekil 4.13:** MCF-7 meme kanseri hücre hattında kontrol besiyeri ve deney besiyeri (1.4 g/L dAMP, 30g/L glikoz, 31,2g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2g/L MgCl<sub>2</sub>.6.H<sub>2</sub>O, 1,2g/L KCl, 1g/L NH<sub>4</sub>Cl ve 6.7ml/L Asetaldehit) içerisinde 5 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra elde edilen sonuçların kromatografik olarak gösterimi.

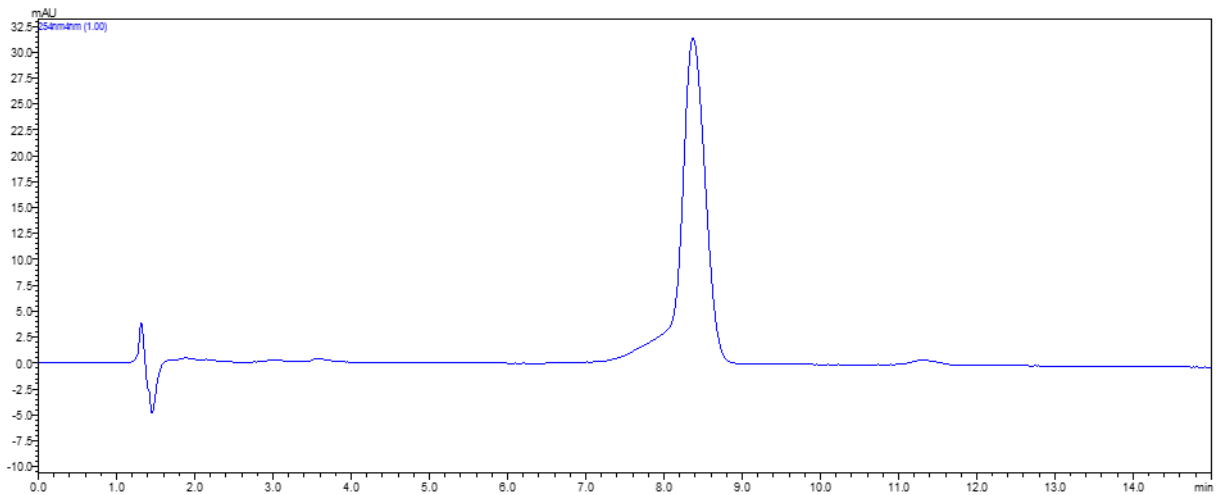
#### 4.11. MDA-MB-231 MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA GLİKOLİZ YOLAĞI TETİKLEYEREK dATP ELDESİ

MDA-MB-231 hücre hattında hücreleri ilk olarak DMEM-F12 besiyerinde inkübatörde 1 gece 37°C’de çoğaltıldı. Daha sonra glikoliz yolağını tetikleyerek dATP eldesi için deney besiyeri (1.4 g/L dAMP, 30g/L glikoz, 31,2g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2g/L MgCl<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O), 1,2g/L KCl, 1g/L NH<sub>4</sub>Cl ve 6.7ml/L Asetaldehit) ile 37°C’de 5 saat muamele edildi ve HPLC ile kromatografik olarak gösterildi (Şekil 4.14). dATP eldesi gerçekleşmemiştir.

##### MDA-MB-231 Kontrol Besiyeri



##### MDA-MB-231 Deney Besiyeri

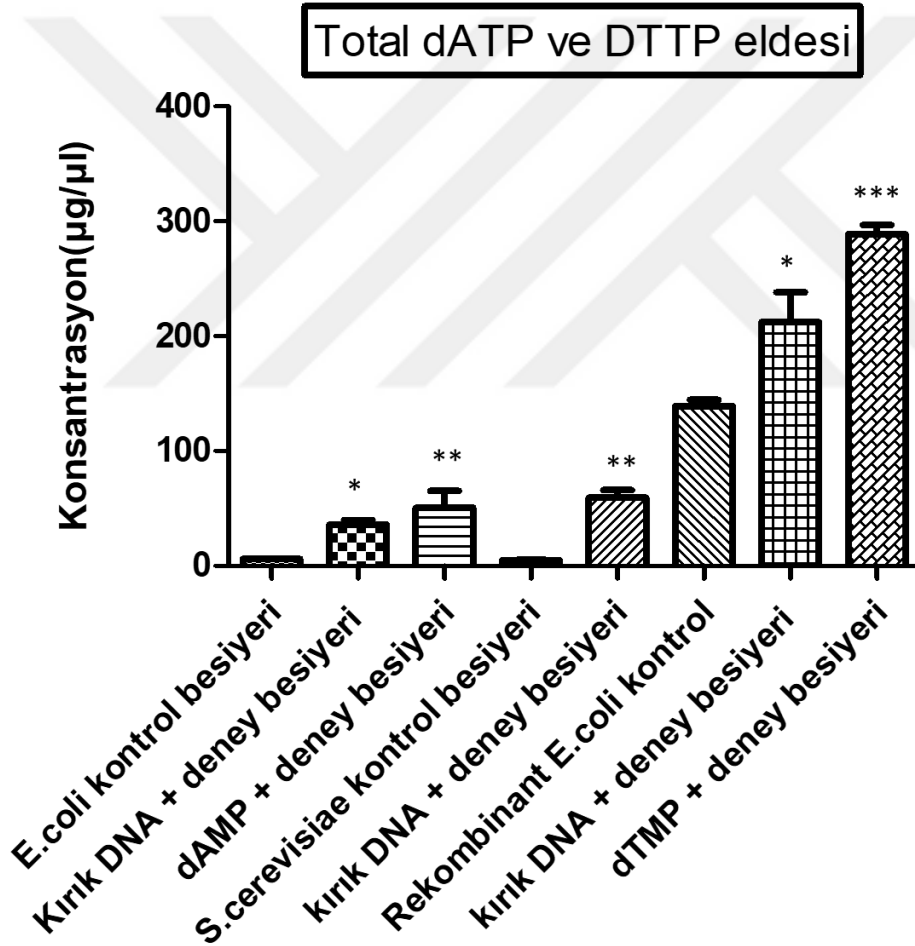


**Şekil 4.14:** MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında kontrol besiyeri ve deney besiyeri (1.4 g/L dAMP, 30g/L glikoz, 31,2g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2g/L MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 1,2g/L KCl, 1g/L NH<sub>4</sub>Cl ve 6.7ml/L Asetaldehit) ile 37°C’de 5 saat muamele edildi ve HPLC ile kromatografik olarak gösterildi.

