

**TETRAHYMENA THERMOPHILA’DA REKOMBİNANT İLAÇ ÜRETİM
VERİMLİLİĞİNİ DÜŞÜREBİLECEK BİR PROTEAZ GENİNİN GEN SİLME
YÖNTEMİYLE GENOMDAN SİLİNMESİ VE KARAKTERİZASYONU**

Şeyma DURAN

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Muhittin ARSLANYOLU

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ocak 2022

ÖZET

TETRAHYMENA THERMOPHILA'DA REKOMBİNANT İLAÇ ÜRETİM VERİMLİLİĞİNİ DÜŞÜREBİLECEK BİR PROTEAZ GENİNİN GEN SİLME YÖNTEMİYLE GENOMDAN SİLİNMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Şeyma DURAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ocak 2022

Danışman: Prof. Dr. Muhittin ARSLANYOLU

Bu tez çalışması ile *T. thermophila*'nın doğal olarak salgıladığı proteazların dış ortama salgılanan protein yapılı rekombinant biyofarmosötikleri parçaladığı ve üretim verimliliğini düşürdüğü hipotezi test edilmiştir. Literatür araştırması ve biyoinformatik yaklaşımlarla belirlenen sekretom proteaz genlerinden yüksek ekspresyona sahip *CTH34* geni somatik homolog rekombinasyon, *CYP6*, *CTH40*, *CTH90* ve *CTH115* genleri ise co-Delesyon yöntemleriyle makroçekirdek genomundan silinmiş, doğal hücre ırkı ile mutant hücre sekretomlarının proteolitik aktivitesi kazein ve rituksimab substratlarına karşı *in vitro* olarak ölçülmüş ve SDS-PAGE ile substrat degradasyonu tanımlanmıştır. *CTH34*'ün KO edildiği ırkta sekretomal proteolitik aktivite %34,3 oranında düşerken büyüme eğrisinin logaritmik ve durağan faz hücre sayısında ~%50 oranında azalma bulunmuştur. *CYP6*-KO ırkında ise rituksimab substratının parçalanmasında belirgin bir düşüş SDS-PAGE'de gözlemlenirken büyüme eğrisinin durağan faz hücre sayısında ~%25 civarında azalma görülmüştür. *T. thermophila*'nın verimli bir şekilde rekombinant protein ilaç üretimine *CTH34* ve *CYP6* genleri gibi proteaz genlerinin genomdan silinmesiyle uygun hale getirilebileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Proteaz KO, Sistein Proteazlar, Rekombinant Protein Üretimi

ABSTRACT

ELIMINATION AND CHARACTERIZATION OF A TETRAHYMENA THERMOPHILA PROTEASE GENE THAT CAN REDUCE RECOMBINANT DRUG PRODUCTION EFFICIENCY BY GENE KNOCK-OUT METHOD

Şeyma DURAN

Department of Biology

Programme in Molecular Biology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, January 2022

Supervisor: Prof. Dr. Muhittin ARSLANYOLU

In this thesis, the hypothesis that naturally secreted proteases of *T. thermophila* degrade protein-structured recombinant biopharmaceuticals secreted externally, and that reduce production efficiency has been tested. Five of highly expressed secretome protease genes were determined via literature research and bioinformatics approaches, and *CTH34* gene was deleted by somatic homologous recombination while *CYP6*, *CTH40*, *CTH90* and *CTH115* were deleted by co-deletion, followed by mutant strain confirmation using PCR after antibiotic selection. The proteolytic activity of wild type and mutant culture secretomes was measured in vitro assays against casein and rituximab substrates, and substrate degradation was confirmed by SDS-PAGE. While secretomal proteolytic activity decreased by 34.3% in the CTH34-KO strain, cell number of the flask population in the logarithmic and stationary phase of the growth curve also decreased by ~50%. Besides, it is observed that degradation of the rituximab substrate was significantly reduced by CYP6-KO strain secretome compared to wild type whereas the cell number in the stationary phase of the growth curve also diminished by ~25%. According to forementioned findings, it was concluded that *T. thermophila* can be efficiently tailored for recombinant protein drug production by deletion of protease genes such as *CTH34* and *CYP6* from the genome.

Keywords: Protease KO, Cysteine Proteases, Recombinant Protein Production

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini ve ilgisini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesini her daim paylaşmaya istekli, akademik duruşumun ve mesleki anlayışımın gelişmesini sağlayan değerli danışmanım Prof. Dr. Muhittin ARSLANYOLU'na,

BİDEB “2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı” ile yüksek lisans eğitim sürecimde maddi olarak çalışmamı destekleyen TÜBİTAK kurumuna,

Hem laboratuvara hem de çalıştığımız organizmaya adaptasyonumu oldukça kolaylaştıran, hiçbir zaman sorularımı cevapsız bırakmayıp değerli tecrübelerinden istifade etmemi sağlayan Dr. Ayça Fulya ÜSTÜNTANIR DEDE, Dr. Erhan ASLAN ve Nurçin KÜÇÜKOĞLU'na,

Beraber deneye yanıla öğrenmekten inanılmaz keyif aldığım laboratuvar arkadaşım Yeliz DÜNDAR'a,

Beni iyi bir şekilde yetiştirmek için ellerinden geleni yapan ebeveynlerim ile bana duydukları güveni her zaman hissettiren kardeşlerim Alime Nur TOKDEMİR ve Feyza DURAN'a,

Enerji ve neşe kaynağım kedim Yumi ve Burak DEMİR'e tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Şeyma DURAN

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

Şeyma DURAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
DANIŞMAN ONAYI	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Biyoteknolojik İlaçlar ve Rekombinant Üretim.....	1
1.2. Proteazlar ve Rekombinant Üretime Etkileri	3
1.3. Alternatif bir rekombinant protein üretim konakçısı: <i>Tetrahymena thermophila</i>	4
1.4. <i>T. thermophila</i> 'da Rekombinant Protein Üretimi	12
1.5. Hipotez, Amaç ve Özgün Değer	15
2. MATERYAL ve YÖNTEM.....	16
2.1. Flask Ortamında Büyütülen Doğal Suş SB210'un Sekretomal Proteolitik Aktivitesinin Belirlenmesi.....	16

2.2.	Silinmesi Hedeflenen <i>T. thermophila</i> Sekretom Proteazlarının Belirlenmesi ve Biyoinformatik Yaklaşımlarla Tanımlanması	17
2.3.	Homolog Rekombinasyon Yoluyla Gen Silme	19
2.3.1.	Moleküler klonlama ve KO vektörünün hazırlanması	19
2.3.2.	<i>Tetrahymena</i> hücrelerinin kültürizasyonu, transformasyonu ve seçilimi	20
2.3.3.	Tek hücre klonlarının KO karakterizasyonu	21
2.4.	Co-Delesyon Yoluyla Gen Silme	23
2.4.1.	Moleküler klonlama ile KO vektörünün hazırlanması	23
2.4.2.	<i>T. thermophila</i> SB210 suşunun star A*III suşu ile çaprazlanması	25
2.4.3.	<i>Tetrahymena</i> hücrelerinin kültürizasyonu, coDel transformasyonu ve seçim	26
2.4.4.	Tek hücre klonlarının KO karakterizasyonu	27
2.5.	Proteaz KO <i>Tetrahymena</i> Hatlarının Flask Ortamında Büyüme Eğrilerinin Çıkarılması	29
2.6.	<i>T. thermophila</i> KO Hatlardan Alınan Dış Ortam örneklerinin <i>in vitro</i> Sekretomal Proteolitik Aktivite Analizi	30
2.6.1.	Sekretom örneklerinin konsantre edilmesi	30
2.6.2.	Konsantre edilmiş sekretom proteazlarının proteolitik aktivitelerinin karşılaştırmalı belirlenmesi	30
3.	BULGULAR	32
3.1.	Flask Ortamında Çoğaltılan SB210 Irkı Hücre Kültüründen Alınan Kültür Ortamının Rtm ve HSA Substratlarına Karşı Gösterdiği Sekretomal Proteolitik Aktivite	32
3.2.	KO Edilmesi Amaçlanan Sekretom Proteaz Genlerinin Biyoinformatik Olarak Belirlenmesi	35