6.7ml/L Asetaldehit) içerisinde 5 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra elde edilen MDA-MB-231’nin kromatografik olarak gösterimi. dATP eldesi gerçekleşmemiştir.

#### 4.12. DATP VE DTTP ELDELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

dTTP eldesi enzimatik süreçte oluşturulmuş fosfatlayıcı enzim timidilat kinaz gen bölgesi olan CDC8’in ekspresyon vektörü prSETA’ya aktarılması ve daha sonra rekombinant *E.coli* hücreleri oluşturularak gerçekleştirilirken; dATP eldesi *E.coli* ve *S.cerevisiae* hücrelerinde glikoliz yolağı ile ATP rejenarasyon sisteminin tetiklenmesi ile sağlanmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: dATP ve dTTP’nin total konsantrasyon grafiği.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

NTP'ler bakteriler de dahil olmak üzere tüm canlı organizmalar için temel moleküllerdir ve çok sayıda temel biyolojik sistemde görev almaktadırlar. NTP'ler, 1'-karbonunda bir glikozidik bağ ve 5'-karbonunda üç fosfat grubu ile bir nükleobaza (bir purin veya bir pirimidin) bağlı riboz veya deoksiriboz şekerin bir araya gelmesi sonucu oluşmaktadır. Nükleik asitlerin yapı taşı olan bu moleküller birçok hücrel işlemde görev almak için polimerazlar tarafından dahil edilirler (Hollenstein, 2012). Doğal ve modifiye NTP'ler, bakteriyel enzimatik mekanizmaları araştırmak, yeni genetik materyal geliştirmek ve yeni işlevlere sahip ilaçlar ve proteinler üretmek için en önemli araçlardır. dNTP'nin kimyasal sentezinde kullanılan fosforlama ajanları çok yüksek toksisiteye sahiptir ve işlemde kullanılan çözücülerin tekrar geri kazanılması üretim maliyetini ve çevre kirliliğini arttırmaktadır. Dolayısıyla ayrıştırma ve saflaştırma süreci pahalıdır ve çevre kirliliğine sebep olmaktadır (Yang ve diğ., 2014; Zhang ve diğ., 2015). Çalışmamıza enzimatik sentez süreci ile dNMP eldesinde fosfatlayıcı enzimler aracılığıyla dNMP'tan dNTP dönüşüm sağlanırken, glikolizasyon ve ATP rejenerasyon sisteminde yolağın tekrar sayısını arttıracak kimyasallar kullanılarak dATP eldesi sağlanmaktadır. Bu biyolojik süreçlerde kullanılan enzimler ve kimyasallar çevre kirliliği yaratmayıp oldukça düşük maliyetle dNMP eldesi sağlamaktadır.

Farklı fizyolojik özelliklere sahip çeşitli bakteri ve mantarlar, nükleik asitler üzerinde etkili olan birçok enzimi üretebilmektedirler. dNMP ve NMP eldesi için *Aspergillus oryzae* tarafından üretilen S1 nükleaz enzimi en etkili kaynaklardan biridir. S1 Nükleaz, tek zincirli nükleik asitlere özgü bir endonükleazdır ve ısıyla denatüre edilmiş DNA ve RNA'yı hidrolize edip dNMP ve NMP eldesini gerçekleştirebilmektedir (Ando, 1966; Vogt, 1973). Enzimatik kırılmalar ile elde edilmiş dNMP'ler, Nükleozid monofosfat kinaz ve ATP işbirliği ile dNDP'a, daha sonra dNDP'lar ise nükleozid difosfat kinaz'ın katalizlemesi ve yine ATP kullanımı ile dNTP'lara dönüştürülür (Bochkov ve diğ., 2006). Nükleik asitlerden dNMP eldesi için, dNTP'yi 5' ucundan kesen *Crotalus adamanteus*'dan elde edilmiş 5'-nükleotidaz enzimi ve 5'-TTP ve ATP'yi yıkıma uğratan yılan zehri fosfodiesteraz yalnızca 5' uçlarından kesmektedir fakat 3' uçlarını yıkıma uğratmamaktadırlar. dTMP'ların dTDP ve dTTP dönüşümü için de ATP, MgCl<sub>2</sub> ve 2-merkaptetanol kullanılmıştır. Yapılan çalışmada dTDP ve dTTP ürünlerinin en verimli olduğu sıcaklık 37°C ve zaman 15 dakika olarak belirlenmiştir (Coutsogeorgopoulos ve diğ., 1966). Daha sonra Ladner ve George (1985) dNMP eldesini ısı

ile denatüre edilmiş DNA'ya DNaz1 uygulaması ve nükleaz P1 eklenmesi ile sağlamışlardır. HPLC analizinde DNA'dan dAMP dönüşümünün %93 verimle gerçekleşmesi sağlanmıştır. Zhang ve arkadaşları(2015); dATP, dCTP, dGTP ve dTTP nükleotitlerinden bir hidroksil grubunu çıkarılmasını sağlamış ve NTP redüktaz enzimini kullanarak enzimatik NTP sentezi için yeni bir yaklaşım tanımlamıştır fakat hem Ladner ve George (1985) hem de Zhang (2015) enzimatik dNTP üretiminin kimyasal sentez ile üretim kadar verimli olmadığı sonucuna varmışlardır. Daha sonra Bao ve Dewey (2007) enzimatik sentez sürecinin verimini arttırmak için dNMP'den dNDP'ye fosforilasyonu katalizleyecek *S.cerevisiae*'den elde edilmiş deoksinükleozid monofosfat kinaz genlerini *E. coli*'ye klonlamışlardır. dNDP'den, dNTP'ye dönüşümü olan ikinci adımda ise fosfat kaynağı olarak dATP, fosforilasyon için pirüvat kinaz, PEP ve kofaktör olarak  $Mg^{+2}$  ve  $K^{+}$  kullanılmıştır. Bu çalışma, endüstriyel düzeyde ve fazla miktarda enzimatik dNTP üretiminin yapılabilirliğine dair ön çalışma olmuştur. Oh ve arkadaşları (2003), timidilat kinaz ve asetat kinaz eksprese eden iki tür rekombinant suş hazırlamış ve bu enzimlerin dNMP ile reaksiyona girmelerini sağlayarak dNDP ve dNTP eldesini sağlamışlardır. 5'-dTTP ilk olarak timidilat kinaz ile 5'-dTDP'ye fosforile edilip daha sonra ATP rejenerasyonunu sağlayan asetat kinaz ile 5'-dTDP 5'-dTTP'ye fosforile edilmiştir. Fosfat gruplarına sahip nükleotitler hücre zarından kolayca geçememektedirler. Asetat kinaz ve timidilat kinaz hücrelerden salınmadıkça, dTMP ve ATP ile reaksiyona girememekte ve 5'-dTTP'yi biyosentezi gerçekletememektedir. Dolayısıyla hücre membranının geçirgenliği arttırılmalıdır (Zhang ve diğ., 2015). Hücrenin geçirgenliğini arttırmak için tolüen (Choi ve diğ., 2004); şelatlama maddeleri, EDTA (Chen ,2007); deterjanlar, Triton X-100 (Galabova ve diğ, 1996), Tween (Galindo ve Salcedo, 1996), tuz stresi, sonikasyon ve dondurma-çözme gibi yöntemleri kullanılmaktadır (Chen ,2007). Bu bilgiler ışında Zhang ve ark. (2015) EDTA, tolüen ve Triton X-100 kullanımı ile dNTP üretiminin verimini araştırmışlardır. Sonuç olarak en fazla dNTP üretiminin EDTA kullanımı sonucu olduğu sonucuna varmışlardır. Daha sonra hücre geçirgenliğini arttırma sorununu aşmak için Ding ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada dNMP kinazların tümünün (dAMP kinaz, dGMP kinaz, dTMP kinaz, dCMP) buz nükleasyon proteininin (ICE) N terminal kısmı ile füzyon oluşturmasını sağlayarak *E. coli* hücre yüzeyinden dNMP'lar ile etkileşimini kolaylaştırmışlardır Son olarak 2020 yılında Fehlau ve arkadaşları NTP sentezinin daha önce belirtilen kullanım alanlarına ek olarak Covid-19 tedavisinde kullanılan sofosbuvir ve remdesivir gibi ilaçların içeriğini NTP ve dNTP analoglarının oluşturması nedeniyle de ayrıca önemli olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmalarında Pirüvat

kinaz (PK) ve PEP dönörlerinin ATP dönüşümünü sağlayarak NTP sentezi verimini nasıl etkilediklerini araştırmışlardır. Sonuç olarak PK ve PEP ATP dönüşüm sistemini sağlayan dönörlerinin kullanımı NTP eldesini %97'nin üzerinde gerçekleşmesini sağlamış ve üretim hızını arttırdığını göstermişlerdir. Tüm bu bilgileri bir araya getirirerek oluşturduğumuz yeni enzimatik dNTP eldesi yönteminde; S1 nükleaz enzimi ile dNMP eldesi sağlandı, ADK1 ve CDC8 genlerinin transformasyonu *E.coli* hücrelerine gerçekleştirildi, nükleotitlerin monofosfattan trifosfata dönüşümüne yardımcı olması için membran geçirgenliğini arttıran EDTA ile fosfatlayıcı enzimler olan PK ve PEP içeren zenginleştirilmiş besiyerinde inkübe edip son olarak HPLC yöntemi ile kromatografik olarak ölçüm alınması şeklinde tasarlandı. dTMP'tan dTTP'a dönüşümü yüksek başarı ile sağladık. Rekombinant *E.coli* kontrol  $139,2 \pm 9,116$ ; Kırık DNA+ deney besiyeri  $212,1 \pm 25,98$  ; dTMP+ deney besiyeri  $288,5 \pm 8,103$   $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  olacak şekilde miktar hesaplamaları yapıldı. Kırık DNA+ deney besiyeri \*,  $p \leq 0,05$  ve dTMP+ deney besiyeri \*\*\*,  $p \leq 0,001$  uygulamaları ile dTTP eldesi kontrole kıyasla anlamlı bulundu. Fakat enzimatik sentez süreci ile dATP eldesini başarılı bir şekilde gerçekleştirilemedi. ADK1 ifadesi gerçekleşmediği için kontrole kıyasla bir artış meydana gelmemiştir. Daha sonraki çalışmalarda enzimatik yol ile dAMP'den dATP'ye dönüşüm yöntemi için hazırlanan deney besiyerleri içerikleri, molariteleri ve sürelerinde optimizasyon çalışmaları ve enzim aktivitesi kontrolleri gibi çalışmalar eklenilebilir.