3.3. <i>T. thermophila</i> 'da <i>CTH34</i> Geninin Homolog Rekombinasyon ile MAK Genomundan Silinmesi	37
3.4. <i>T. thermophila</i> 'da <i>CYP6</i> , <i>CTH40</i> , <i>CTH90</i> ve <i>CTH115</i> Genlerinin coDel Yöntemiyle MAK Genomundan Silinmesi.....	43
3.5. Flask Ortamında Doğal Suş SB210 ile Karşılaştırmalı Olarak Proteaz KO Hatlarına Ait Büyüme Eğrilerinin Çıkarılması.....	48
3.6. <i>T. thermophila</i> KO Hatlarının <i>in vitro</i> Sekretomal Proteolitik Aktivite Karakterizasyonu	50
4. TARTIŞMA	56
5. SONUÇ	64
KAYNAKÇA.....	65
EKLER	77
ÖZGEÇMİŞ	95

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1. T. thermophila'da rekombinant üretimi sınanmış proteinler.....	14
Tablo 2.1. Tez kapsamında T. thermophila SB210 suşu MAK genomundan KO edilmesi hedeflenen sekretom proteazları	18
Tablo 2.2. coDel yöntemiyle Tetrahymena MAK genomundan silinmesi hedeflenen proteaz genleri.....	24
Tablo 3.1. Hedef proteazlar içinde yapılan biyoinformatik analiz özet bilgi.....	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. T.thermophila'nın hücre içi yapısı ve hücrel kompartmanları.	5
Şekil 1.2. Amitotik makronükleer bölünme ve fenotipik ayrışma	7
Şekil 1.3. Tetrahymena konjugasyonu	8
Şekil 1.4. coDel yöntemiyle hedefli gen knock-out'u.....	10
Şekil 1.5. Tetrahymena'da genomik dışlama (genomic exclusion) çaprazlaması.....	11
Şekil 2.1. Somatik KO vektörü pCHXR-CTH34KO	20
Şekil 2.2. Poliploid MAK genomunda CTH34 geni kopya sayısı ile CHXR direnç geni kopya sayısını karşılaştırmak için tasarlanan 3 primerli PZR çalışma mekanizması	22
Şekil 2.3. Çalışmada kullanılan coDel KO vektörü pMcoDel. Vektör rDNA mini kromozom formunda olup 17S, 26S ve 5,8S rDNA genleri ile KO hedef dizinin klonlandığı M-IES (bir tip-A IES) dizisini içermektedir.	24
Şekil 2.4. T. thermophila MAK genomundan silinmesi hedeflenen proteaz genleri için tasarlanmış coDel PZR kontrolü.....	29
Şekil 3.1. HSA proteininin Tetrahymena sekretom proteazları tarafından büyüme evresine ve muamele süresine bağlı degradasyon analizi.	33
Şekil 3.2. Monoklonal antikor ilacı Rtm'nin Tetrahymena durağan faz sekretom proteazları tarafından muamele süresine bağlı degradasyon analizi.....	34
Şekil 3.3. Literatür ve biyoinformatik araştırmalarla belirlenip KO edilmesi hedeflenen T. thermophila SB210 sekretom proteazlarının korunmuşluk ve benzerlik incelemesi.	36
Şekil 3.4. pCHXR-CTH34KO vektörüne klonlanmak üzere geni çerçeveleyen homoloji kollarının (HK) üretilmesi, restriksiyon-ligasyon yöntemiyle vektöre entegre edilmesi ve transformant Tetrahymena tek hücre klonlarının antibiyotik baskısına genomik seviyede cevabı.	39
Şekil 3.5. CTH34KO hat olarak seçilen H1 ve H3'ün KO karakterizasyonu.....	42

Şekil 3.6. 4 proteaz geninin coDel ile genomdan silinmesi için üretilen hedef sekanslar ve bu sekansların pMcoDel vektörüne entegrasyonu.....	43
Şekil 3.7. Star hat ile genomik dışlama çaprazlaması yapılarak SB210 ırkından türetilen, SB210 genetik materyaline sahip Tetrahymena alt-ırklarının 2-dgal seçilimi	44
Şekil 3.8. Pozitif coDel transformant kültürlerinde tek hücre klon hatlarının oluşturulması ve bu hatlarda hedef gen eliminasyonunun kontrol edilmesi	46
Şekil 3.9. coDel ile hedef sekans eliminasyonu görülen KO hatlarında silinen genlerin ekspresyon analizi ve ~1 ay cam tüp stoğunda tutulan KO hatların genomik kararlılığının belirlenmesi.....	47
Şekil 3.10. Doğal suş SB210 ve KO hatların flask ortamında büyüme eğrisi karşılaştırması ile 600 nm optik yoğunluk değerine karşı hücre sayısı standart grafiği	49
Şekil 3.11. 40 kat konsantre edilip alikotlanan SB210 ve KO flask kültürleri sekretom örneklerinin konsantrasyon tayini.....	51
Şekil 3.12. SB210 ve proteaz KO hatların sekretomal proteolitik aktivitelerinin in vitro belirlenmesi.....	53
Şekil 3.13. 10 kat ve 40 kat konsantre edilen SB210 ile CYP6KO hat K12'nin Rtm substratına karşı gösterdiği muamele zamanına bağlı in vitro proteolitik aktivite	55
Şekil 4.1. CTH34KO hattı H1'in flask kültürizasyonu sırasında CHX eklenmemesinin popülasyon hücre sayısına etkisi.....	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

2-dgal	: 2-deoksigalaktoz
bç	: Baz çifti
BK	: Besin kofulu
BSA	: Sığır serum albümini
CdCl ₂	: Kadmiyum klorid
cDNA	: komplementer DNA
CHO	: Çin Hamster ovaryum
CHX	: sikloheksamid
dk	: Dakika
g	: Göreceli merkezkaç kuvveti
gDNA	: genomik DNA
gr	: Gram
HSA	: İnsan serum albümini
Par	: Paramomisin
KD	: Knock-Down
kDa	: Kilodalton
KK	: Kontraktil koful
KO	: Knock-Out
MAK	: Makroçekirdek
mAb	: Monoklonal antikor
MİK	: Mikroçekirdek
M	: Molar
mM	: Milimolar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
μM	: Mikromolar
μl	: Mikrolitre

NK	: Negatif kontrol
nt	: Nükleotid
OD	: Optik yoğunluk
par	: Paramomisin
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PK	: Pozitif kontrol
PTM	: Post-translasyonel modifikasyon
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
rDNA	: Ribozomal DNA
Rtm	: Ritüksimab
SCM	: Kullanılmış kültür ortamı

1. GİRİŞ

1.1. Biyoteknolojik İlaçlar ve Rekombinant Üretim

Biyoteknoloji yeni ürünlerin, tekniklerin veya süreçlerin geliştirilmesi için canlı organizmaların veya canlı sistem bileşenlerinin kullanılmasıdır. Tıbbi biyoteknoloji ise aşı üretimi ve biyolojik ilaçlar başta olmak üzere moleküler tanı tekniklerini ve tedavileri içermektedir. Özellikle biyofarmasötikler (biopharmaceuticals) ya da biyoteknolojik ilaçlar olarak isimlendirilen ve moleküler biyoloji yöntemlerinin kullanıldığı biyoteknolojik süreçlerle geliştirilen bu moleküllerin üretimi, insülinin ilk kez rekombinant DNA teknolojisiyle üretilip pazarlandığı 1980'lerin başından bu yana dikkat çekici bir ivmeyle artmış ve 2020 yılı itibarıyla küresel pazar payını 284 milyar dolar seviyesine çıkarmıştır (Dorey, 2021; Morrow & Langer, 2020). Evaluatepharma tarafından 500 ilaç firmasından toplanan verilere göre hazırlanan raporda biyofarmasötiklerin küresel satışlarında artış eğilimi gözlenirken kimyasal tabanlı küçük molekül ilaçlarınınki azalmaktadır, aynı fapora göre 2019 yılında dünya çapında en çok satılan reçeteli ilk 100 ilaç arasında biyolojik ilaçların %53'lük bir paya sahip olduğu bildirilmiş ve bu oranın 2026 yılına kadar %55 seviyesine çıkacağı tahmin edilmiştir (EvaluatePharma, 2019). Türkiye'de gözlenen ilaç satış eğilimi ise küresel pazardakine benzer bir profil göstermiş, 2020 tarihli T.C. Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı'nın ilaç sektörü raporunda 2015 yılında 2,5 milyar TL olan biyolojik ilaç satışı 2019 yılında 7 milyar TL'ye ulaşmıştır.

Kimyasal yollarla üretilen, küçük moleküler ağırlıklı geleneksel ilaçlarla kıyaslandığında biyoteknolojik yöntemlerle üretilen biyofarmasötiklerin birtakım avantajları mevcuttur ve bu avantajlar biyofarmasötiklerin üretimi ve satışında görülen ivmenin temel nedeni olarak görülmektedir. Öncelikle biyofarmasötikler yalnızca belirli molekülleri, dokuları ya da hücre gruplarını hedef alır ve geleneksel ilaçlarla ilişkili yan etkilere nadiren neden olmaktadır. Ayrıca geleneksel ilaçlarla karşılaştırıldığında biyofarmasötikler yüksek özgüllük ve aktivite sergilemekte, geleneksel sentetik ilaçlara zayıf yanıt veren hastaların tedavisini kolaylaştırmaktadır (Craik vd., 2013; Mitragotri vd., 2014).

Sentetik ilaçların aksine, protein tabanlı biyofarmasötikler oldukça kompleks yapıda olup başta *Escherichia coli* gibi prokaryotik sistemlerde ya da mantar (*Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia pastoris*), memeli hücre hatları (Çin Hamster Ovaryum -CHO ve fare

miyeloma hücre hatları) ve böcek hücre hatları gibi ökaryotik sistemlerde üretilir. Fakat bu canlı üretim sistemlerinin her birinin rekombinant protein üretimi açısından avantajlı ve dezavantajlı yönleri mevcuttur. Mesela kültürizasyonu oldukça maliyetsiz ve protein üretim verimliliği yüksek olan prokaryotik konakçı sistemleri insan proteinlerinin doğru katlanmasını ve post-translasyonel modifikasyonları (PTM) tam gerçekleştiremediğinden yüksek immünojeniteye neden olmakta, diğer yandan etkinliğini arttırmak ve immünojeniteden kaçınmak için kullanılan memeli hücre hatları ise üretim maliyetlerini yükseltmektedir. Bu konu Elguero ve ark. tarafından yayınlanan derlemede daha detaylı olarak ele alınmıştır (Elguero vd., 2019). Temel olarak rekombinant protein üretiminde amacın en düşük maliyet, yan etki ve immünojenite ile en yüksek üretim, verim ve etkililiğin sağlanması olduğu düşünüldüğünde, yeni üretim sistemlerinin sınanması ve geliştirilmesi öncelik verilmesi gereken konulardan biri olmaktadır. Bu noktada silli tekhücreli ökaryotik *Tetrahymena thermophila* (Protista) hem homolog hem de heterolog rekombinant protein üretimi gerçekleştirilebilen alternatif bir üretim organizması olarak öne çıkmaktadır ve daha detaylı bilgi aşağı bölümlerde verilmiştir.

Biyolojik ilaçların beşerî kullanımı söz konusu olduğunda göze çarpan husulardan biri ürünün insandaki immünojenitesi en aza indirilmeye çalışıldıkça üretim ve kültürizasyon maliyetlerinin artmasıdır. Bundan dolayı rekombinant protein ve afinitik takılı molekül üretiminde en düşük maliyet, yan etki ve immünojenite ile en yüksek üretim, verim ve etkililiğin sağlanabilmesi için yeni üretim sistemlerinin araştırılması ve geliştirilmesi, son yıllarda biyoteknoloji alanında önde gelen araştırma konularındandır. Dolayısıyla üretilmek istenilen rekombinant proteinin spesifik özelliklerine (membran proteini, sitoplazmik protein veya multimerik kompleks gibi) bağlı olarak farklı ekspresyon sistemleri tercih edilmektedir. Bu noktada silli tekhücreli ökaryotik *Tetrahymena thermophila* (Protista) hem homolog hem de heterolog rekombinant protein üretimi için alternatif bir konakçı organizma olarak öne çıkmaktadır. Daha detaylı bilgi ileriki bölümlerde verilmiştir.

Rutin kullanılan konakçı organizmalarda rekombinant protein üretiminde karşılaşılan en büyük sorunlardan bir tanesi hücre içi ve hücre dışı proteazların üretim verimliliğini düşürmesidir. Çünkü üretilen rekombinant proteinler üretici organizmanın doğal proteazları tarafından parçalandığı, bu nedenle rekombinant protein miktarında, kararlılığında ve aktivitesinde düşüşler görüldüğü raporlanmıştır (Demain & Vaishnav, 2009; Dorai vd., 2011;

P. Elliott vd., 2003; Gao vd., 2011; Hombergh vd., 1997; Lim vd., 2018; Mandal vd., 2016; Sinha vd., 2005). Özellikle üretim sonrası işleme (downstream processing) ve saflaştırmayı kolaylaştırmak gibi çeşitli avantajlardan dolayı hücre dışına salgılanan rekombinant protein ilaçlar, bu tez çalışmasının konusunu oluşturan hücre dışı proteazlarca parçalanarak üretim verimliliğini düşürmektedirler (Freudl, 2018; Peng vd., 2019; Quax, 1997).

1.2. Proteazlar ve Rekombinant Üretime Etkileri

Proteazlar, protein moleküllerini oluşturan aminoasitler arasındaki peptit bağlarını hidroliz reaksiyonu ile kıran ve hücre bölünmesinden hücre ölümüne kadar çeşitli biyolojik süreçlerde protein katabolizmasında görev alan enzim grubudur. Uzun yıllar boyunca, proteazlar üzerine yapılan çalışmalarda proteazların sindirim sistemi içerisinde spesifik olmayan protein parçalama fonksiyonuna odaklanılmışken, günümüzde proteazların oldukça spesifik proteolitik reaksiyonları katalizlediği bilinmektedir (McDonald, 1985; Neurath & Walsh, 1976; Vizovišek vd., 2018). Neredeyse tüm bitki, hayvan ve mikroorganizmalar arasında dağılım gösteren ve yüksek organizmalarda kodlayıcı genlerin yaklaşık %2-3'ünü oluşturan proteazlar enzim sınıflandırmasında hidrolazlar altında (EC 3.4) yer alır. Hücre içi homeostazın devamlılığında pek çok metabolik ve düzenleyici fonksiyona sahip proteazların endüstriyel olarak deterjan, gıda, deri işlemeciliği ve terapötik uygulamalar gibi alanlarda kullanımı söz konusudur (Gimenes vd., 2021; Mahajan & Badgujar, 2010). Protein yapısında aktivite gösterdikleri yere göre ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Ekzopeptidazlar, protein substratın amino veya karboksi terminallerine oldukça yakın olan peptit bağlarını parçalarken endopeptidazlar ise substratın terminalleri hariç herhangi bir iç bölgesindeki peptid bağı kırabilir. Endopeptidazlar katalitik aktiviteden sorumlu amino asit kalıntılarına bağlı olarak serin, aspartik, sistein, treonin ve glutamik peptidazlar ile metal iyonu gerektiren metalloproteazlar olmak üzere altı sınıflara ayrılmaktadır (Rawlings vd., 2012).