Tüm canlı organizmalarda karbon metabolizması için EMP yolağı kullanılmaktadır. Çeşitli karbon kaynakları, biyosentetik ve enerji metabolizma öncülleri olan üç karbonlu (C3; örn., pirüvat) ve iki karbonlu (C2; örn., asetil-CoA) metabolitlerin sentezlemesini sağlamaktadır. Asetil-CoA ek olarak yağ asitleri, alkoller, alkanlar, izoprenoidler ve poliketidler (Clomburg ve Gonzalez,2010; Felnagle ve diğ., 2012) gibi çeşitli endüstriyel açıdan önemli bileşiklerin metabolik öncüsüdür. Pirüvatın dekarboksilasyonu sonucu Asetil-CoA üretilir. Bu reaksiyonlar sonucunda yalnızca biyosentetik öncüller oluşmaz bununla birlikte büyüme ve gelişim için ihtiyaç duyulan ATP eldesi için de glikozu kısmen okside eder (Lin ve diğ., 2018). Bu çalışmada *E.coli* hücrelerinde glikoz yolağını tetiklemek için kullandığımız zenginleştirilmiş deney besiyerinde inkübe ettiğimiz hücrelerimizde kontrol hücrelerinde kıyasla dATP eldesi sağladık. *E.coli* kontrol besiyeri  $5,892 \pm 0,4942$ ; Kırık DNA + deney besiyeri  $35,83 \pm 7,027$ ; ; dAMP + deney besiyeri  $50,54 \pm 25,51$   $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  olacak şekilde miktar hesaplamaları yapıldı. Kırık DNA+ deney besiyeri, \*  $p \leq 0,01$ , endüstriyel dAMP+ deney besiyeri, \*\* ( $p \leq 0,05$ ) kontrole gören anlamlı bir şekilde dATP dönüşümün sağladığını gösterdi. *E.coli*'nin glikoz akışının

kontrol mekanizmalarından biri ATPaz üretiminin artmasıdır. Glikolizin enzimleri glikolitik akışı çok fazla kontrol edilemezken kontrolün çoğu ATP talebinde bağlıdır ve glikolitik akıştaki artış hücre ATP seviyelerinde dinamik bir bloklanmaya yol açmaktadır. Glikoz akışı ile ATPaz oranının artması ve ATP/ADP hidrolizinin artması hücre büyüme hızı da etkilenmektedir (Koebmann, 2002). dATP eldesini bakteriyel glikoz akışını bloklanmadan ve ATPaz, ATP denegesini koruyarak başarmış ve optimize etmiş olduk.

Tüm hücrelerde glikoliz yolunda bir glikoz molekülünü privata parçalayarak 2 ATP molekülü üreten ATP rejenerasyon sistemi mevcuttur. dATP sentez sisteminin de bir molekül dAMP'den dATP fosforillenme süreci içinde ihtiyaç duyulan 2 ATP molekülüdür. Dolayısıyla ATP rejenerasyonu dATP sentez verimi için çok önemli bir basamaktır. EMP glikolitik yoluyla ATP üretimi çok düşüktür fakat genetik mühendisliği teknolojisi veya kimyasal efektör maddeler kullanılarak metabolik akışın sürekliliği sağlanabilmektedir (Antoniewicz, 2021; Ni ve diğ., 2021). EMP yolağı glikokinaz, fosfofruktokinaz ve pirüvat kinaz gibi allosterik enzimlerin anahtar rol oynadığı bir yoldur.  $Mg^{+2}$ ,  $K^{+}$  ve amonyum ( $NH_4$ ) iyonlarının bu enzimlerin üzerinde düzenleyici etkileri bulunmaktadır. Amonyak konsantrasyonu fosfofruktokinazın aktivitesini artırarak glikoz yolağında enerjinin fruktoz-1,6-difosfat formunda depolanmasını sağlar. Dolayısıyla dAMP fosforilasyonu sırasında ürün sentezi için gerekli olan yeterli enerji ATP'den sağlanmaktadır (Yoshino ve Murakami, 1985). EMP yolağında  $NAD^{+}$  proton taşıyan bir koenzim olarak reaksiyona katılır ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz aracılığıyla kendini  $NADH$ 'ye indirger. Bu EMP yolağında gerçekleşen tek redoks reaksiyonudur. Buna karşın hücre içi redoks kofaktör oranı sabittir ve oksidasyon ile redüksiyon arasında bir denge vardır. Glikolizin yolağının devamlılığı için rejenerasyon yoluyla indirgenmiş  $NADH$ 'nin oksitlenmiş form olan  $NAD^{+}$  yeniden oksitlenmesi gerekmektedir. Oksijen veya oksidan faktör olmadığında  $NAD^{+}$  elektron alıcısı olarak asetaldehiti kullanarak etanol yoluyla rejenerasyon yapılmaktadır. Dolayısıyla kimyasal etkili maddelerin ( $Mg^{2+}$ ,  $K^{+}$ ,  $NH_4$  ve asetaldehit) düzenlenmesiyle ATP rejenerasyon hızı artırılabilir ve bu hız dATP sentez sisteminin hızına ulaştığında dATP'nin etkin biyosentezi gerçekleştirilebilmektedir. EMP yolunun metabolik akışını düzenlemek ve verimli bir ATP rejenerasyonu ve bağlantı sistemi kurmak için  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $KCl$ ,  $NH_4Cl$  ve asetaldehit efektörler olarak optimize edilmiştir. *S.cerevisiae* belirlenen kimyasallar ile muamele edildiğinde optimal şartlara göre 4 kat daha fazla dATP eldesi sağlanmıştır (Xiong ve diğ., 2023).  $Mg^{+2}$ ,  $K^{+}$  ve  $NH_4^{+}$  iyonlarını ve  $NAD^{+}$  oluşumu destekleyecek asetaldehit içeren zenginleştirilmiş deney besiyerinde inkübe ettiğimiz

*S.cerevisiae* hücrelerinde bu çalışmada elde ettiğimiz kırık DNA'lar ile anlamlı dATP eldesi gerçekleştirmiş olduk. *S.cerevisiae* kontrol besiyeri  $4,684 \pm 0,7744$ ; Kırık DNA+ deney besiyeri  $59,17 \pm 11,48$  olacak şekilde miktar hesaplamaları yapıldı. Kırık DNA+ deney besiyeri, \*\*  $p \leq 0,01$  kontrole göre anlamlı dATP üretimi sağlandı. Ayrıca bakteriyel kontrol mekanizmalarının aksine mayada ATPaz ve ATP/ADP talepleri gibi bloklayıcı etmenlerin rol almadığı gösterilmiştir (Schaaff ve diğ., 1989; Koebmann, 2002).

Kanser hücrelerinin oksijen varlığında glikozu anaerobik yolak olan laktik asit fermantasyonuna yönlendirerek glikozu laktata dönüştürmesine Warburg etkisi (aerobik glikoliz) denilmektedir (Vander Heiden ve diğ., 2009). Kanser hücreleri glikoz alımını artırır ve tümör gelişiminde kan damarları hipoksi durumundadır. Bu nedenle, anaerobik glikoliz esas olarak enerji sağlamak için seçilir. Tümör hücrelerinde hücre çoğalmasına destek olan dNTP'lerin, yüksek aktivitede hücreye zarar verebilecek serbest oksijen radikalleri üretiminin önüne geçmek gibi faydaları vardır (Ganapathy-Kanniappan ve Geschwind, 2013). Bizlerde çalışmamızda kanser hücrelerinin daha fazla çoğalmak için kullandığı bu yoldan oluşturacakları dNTP'lerden elde etmeyi amaçladık. Metastatik meme karsinomu orijinli epitelial insan meme kanser hücre hattı olan MDA-MB-231 ve zayıf agresif ve invaziv olmayan insan meme kanseri hücre hattı MCF-7'de glikoliz yolağını tetikleyerek dATP eldesi hedefledik fakat iki kanser hücre hattında da sonuç alamadık. Kullanılan medyum içerisindeki glikoz miktarı çalışmamızda kullanılanın çok fazla katı olması dolayısıyla glikoz yolağının tetiklenmesi için daha farklı kimyasal tetikleme yöntemlerinin araştırılması gerektiğini düşünmektedir. Çalışmamız bu konuda yapılan ilk deneme olup daha fazla optimizasyon çalışmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada, enzimatik yolak ile dTTP eldesi, *E.coli* ve *S.cerevisiae* organizmalarının glikoliz yolaklarını tetikleyerek dATP eldesi sağlandı. Ayrıca elde edilen tüm verilerde kırık DNA eldesinin endüstriyel dNMP'lere yakın seviyelerde ürün eldesi sağlanması yeni oluşturulan kırık DNA eldesi yönteminin de başarılı bir şekilde çalıştığını göstermektedir. Ek olarak, kanser hücre hatlarında yapılan araştırmaların dNTP eldesi yöntemleri geliştirmeye çalışmaları için aydınlatıcı olacağı kanısındayız.

## KAYNAKLAR

- Aird, K. M., Zhang, G., Li, H., Tu, Z., Bitler, B. G., Garipov, A., ... & Zhang, R., 2013, Suppression of nucleotide metabolism underlies the establishment and maintenance of oncogene-induced senescence, *Cell reports*, 3(4), 1252-1265.
- Allsop, J., & Watts, R. W., 1986, Purine de novo synthesis and salvage during testicular development in the rat, *Purine and Pyrimidine Metabolism in Man V: Part B: Basic Science Aspects*, 325-328.
- Ando, T., 1969, A nuclease specific for heat-denatured DNA isolated from a product of *Aspergillus oryzae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis* 114.1: 158-168.
- Antoniewicz, M.R., 2021, A guide to metabolic flux analysis in metabolic engineering: Methods, tools and applications, *Metab. Eng.*, 63, 2–12.
- Arber, Werner, and Stuart Linn, 1969, DNA modification and restriction, *Annual review of biochemistry*, 38.1 467-500.
- Bajzikova, M., Kovarova, J., Coelho, A. R., Boukalova, S., Oh, S., Rohlenova, K., ... & Neuzil, J., 2019, Reactivation of dihydroorotate dehydrogenase-driven pyrimidine biosynthesis restores tumor growth of respiration-deficient cancer cells, *Cell metabolism*, 29(2), 399-416.
- Bakker, B. M., Overkamp, K. M., Van Maris, A. J., Kötter, P., Luttkik, M. A., Van Dijken, J. P., & Pronk, J. T., 2001, Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS microbiology reviews*, 25(1), 15-37.
- Balasubramaniyam, T., Oh, K. I., Jin, H. S., Ahn, H. B., Kim, B. S., & Lee, J. H., 2021, Non-canonical helical structure of nucleic acids containing base-modified nucleotides, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9552.
- Bao, Jie, and Dewey DY Ryu., 2006, Cloning of deoxynucleoside monophosphate kinase genes and biosynthesis of deoxynucleoside diphosphates, *Biotechnology and bioengineering* 93.3 572-580.
- Bao, Jie, and Dewey DY Ryu., 2007, Total biosynthesis of deoxynucleoside triphosphates using deoxynucleoside monophosphate kinases for PCR application, *Biotechnology and bioengineering* 98.1 1-11.
- Bazan-Peregrino, M., Sainson, R. C. A., Carlisle, R. C., Thoma, C., Waters, R. A., Arvanitis, C., ... & Seymour, L. W., 2013, Combining virotherapy and angiotherapy for the treatment of breast cancer, *Cancer gene therapy*, 20(8), 461-468.
- Berk, A. 2008, *Molecular cell biology*, WH freeman.