Prokaryotik ve ökaryotik rekombinant protein üretim sistemlerinde üretim sürecinde karşılaşılan en büyük sorun hücre içi ve hücre dışı proteazlarca üretim verimliliğinin düşürülmesidir. Örneğin *E. coli*'de RNA polimeraz sigma faktörü kodlayan gende (*rpoH* geni) oluşturulan bir mutasyonun rekombinant üretilen *S. aureus* protein A ve TEM β -

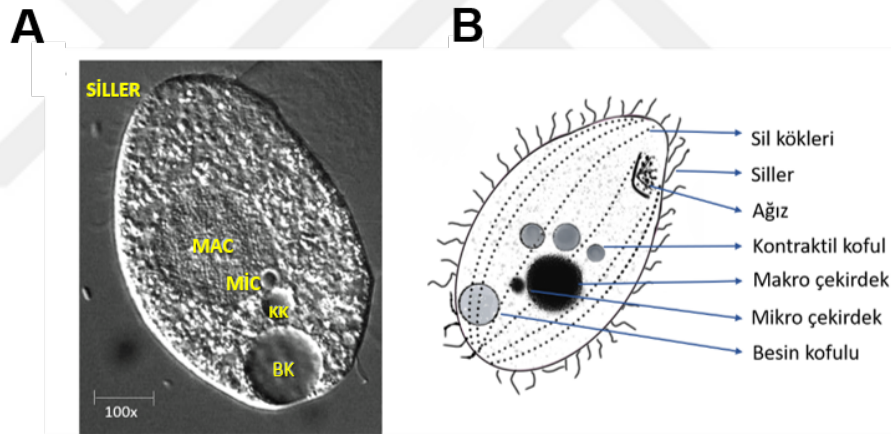
laktamaz füzyon proteininin (Spa-Bla) salgılanma miktarını arttırdığı fakat hücre duvarı protezlerinin da (cell-envelope proteases) mutasyona uğradığı ikili mutant hatta ise 44 kat gibi daha fazla bir artış bildirilmiştir (Meerman & Georgiou, 1994). *C. serevisiae*'de yapılan bir araştırmada insan D_{2S} dopamin reseptörünün heterolog ekspresyonu doğal suşta (wild-type), tek proteaz KO hatta (*pral*) ve çift proteaz KO hatta (*pral* ve *prbl*) gerçekleştirildiğinde, çift proteaz KO hattaki üretim veriminin diğer hatlardan daha yüksek olduğu immüno blot analiziyle gösterilmiştir (Sander vd., 1994). CHO-K1 hücreleriyle yapılan bir çalışmada ise bir transmembran serin proteaz olan matriptaz-1'in rekombinant üretilen proteinlerin degradasyonundan sorumlu ana proteaz olduğu bulunmuş ve bu proteazın genomdan silindiği hücre kültürlerinde mAb degradasyonunun neredeyse sıfıra düştüğü hem *in vitro* hem de *in vivo* analizlerle gösterilmiştir (Laux vd., 2018). Geliştirilen bu CHO-K1 transmembran serin proteaz matriptaz-1 KO hücre hattı Novartis Pharma AG tarafından patentlenmiştir (Laux vd., 2019). Rekombinant protein üretim verimini arttırmaya yönelik proteaz KO hatların geliştirilmesi üzerine oldukça fazla çalışma raporlandığından bu yaklaşımın verimlilik artışına neden olduğu anlaşılmaktadır (Homborgh vd., 1997; Idiris vd., 2006; Jin vd., 2007; Kamaruddin vd., 2018; Kim vd., 2008, 2013; Kour vd., 2019; Kuroda vd., 2007; Landowski vd., 2015; Laux vd., 2018; Li vd., 2019; Liu vd., 2021; Mandal vd., 2014; Meerman & Georgiou, 1994; Pomerantsev vd., 2011; Sander vd., 1994; Yoon vd., 2009, 2011).

Rekombinant protein üretim verimliliğini düşüren endojen proteaz sorunu, burada verilen örneklerden de anlaşılacağı üzere verimliliği düşüren ilgili proteaz(lar)ın belirlenip canlı genomundan silinmesi yaklaşımıyla giderilmiştir. Heterolog protein ekspresyonu konusunda benzer bir probleme (ileriki bölümlerde bahsedilmiştir) sahip *T. thermophila* için de bu tez kapsamında ilgili proteaz(lar)ın belirlenip genomdan silinmesi ile verimlilik artışı sağlanabileceği hipotezinin test edilmesi amaçlanmıştır.

1.3. Alternatif bir rekombinant protein üretim konakçısı: *Tetrahymena thermophila*

Tatlı sularda 18–41°C aralığında yaşayan *Tetrahymena thermophila* (Sınıf: Oligohymenophora ve Familya: Hymenostomatidae) 30x50 µm boyutlarında silli tek hücreli (unicellular) bir ökaryottur. Doğal şartlarda bakterilerle beslenen bu organizma, laboratuvar

ortamında doku özütlerinden üretilen veya kimyasal olarak tanımlanmış steril besiyerlerinde üretilmektedir. Hücre popülasyonları, optimum koşullar altında yaklaşık 2-3 saat olan bölünme süresi nedeniyle oldukça hızlı üretilmekte, uygun biyoreaktör şartlarında (çözünmüş oksijen %20-60, pH: 7,0 ve sıcaklık 30 °C gibi) hücre sayısı 5 ile 20 milyon/ml seviyesine çıkabilmektedir (Hellenbroich vd., 1999; Kiy & Tiedtke, 1992a, 1992b). *Tetrahymena* canlılığın temeli sayılabilecek katalitik RNA ve telomeraz mekanizması ile telomer yapısı gibi nobel ödüllü biyolojik olaylara ışık tutan bir model organizmadır (Brownell vd., 1996; Greider & Blackburn, 1985). Yaşam döngüsü iki evreden oluşan *Tetrahymena*, zengin besin ortamında bölünerek eşeysiz çoğalırken besin yokluğunda farklı çiftleşme tiplerinin konjugasyonu ile eşeyli çoğalır (A. M. Elliott & Hayes, 1953).



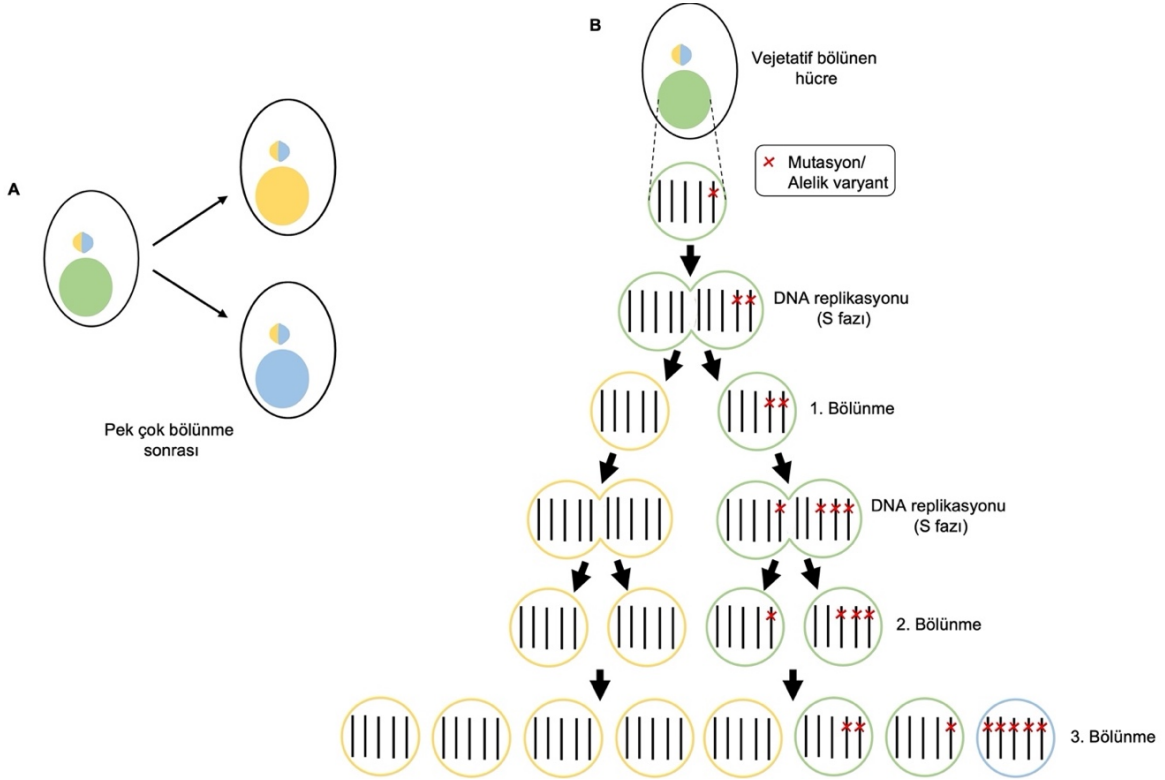
Şekil 1.1. *T. thermophila*'nın hücre içi yapısı ve hücresel kompartmanları. A) Organizmanın faz-kontrast uygulanan ışık mikroskobu altında 100x görüntüsü. B) Hücre içi kompartimentalizasyonunu gösteren şematik çizim. MAC; Makroçekirdek, MIC; Mikroçekirdek, KK; Kontraktıl koful, BK; Besin kofulu

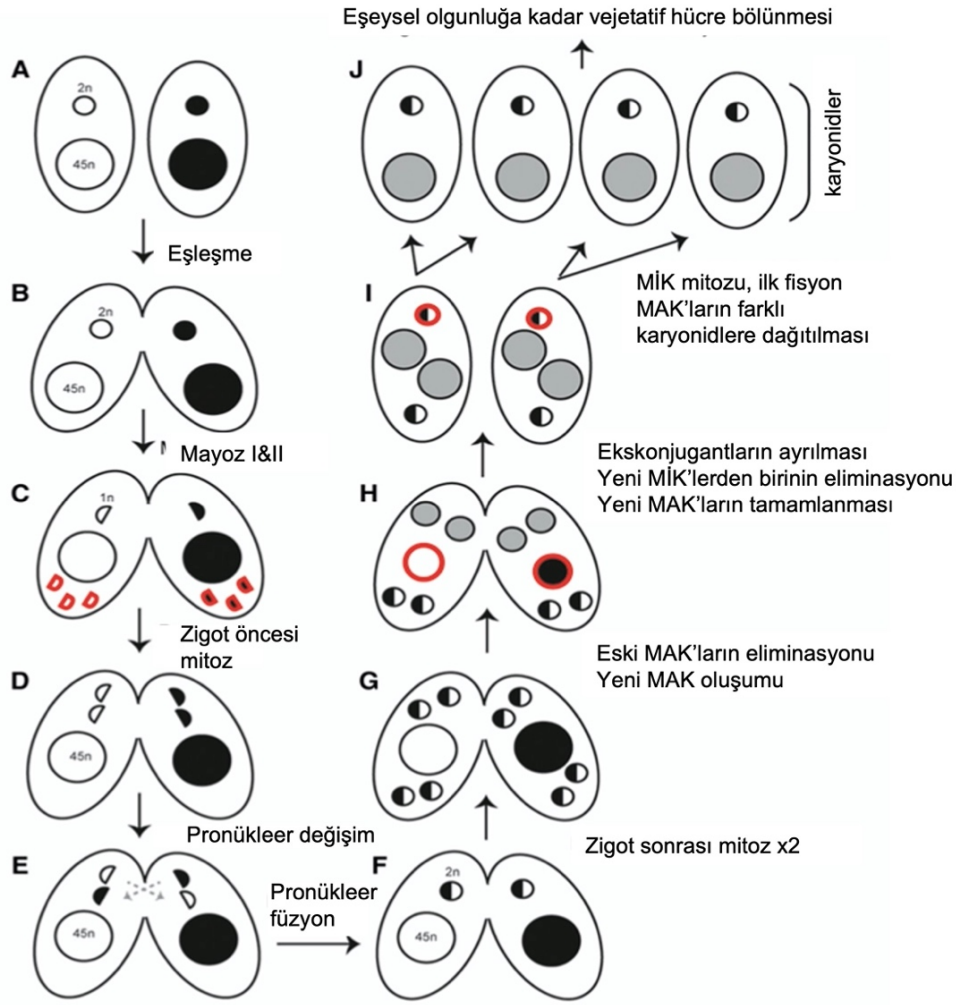
Tüm siliatlarda olduğu gibi *T. thermophila*'da da yapıcı-görevce nükleer farklılaşma (dimorfizm) görülmektedir; yani genetik üremede kullanılan $2n=10$ kromozomlu genomu taşıyan mikroçekirdek (MİK) ve somatik hücresel görevleri icra eden genomu taşıyan makroçekirdek (MAK) aynı sitoplazmada bulunmaktadır. MAK genomu, her biri ~45 kopyalı (poliploid) ~200 farklı minikromozom ile ~9000 kopyalı (poliploid) ribozomal DNA (rDNA) mini-kromozomlarından (5.8S, 17S ve 26S rDNA genleri) oluşur (Eisen vd., 2006). Organizmanın vejetatif evresinde transkripsiyonel olarak sessiz olan MİK, hücrelerin eşeyli üreme evresinde Mendel genetiğine bağlı mayoz, haploid çekirdek değişimi ve zigotik

çekirdek oluşumu ile genetik çeşitliliği sağlar. MAK ise vejetatif evrede transkripsiyonel ve translasyonel aktiviteyi sağlayarak hücre fenotipini kontrol eder. Yeterli besin içeren ortamda vejetatif bölünme sırasında replike olan MİK ve MAK kromozomlarından MİK kromozomları mitoz ile bölünürken MAK amitotik bölünür. Böylece her MAK biriminde bulunan baskın ve çekinik aleller zamanla fenotipik ayrışmaya (phenotypic assortment) giderek 45 adet ploid birimin aynı aleller kopyasına dönüşmesine ve MAK'ın haploid genotip ve fenotipmiş gibi (Mendel genetiğindeki homozigot çekiniklik veya baskınlık gibi) davranmasına neden olur. Fenotipik ayrışma tanım olarak bu durumda bir alelik varyant için başlangıçta heterozigot genotipe sahip MAK DNA'sının vejetatif çoğalma sırasında ardışık amitoz turları sonucunda homozigot (fully assorted) hale gelmesidir (Şekil 1.2-A). Fenotipik ayrışma mekanizması Şekil 1.2-B'de şematize edilmiştir. MAK'ın S fazında bir kez replike olan MAK DNA'sı amitotik olarak 2 yavru hücre MAK'ına dağıtılır. Bu süreçte iki kutup arasında iğ ipliği oluşumu, yoğun kromozom kondensasyonu ve mikrotübüllerin sentromerlere bağlanması gibi bilindik mitoz olaylarının tümü MAK bölünmesi sırasında görülmez (Cervantes vd., 2006; Flickinger, 1965). Böylece replike olan mutant alel ya da alelik varyant kopyaları aynı hücre MAK'ına taşınabilir. Sonuç olarak birbirini takip eden amitotik bölünmelerle mutant alelin (mavi daire) ya da doğal alelin (sarı daire) sabitlendiği (homozigot ifade edildiği) MAK'a sahip hücreler elde edilir (Şekil 1.2-B) (Allen & Nanney, 1958; Doerder vd., 1975; Merriam & Bruns, 1988; Nanney & Preparata, 1979; Orias & Flacks, 1975). Fenotipik ayrışma doğada seçici stres koşullarında hızlı somatik adaptasyon sağlarken laboratuvarında ise ilgili mutasyonları veya fenotipleri izole etmek için kullanılır.