- Bird, Anna R., Jennifer C. Molloy, and Elizabeth AH Hall, 2023, Biocatalytic synthesis of 2'-deoxynucleotide 5'-triphosphates from bacterial genomic DNA: Proof of principle, *Biotechnology and Bioengineering* 120.6 1531-1544.
- Bochkov, D. V., V. V. Khomov, and T. G. Tolstikova., 2006, Hydrolytic approach for production of deoxyribonucleoside-and ribonucleoside-5'-monophosphates and enzymatic synthesis of their polyphosphates, *Biochemistry (moscow)* 71.1 79-83.
- Cailleau, R., Olive, M., & Cruciger, Q. V., 1978, Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization, *In vitro*, 14(11), 911-915.
- Chargaff, Erwin., 2012, The nucleic acids. *Elsevier*,
- Chavez, K. J., Garimella, S. V., & Lipkowitz, S., 2011, Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer, *Breast disease*, 32(1-2), 35-48.
- Chen RR., 2007, Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 730-738
- Chen, J., Yu, Y., Li, H., Hu, Q., Chen, X., He, Y., ... & Sun, R., 2019, Long non-coding RNA PVT1 promotes tumor progression by regulating the miR-143/HK2 axis in gallbladder cancer, *Molecular cancer*, 18, 1-16.
- Choi KO, Song SH, Yoo YJ., 2004, Permeabilization of *Ochrobactrum anthropi* SY509 cells with organic solvents for whole cell biocatalyst, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 9: 147-150.
- Chon, J., Stover, P. J., & Field, M. S., 2017, Targeting nuclear thymidylate biosynthesis, *Molecular aspects of medicine*, 53, 48-56.
- Clomburg JM, Gonzalez R., 2010, Biofuel production in *Escherichia coli*: The role of metabolic engineering and synthetic biology, *Appl Microbiol Biotechnol* 86:419–434.2.
- Cohen, Stanley N., Annie CY Chang, and Leslie Hsu., 1972, Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69.8 2110-2114.
- Comşa, Ş., Cimpean, A. M., & Raica, M., 2015, The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research, *Anticancer research*, 35(6), 3147-3154.
- Coutsogeorgopoulos, C., Hacker, B., & Mantsavinou, R., 1966, Enzymic conversion of thymidine 3'-monophosphate to thymidine 3'-diphosphate and 3'-triphosphate, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 119(2), 439-442.
- Dang, C. V., & Semenza, G. L., 1999, Oncogenic alterations of metabolism. *Trends in biochemical sciences*, 24(2), 68-72.

- Das, Surajit, and Hirak Ranjan Dash., 2015, Cloning and transformation, *Microbial Biotechnology-A Laboratory Manual for Bacterial Systems*, Springer, New Delhi., 35-72.
- Ding, Y., Ou, L., & Ding, Q., 2019, Enzymatic synthesis of nucleoside triphosphates and deoxynucleoside triphosphates by surface-displayed kinases, *Applied biochemistry and biotechnology*, 1-18.
- Ershler, W. B., 2006, Capecitabine monotherapy: safe and effective treatment for metastatic breast cancer, *The Oncologist*, 11(4), 325-335.
- Espinasse, Adeline, et al., 2020, Modified nucleoside triphosphates in bacterial research for in vitro and live-cell applications." *RSC chemical biology* 1.5 333-351.
- Fausser, B. C. J. M., Mannaerts, B. M. J. L., Devroey, P., Leader, A., Boime, I., & Baird, D. T., 2009, Advances in recombinant DNA technology: corifollitropin alfa, a hybrid molecule with sustained follicle-stimulating activity and reduced injection frequency, *Human Reproduction Update*, 15(3), 309-321.
- Fehlau, M., Kaspar, F., Hellendahl, K. F., Schollmeyer, J., Neubauer, P., & Wagner, A., 2020, Modular Enzymatic Cascade Synthesis of Nucleotides Using a (d) ATP Regeneration System, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 854.
- Felnagle EA, Chaubey A, Noey EL, Houk KN, Liao JC, 2012, Engineering synthetic recursive pathways to generate non-natural small molecules, *Nat Chem Biol* 8:518–526.
- Feng, J., Li, J., Wu, L., Yu, Q., Ji, J., Wu, J., ... & Guo, C., 2020, Emerging roles and the regulation of aerobic glycolysis in hepatocellular carcinoma, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39, 1-19.
- Firdos, Ayesha, and Wang Meng., 2022, The evolution of information technology and commercial biotechnology in the pharma industries, *Journal of Commercial Biotechnology* 27.3 190-201.
- Fraenkel, D. G., & Vinopal, R. T., 1973, Carbohydrate metabolism in bacteria, *Annual Reviews in Microbiology*, 27(1), 69-100.
- Galabova D, Tuleva B, Spasova D., 1996, Permeabilization of *Yarrowia lipolytica* cells by Triton X-100, *Enzyme Microb. Technol.* 18: 18-22
- Galindo E, Salcedo G., 1996, Detergents improve xanthan yield and polymer quality in cultures of *Xanthomonas campestris*, *Enzyme Microb. Technol.* 19: 145-149
- Ganapathy-Kanniappan, S., & Geschwind, J. F. H., 2013, Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects, *Molecular cancer*, 12, 1-11.
- Gellert, Martin., 1967, Formation of covalent circles of lambda DNA by *E. coli* extracts, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 57.1 148.