Eşeyssel olarak olgun *T. thermophila* hücreleri yedi farklı çiftleşme tipinden birine sahiptir ve her çiftleşme tipi başka bir çiftleşme tipiyle eşleşebilirken aynı çiftleşme tipine sahip hücreler eşleşemez (A. M. Elliott & Hayes, 1953; Nanney & Caughey, 1953). Şekil 1.4'te şematize edilen *Tetrahymena* konjugasyonunda mayoz (B), gametogenez (C ve D), gamet çekirdeklerinin füzyonu ve fertilizasyon çekirdeğinin (zigot) oluşumu (E ve F) gibi yüksek oranda korunmuş ökaryotik süreçler bulunmaktadır. Zigotik çekirdek iki kez mitoz geçirerek (postzygotic mitosis) oluşan 4 çekirdekten ikisi (G) yeni MAK (MAK anlagen) diğer ikisi ise yeni MİK'e dönüşür (H). Bu süreçte eski MAK degrede edilir. Mitoz geçiren zigotik MİK'ten yeni MAK oluşması sırasında genomda 3 yapısal farklılaşma gözlenmektedir. Bunlardan ilki MİK'teki transpozon kökenli IES (Internally Eliminated

Sequences) dizilerinin yeni MAK'tan silinmesidir. Bu silinme, MİK genomunda IES bölgelerinden 26-32 bç büyüklüğünde scnRNA'ların (scanning RNAs) üretilmesi ve bu RNA'ların da yeni MAK'a taşınarak MAK genomunda IES bölgelerini işaretleyip ilgili enzimlerin bu dizileri kesmesiyle sağlanır. İkinci olarak yeni oluşan MAK kromozomları CBS (chromosomal breakage sequences, CBS) denilen spesifik bölgelerden kesilerek DNA



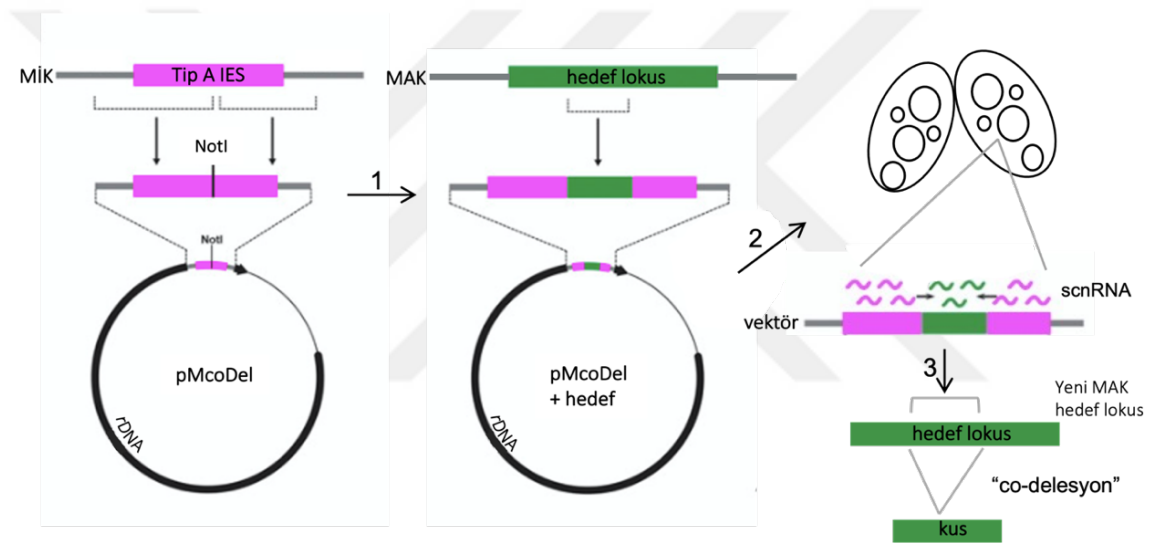


Şekil 1.3. *Tetrahymena* konjugasyonu. *Tetrahymena*'nin yaşam döngüsünde eğeyli üreme konjugasyon ile sağlanmaktadır. Oval şekil ile temsil edilen hücrelerin MAK'ları (büyük daire) ve MİK'leri (küçük daire) barındırdıkları DNA ploidiyle beraber gösterilmiştir. Siyah ve beyaz farklı aleller bakımından homozigot olan farklı çiftleşme tipindeki iki hücreyi temsil etmektedir. Mayoz sonucu oluşan haploid MİK yarım daire ile gösterilmiştir. Kırmızı ile çerçevelenmiş çekirdekler konjugasyon sürecinde apoptotik olarak elimine edilmektedir. Şekil Ruehle ve arkadaşlarının (2016) derlemesinden düzenlenmiş ve Türkçe'ye çevrilmiştir.

fragmentlerine ayrılır ve MAK'ın ~200 mini-kromozomu meydana gelir. Son olarak, oluşan mini-kromozomlar endoreplikasyon ile kopya sayılarını arttırarak her biri ~45ploid birimleri oluşturur ve poliploid MAK genomu tamamlanır. Aynı çift parental hücreden oluşan dört karyonid (J) konjugasyondan hemen sonra aynı fenotip ve genotipteyken takip eden ~100 vejetatif bölünmenin ardından fenotipik ayrışma nedeniyle çiftleşme tipi de dahil popülasyonda fenotipik farklılıklar oluşur (Mochizuki vd. 2002; Yao, Zheng ve Yao 1987).

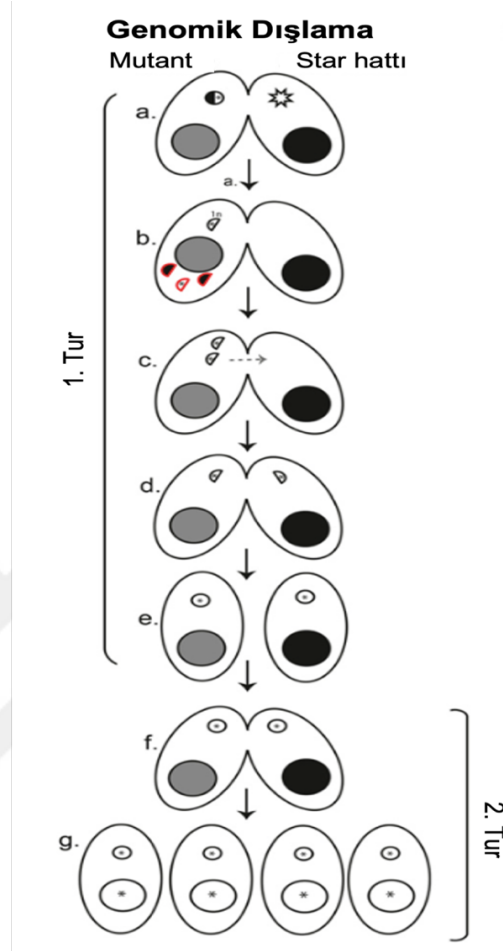
T. thermophila'da yapılacak çalışmanın amacına göre germ hattı (MİK) çekirdeğinde ya da somatik (MAK) çekirdekte fonksiyon kaybı (loss of function) mutasyonları belirli moleküler yöntemler kullanılarak tamamen hedefli bir şekilde oluşturulabilmektedir. Hedefli fonksiyon kaybı (loss of function) çalışmaları için dört yöntem mevcuttur. Bunlardan ilki ve uygulanabilirlik açısından en basit olanı homolog rekombinasyon ile somatik Knock-Out yöntemidir. Somatik KO'da poliploid MAK'ta knock-out edilmek istenen genin yerine homolog rekombinasyonla bir antibiyotik direnç geni yerleştirilmekte ve bu antibiyotik direnç gen aleli fenotipik ayrışma esnasında artan antibiyotik baskısıyla ilgili genin tüm MAK kopyalarının yerine geçerek MAK'ı mutant karakter açısından sabit (homoploid) hale getirmektedir. Fenotipik ayrışma bazı hücrelerde başlangıçta 3-5 kopya olan direnç geninin kopya sayısının artmasına, antibiyotik baskısının kademeli olarak arttırılması ile de daha fazla direnç gen kopyasını (maksimum 45) taşıyan hücrelerin seçilmesini sağlamaktadır (Merriam & Bruns, 1988; Mochizuki & Gorovsky, 2005). Germ hattı KO'u olarak bilinen ikinci yaklaşımda somatik KO ile benzer bir yol izlenerek diploid MİK genomunda ilgili genin iki kopyasından biri yerine homolog rekombinasyonla bir antibiyotik direnç geni yerleştirilerek hedef lokusta mutasyon açısından heterozigotluk oluşturur. Farklı çiftleşme tipindeki bu mutant heterozigot hücreler homozigot mutant bir KO hattı elde etmek için konjugasyona alınır (Cassidy-Hanley vd., 1997; Mochizuki & Gorovsky, 2005). Üçüncü yaklaşım ise hedef gen dizisi sekansı ile bir A-tipi IES dizisinin kimerik konstraktının konjugasyon sırasında hücrelere aktarıldığı ve yeni MAK oluşumu sırasında IES'ler ile birlikte ilgili genin de ektopik eliminasyonunun indüklendiği co-Delesyon (coDel) yöntemidir (Hayashi & Mochizuki, 2015) (Şekil 1.4). Transformasyon vektöründe IES DNA dizileri arasına klonlanan ilgili gen sekansı (1), aynı A-tipi IES'ler gibi yeni oluşan MAK'ta IES bölgelerinin işaretlenmesini sağlayan scnRNA'ların üretilmesini sağlar (2). KO için hedeflenen gen dizisinden transkribe edilen scnRNA'lar yeni MAK'ta hedef gen ile komplement oluşturur ve görevli enzimlerin bu bölgeyi IES gibi elimine etmesini sağlar (3). *Tetrahymena*'da son olarak CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9) sistemiyle MİK KO'u da yapılabilmektedir. Rehber RNA (gRNA), Cas9 kodlayıcı dizi, mikronükleer lokalizasyon sinyali (NLS), paramomisin direnç geni ve BTU1 homoloji kollarını içeren CRISPR/Cas9 vektörü standart transformasyon yöntemleriyle MAK'ta BTU1 lokusuna entegre edilmekte,

antibiyotik seçiliminin ardından Cas9 proteini ve gRNA üretimi kadmiyum ile indüklenir. İndüklemeyele ekspresyonu arttırılan ve NLS ile MİK'e yönlendirilen Cas9-gRNA kompleksi, gRNA ile yönlendirilen hedef bölgede çift zincir kırığı oluşturur. DNA kırığı, olası in-del mutasyonlarına açık homolog olmayan birleştirme (NHEJ) ile tamir edilir. Bu tamir sırasında oluşan in-del mutasyonu, mutant hattın uygun T.thermophila-STAR hattı ile genomik dışlama (genomic exclusion) çaprazlamasına alınmasıyla MAK'a taşınır (Şekil 1.3) ve fenotipte homozigot olarak ifade edilir (Suhren vd., 2017).



Şekil 1.4. coDel yöntemiyle hedefli gen knock-out'u. Ortasına NotI restriksiyon kesim dizisi entegre edilen bir tip-A IES dizisi (M-IES) pMcoDel rDNA vektörüne klonlanmıştır. KO edilmek üzere hedeflenen DNA dizisi NotI restriksiyon bölgesinden vektöre yerleştirilir (1). Konjugasyonun ~7. saatinde transforme edilen (2) vektördeki IES dizisinden ve araya yerleştirilen hedef DNA dizisinden scnRNA'lar üretilir. scnRNA'lar yeni oluşan MAK'ta hedef lokusun IES sanılarak silinmesine neden olur. Şekil, Hayashi ve Mochizuki (2015) yayınından düzenlenmiştir.

Resesif bir fonksiyon kaybı mutasyonu MİK'e yerleştirildiğinde fenotipe etkisinin görülebilmesi için MAK'a aktarılması ve MAK'ın KO alel bakımından homoploid olması gerekmektedir. Bu noktada önemli bir avantaj sağlayan *Tetrahymena*'da resesif germ hattı mutasyonları, genomik dışlama (genomic exclusion) ve sitogami (biparental ya da uniparental) ile hem MİK hem de MAK'ta "**tüm-genom homozigot soy**" üretilerek ifade edilebilir (Allen, 1967; Bruns vd., 1976; Cole & Bruns, 1992; Sanford & Orias, 1981). Genomik dışlama çaprazlamasında normal bir hücre, fonksiyonel haploid bir çekirdek



Şekil 1.5. *Tetrahymena*'da genomik dışlama (genomic exclusion) çaprazlaması. Semboller Şekil 1.4'te olduğu gibi kullanılmıştır ve * mutant aleli belirtmektedir. MİK'te heterozigot bir mutasyona sahip (yarı siyah-yarı beyaz daire) hücre defektif MİK'e sahip star hattıyla çaprazlanır (1. tur). Bu çaprazlama sonunda pronükleer değişim tekyönlü gerçekleşerek iki konjugantın da aynı genotipe sahip haploid çekirdelele sahip olur (c ve d). Endoreplikasyonla kendini eşleten haploid MİK diploid hale gelir. Bu aşamada hücreler zengin besiyerine alındığında konjugasyon devam etmemekte, hücreler tüm-genom homozigot MİK'e sahip heterokaryonlar olarak kalmaktadır (e). Hücreler açlıkta tutulmaya devam ederse aynı 1. tur çiftleri eski MAK'larını korudukları için tekrar konjugasyona girerek (2. tur; f) tüm-genom homozigot homokaryon bir soy elde edilir (g). Şekil Ruehle ve arkadaşlarının (2016) derleme yayınından düzenlenmiştir.

üretmeyen hücre ırkıyla (STAR hat) konjugasyona alınmaktadır (Allen, 1967) (Şekil 1.5).

1. tur çaprazlamada normal hücre hattı haploid gametik çekirdek üretebilirken STAR hat hücresinde gametik haploid çekirdek oluşumu görülmemektedir (b). Bu nedenle pronükleer değişim sırasında transfer sadece normal hücreden STAR hatla doğru tek yönlü gerçekleşir (c ve d). Böylece konjugantların ikisine de birer haploid MİK dağıtılmış olur. Bundan sonraki adımda hücre çifti mikropipet ile mikroskop altında farklı bir besiyeri bulunan bir hazneye

alınırsa birbirinden ayrılır, bireyler yeniden beslenmeye başlar ve haploid çekirdekler “**endoreplikasyon**” ile diploid hale gelir (e), endoreplikasyon ile kendini kopyalayan haploid MİK “**tüm-genom homozigot**” bir heterokaryon oluşturur. 1. tur konjugasyondan sonra beslenen hücreler ortamda bulunan besiyerini tükettiğinde açlık süreci başlar. Eski MAK’ları sayesinde çiftleşme tiplerini de koruyan hücreler açlık koşulunda tekrar bir araya getirildiklerinde 2. tur konjugasyon normal gerçekleşir (f ve g). Böylece konjugasyon tamamlandığında tüm-genom homozigot MİK’lerden tüm-genom homozigot MAK’lar oluşacağı için MİK ve MAK’ın aynı genetik köken kaynaklı olmasından dolayı bu yeni nesil bireylere “**homokaryon karyonidler**” adı verilir. Bu tez kapsamında genomik dışlama yöntemi, *T. thermophila* ırkının (SB210) aynı genotipi taşıyan farklı çiftleşme tiplerine sahip hücrelerin elde edilmesi için kullanılmıştır. Bunun nedeni, coDel ile KO transformasyonunun, konjugatif hücrelere uygulanması ve üretilecek proteaz KO hatlarının kontrol *T. thermophila* SB210 ırkıyla karşılaştırılabilir olmasını sağlamaktır (daha detaylı bilgi için “Materyal ve Yöntem” kısmına bakınız). Tüm-genom homozigot soy üretme teknikleriyle ilgili diğer detaylı bilgiler, atıf yapılan bu kaynaklarda bulunabilir (Collins, 2012; Orias, 2012).