- Gill, K., Negi, S., Rana, N., & Kumar, P., 2023, RDT and genetic engineering: Basic of RDT method, PCR, and application, In *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship* (pp. 207-216), Academic Press.
- Ginn, S. L., Alexander, I. E., Edelstein, M. L., Abedi, M. R., & Wixon, J., 2013, Gene therapy clinical trials worldwide to 2012—an update, *The journal of gene medicine*, 15(2), 65-77.
- Giuliani, A. L., Sarti, A. C., & Di Virgilio, F., 2019, Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules, *Immunology letters*, 205, 16-24.
- Glick, B. R., & Patten, C. L., 2022, Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA, *John Wiley & Sons*.
- Goswami, M. T., Chen, G., Chakravarthi, B. V., Pathi, S. S., Anand, S. K., Carskadon, S. L., ... & Varambally, S., 2015, Role and regulation of coordinately expressed de novo purine biosynthetic enzymes PPAT and PAICS in lung cancer, *Oncotarget*, 6(27), 23445.
- Gupta, R., & Gupta, N., 2021, Fundamentals of bacterial physiology and metabolism (pp. 267-287), Singapore: *Springer*.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A., 2011, Hallmarks of cancer: the next generation, *cell*, 144(5), 646-674.
- Harrell, J. C., Pfefferle, A. D., Zalles, N., Prat, A., Fan, C., Khramtsov, A., ... & Perou, C. M., 2014, Endothelial-like properties of claudin-low breast cancer cells promote tumor vascular permeability and metastasis, *Clinical & experimental metastasis*, 31, 33-45.
- Hassinen, Ilmo E., 2014, Mitochondria and energy metabolism: networks, mechanisms, and control, *Natural Biomarkers for Cellular Metabolism*, 32-69.
- Hollenstein, M., 2012, Nucleoside triphosphates—building blocks for the modification of nucleic acids, *Molecules*, 17(11), 13569-13591.
- Holliday, D. L., & Speirs, V., 2011, Choosing the right cell line for breast cancer research, *Breast cancer research*, 13, 1-7.
- Iacometti, C., Marx, K., Hönick, M., Biletskaia, V., Schulz-Mirbach, H., Dronsella, B., ... & Lindner, S. N., 2022, Activating silent glycolysis bypasses in Escherichia coli, *BioDesign Research*, 2022, 9859643.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L., 2004, Pathogenic escherichia coli, *Nature reviews microbiology*, 2(2), 123-140.
- Kenny, P. A., Lee, G. Y., Myers, C. A., Neve, R. M., Semeiks, J. R., Spellman, P. T., ... & Bissell, M. J., 2007, The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Molecular oncology*, 1(1), 84-96.
- Koebmann, Brian J., et al., 2002, The glycolytic flux in Escherichia coli is controlled by the demand for ATP, *Journal of bacteriology* 184.14 3909-3916.

- Kumari, S., & Tripathi, P., 2021, Nucleotide metabolism pathway, *Current Science*, 120(9), 1458-1463.
- Ladner, Wolfgang E., and George M. Whitesides., 1985, Enzymic synthesis of deoxyATP using DNA as starting material, *The Journal of Organic Chemistry* 50.7 1076-1079.
- Lane, A. N., & Fan, T. W., 2015, Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis, *Nucleic acids research*, 43(4), 2466-2485.
- Li, G., Li, D., Wang, T., & He, S., 2021, Pyrimidine biosynthetic enzyme CAD: its function, regulation, and diagnostic potential, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10253.
- Li, L. X., Zhang, Y. L., Zhou, L., Ke, M. L., Chen, J. M., Fu, X., ... & Huang, W., 2013, Antitumor efficacy of a recombinant adenovirus encoding endostatin combined with an E1B55KD-deficient adenovirus in gastric cancer cell, *Journal of translational medicine*, 11, 1-13.
- Lin, Paul P., et al., 2018, Construction and evolution of an Escherichia coli strain relying on nonoxidative glycolysis for sugar catabolism, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115.14 3538-3546.
- Liu, H., Sun, Y., Ramos, K. R. M., Nisola, G. M., Valdehuesa, K. N. G., Lee, W. K., ... & Chung, W. J., 2013, Combination of Entner-Doudoroff pathway with MEP increases isoprene production in engineered Escherichia coli, *PLoS One*, 8(12), e83290.
- Loan, Thomas D., Christopher J. Easton, and Apostolos Alissandratos, 2019, DNA amplification with in situ nucleoside to dNTP synthesis, using a single recombinant cell lysate of E. coli, *Scientific reports* 9.1 1-8.
- Lomedico, P. T., 1982, Use of recombinant DNA technology to program eukaryotic cells to synthesize rat proinsulin: a rapid expression assay for cloned genes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(19), 5798-5802.
- Löffler, M., Fairbanks, L. D., Zameitat, E., Marinaki, A. M., & Simmonds, H. A., 2005, Pyrimidine pathways in health and disease, *Trends in molecular medicine*, 11(9), 430-437.
- Mathews, Christopher K., 2014, Deoxyribonucleotides as genetic and metabolic regulators, *The FASEB Journal* 28.9 3832.
- Méndez, C., & Salas, J. A., 2003, On the generation of novel anticancer drugs by recombinant DNA technology: the use of combinatorial biosynthesis to produce novel drugs, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 6(6), 513-526.
- Merten, O. W., & Gaillet, B., 2016, Viral vectors for gene therapy and gene modification approaches, *Biochemical Engineering Journal*, 108, 98-115.
- Merten, O. W., Schweizer, M., Chahal, P., & Kamen, A. A., 2014, Manufacturing of viral vectors for gene therapy: part I. Upstream processing, *Pharm Bioprocess*, 2(2), 183-203.

- Metzger IV, L. E., & Raetz, C. R., 2009, Purification and characterization of the lipid A disaccharide synthase (LpxB) from *Escherichia coli*, a peripheral membrane protein, *Biochemistry*, 48(48), 11559-11571.
- Mikhailopulo, I. A., & Miroshnikov, A. I., 2010, New trends in nucleoside biotechnology, *Acta Naturae (англоязычная версия)*, 2(2 (5)), 36-58.
- Ni, C., Dinh, C. V., & Prather, K. L., 2021, Dynamic control of metabolism, *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 12(1), 519-541.
- Oh J, Lee S, Kim B, Sohng JK, Liou K, Lee HC., 2003, One-pot enzymatic production of dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose from dTMP and glucose-1-phosphate, *Biotechnol. Bioeng.* 84: 452-458
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas, E., 2020, *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications, *AIMS microbiology*, 6(1), 1.
- Pei, Y., Qian, Y., Wang, H., & Tan, L., 2022, Epigenetic regulation of ferroptosis-associated genes and its implication in cancer therapy, *Frontiers in oncology*, 12, 771870.
- Pelicano, H., Martin, D. S., Xu, R. A., & Huang, P., 2006, Glycolysis inhibition for anticancer treatment, *Oncogene*, 25(34), 4633-4646.
- Pfeiffer, T., & Morley, A., 2014, An evolutionary perspective on the Crabtree effect, *Frontiers in molecular biosciences*, 1, 17.
- Ridder, D. A., Schindeldecker, M., Weinmann, A., Berndt, K., Urbansky, L., Witzel, H. R., ... & Straub, B. K., 2021, Key enzymes in pyrimidine synthesis, CAD and CPS1, predict prognosis in hepatocellular carcinoma, *Cancers*, 13(4), 744.
- Rivero-Müller, A., Lajić, S., & Huhtaniemi, I., 2007, Assisted large fragment insertion by Red/ET-recombination (ALFIRE)—an alternative and enhanced method for large fragment recombineering, *Nucleic acids research*, 35(10), e78.
- Robey, R. A., & Hay, N., 2006, Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt, *Oncogene*, 25(34), 4683-4696.
- Robinson, Alyncia D., Marie-Lisa Eich, and Sooryanarayana Varambally., 2020, Dysregulation of de novo nucleotide biosynthetic pathway enzymes in cancer and targeting opportunities, *Cancer letters* 470 134-140.
- Romano AH, Conway T., 1996, Evolution of carbohydrate metabolic pathways. *Res Microbiol.* 147(6):448–55.
- Saha, A., Connelly, S., Jiang, J., Zhuang, S., Amador, D. T., Phan, T., ... & Boss, G. R., 2014, Akt phosphorylation and regulation of transketolase is a nodal point for amino acid control of purine synthesis, *Molecular cell*, 55(2), 264-276.
- Schaaff, Ine, Jürgen Heinisch, and Friedrich K. Zimmermann., 1989, Overproduction of glycolytic enzymes in yeast, *Yeast* 5.4 285-290.

- Simmer, J. P., Kelly, R. E., Rinker Jr, A. G., Scully, J. L., & Evans, D. R., 1990, Mammalian carbamyl phosphate synthetase (CPS). DNA sequence and evolution of the CPS domain of the Syrian hamster multifunctional protein CAD, *Journal of Biological Chemistry*, 265(18), 10395-10402.
- Steinberg, F. M., & Raso, J., 1998, Biotech pharmaceuticals and biotherapy: an overview, *J Pharm Pharm Sci*, 1(2), 48-59.
- Sunil Kumar and Ashwani Kumar., 2015, Role of genetic engineering in agriculture, 1-6.
- Ullah, M. W., Khattak, W. A., Ul-Islam, M., Khan, S., & Park, J. K., 2015, Encapsulated yeast cell-free system: a strategy for cost-effective and sustainable production of bio-ethanol in consecutive batches, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20, 561-575.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B., 2009, Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation, *science*, 324(5930), 1029-1033.
- Venter, M., 2007, Synthetic promoters: genetic control through cis engineering, *Trends in plant science*, 12(3), 118-124.
- Villa, E., Ali, E. S., Sahu, U., & Ben-Sahra, I., 2019, Cancer cells tune the signaling pathways to empower de novo synthesis of nucleotides, *Cancers*, 11(5), 688.
- Vogt, Volker M., 1973, Purification and further properties of single-strand-specific nuclease from *Aspergillus oryzae*, *European Journal of Biochemistry* 33.1192-200.
- Wieman, H. L., Wofford, J. A., & Rathmell, J. C., 2007, Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking, *Molecular biology of the cell*, 18(4), 1437-1446.
- Xiong, Jian, et al., 2023, Improved Synthesis of Deoxyadenosine Triphosphate by *Saccharomyces cerevisiae* Using an Efficient ATP Regeneration System: Optimization of Response Surface Analysis, *Molecules* 28.10 4029.
- Yang, N., Chen, X., Lin, F., Ding, Y., Zhao, J., & Chen, S., 2014, Toxicity formation and distribution in activated sludge during treatment of N, N-dimethylformamide (DMF) wastewater, *Journal of hazardous materials*, 264, 278-285.
- Yoon, S. H., Jeong, H., Kwon, S. K., & Kim, J. F., 2009, Genomics, biological features, and biotechnological applications of *Escherichia coli* B: "Is B for better?!", *Systems biology and biotechnology of Escherichia coli*, 1-17.
- Yoshino, M., & Murakami, K., 1985, AMP deaminase reaction as a control system of glycolysis in yeast. Role of ammonium ion in the interaction of phosphofructokinase and pyruvate kinase activity with the adenylate energy charge, *Journal of Biological Chemistry*, 260(8), 4729-4732.
- Zhang, J., Qian, Y., Ding, Q., & Ou, L., 2015, Enzymatic Manufacture of Deoxythymidine-5'-Triphosphate with Permeable Intact Cells of *E. coli* Coexpressing Thymidylate Kinase and Acetate Kinase, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 25(12), 2034-2042.

Zhang, X., Li, F., Zhou, Y., Mao, F., Lin, Y., Shen, S., ... & Sun, Q., 2021, Long noncoding RNA AFAP1-AS1 promotes tumor progression and invasion by regulating the miR-2110/Sp1 axis in triple-negative breast cancer, *Cell Death & Disease*, 12(7), 627.

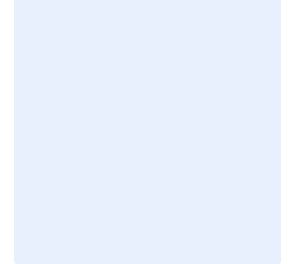


**EKLER**



## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Sevgi Binay
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Ege Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik ağırlıklı Biyoloji
Mezuniyet Yılı	04.07.2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Moleküler Biyoloji

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler	
Toxic effects of subchronic oral acetamiprid exposure in rats	
Transcription factor Runx2 changes the expression of some extracellular proteins in metastatic breast cancer cells	