1.4. *T. thermophila*’da Rekombinant Protein Üretimi

Tetrahymena’nın biyofarmasötik üretimde kullanımı modern biyoteknoloji açısından genetik manipülasyon tekniklerinin kolayca uygulanabilir olması ile yüksek bir potansiyele sahiptir. Ayrıca *Tetrahymena*’nın görece büyük boyutları, nükleer dimorfizm kaynaklı kendilerine has genetik özellikleri ve basit mikrobiyal kültürizasyon yöntemleriyle yüksek hücre sayılarına ulaşabilmesi gibi avantajlar sunmaktadır. Örneğin DNA kontraktının homolog rekombinasyon yoluyla genoma entegre edilmesi sonucu oluşturulan transformantların pozitif seçilimi için sikloheksamid, paromomisin, blastisidin ve puromisin gibi antibiyotik belirteçleri geliştirilmiş (Brown vd., 1999; Gaertig vd., 1994; Iwamoto vd., 2014; Kahn vd., 1993), paramomisin ve sikloheksamid direnç seçilimi otonom olarak kopyalanan vektörlerin transformasyonu için de kullanılmıştır (Sweeney ve Yao, 1989; Yao ve Yao, 1991). Ayrıca genetik manipülasyonu kolaylaştıran indüklenip baskılanabilir promotorlar (Boldrin vd., 2006; Gorovsky vd., 2001; Hartmann vd., 2006; Shang vd., 2002;

Yu vd., 2012), hücre dışına salgılatma dizileri (M. Hartmann vd., 2002; Weide vd., 2006) ve çeşitli rekombinant üretim vektörleri de mevcuttur (Çalışeki, vd. 2021; Üstüntanır Dede ve Arslanyolu 2020; Weide vd. 2007).

T. thermophila, insan proteinleri de dahil tıbbi öneme sahip pek çok rekombinant proteinin üretimi için canlı üretim sistemi olarak kullanılmış ve elde edilen proteinlerin etkili bir aktivite göstermesini sağlayacak katlanmaları ve PTM'leri tamamladığı gösterilmiştir. Tablo 1.4'de özetlenen rekombinant protein üretim çalışmalarında anti-CD20 monoklonal antikoru için 20 mg/L/gün olarak belirtilen üretim veriminin, pandemik ve/veya mevsimsel gribe karşı aşı adayları viral protein antijenlerinin üretimi sırasında 30 mg/L/gün seviyelerine çıktığı raporlanmıştır (Callow vd., 2016; Meyer & Schmidhalter, 2014, ss. 311-313). Fakat özellikle CHO hücre hatlarında bu miktar beslemesiz biyoreaktör kültüründe 0,1-1 g/L/gün seviyesindeyken beslemeli kültürde ise 1-10 g/L/gün seviyesine çıkmaktadır (Tihanyi & Nyitray, 2020). Bu durum *T. thermophila*'nın CHO gibi üretim konakçılarıyla ticari üretim miktarı açısından kıyaslanabilir olması için geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Tetrahymena'nın sekretomunda fosfolipidleri parçalayan fosfolipazların (Alam vd., 1993; Arai vd., 1985; Guberman vd., 1999), oligosakkaritlerin glisid bağlarını parçalayan glikosidazların (Banno & Nozawa, 1985), fosfatların uzaklaştırılmasını katalizleyen fosfatazların (Rasmussen vd., 1992) ve özellikle proteinlerin peptid bağlarını parçalayan proteazların (Banno vd., 1983; Karrer vd., 1993; Kiy & Tiedtke, 1992b; Straus vd., 1992) varlığı literatürde raporlanmıştır. Kiy ve Tiedtke (1992b) yürüttüğü bir biyoreaktör kültür çalışmasında hücre sayısı ile salgılanan toplam proteaz aktivitesi arasında zamana bağlı artan bir ilişki bulmuştur (Kiy & Tiedtke, 1992b). MAK genomu sekanslaması yapılan *T. thermophila* SB210 ırkının yaklaşık 27.000 protein kodlayan geninden 480 tanesinin (%1,8) çeşitli proteazları kodladığı, proteaz kodlayan gen sayısının genoma oranının diğer canlılarla karşılaştırıldığında görece az olmasına karşın türe spesifik gen duplikasyonlarının olduğu en geniş kümenin bu proteazlarda bulunduğunu raporlanmıştır (Eisen vd., 2006). *T. thermophila*'nın proteazlar da dahil sekretoma salgıladığı protein içeriğinin suş ve besin koşuluna (zengin besiyeri veya açlık durumu) bağlı değişiklik gösterdiği raporlanmış (Madinger vd., 2010), bir diğer çalışmada ise *Tetrahymena* sekretom proteazları arasında sistein proteazların oldukça çoğunlukta olduğu belirlenerek en baskın altı proteaz kimliklendirilmiştir (Herrmann vd., 2006). Tüm bu bilgiler dikkate alındığında kültür

Tablo 1.1. *T. thermophila*'da rekombinant üretimi sınanmış proteinler

Protein	Potansiyel Uygulama Alanı	Referans
İnsan alkalın fosfataz enzimi	Akut böbrek hasarı ve inflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisi	(Aldag vd., 2011)
İnsan DNaz I enzimi	Kistik fibroz semptomlarının tedavisi için kullanılan enzim	(Weide vd., 2006)
<i>Plasmodium falciparum</i> GPI-çapalı sirkumsporozoit (CS) proteini	Sıtmaya karşı aşı adayı	(Peterson vd., 2002)
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i> yüzey i-antijeni	Tatlı su balıklarının beyaz benek hastalığına karşı veteriner aşısı	(Gaertig vd., 1999)
İnsan serum albumini	Travmada kan hacmini eski haline getiren insan kan plazma proteini	(Kiy & Rüsing, 2005)
H5N1 viral hemaglutinin	Pandemik gribe karşı aşı adayı	(Jayaram vd., 2010)
<i>Plasmodium falciparum</i> 'dan sentetik MSP-1 blok 2 hibrit yüzey antijeni	Sıtmaya karşı aşı adayı	(Cowan vd., 2014)
Anti-CD20 monoklonal antikoru (rituksimab)	Kanser tedavisi için monoklonal antikoru	(Calow vd., 2016)
Aminoglikozit 3-fosfotransferaz	Antibiyotik direnci belirteci	(Kahn vd., 1993)
H9N2 alt-tipi influenza antijeni NS1 (non-structural 1)	Kuş gribine karşı veteriner aşısı	(Zhu vd., 2018)
<i>Plasmodium falciparum</i> merozoit yüzey antijeni C-ucu	Sıtmaya karşı bir aşı adayının alt birimi	(Weide vd., 2007)
Geliştirilmiş cyan floresan proteini (eCFP)	Haberci (reporter) protein	(Yu vd., 2012)
H1N1 viral hemaglutinin	Mevsimsel grip aşısı adayı	(M. Hartmann vd., 2009; Sachse, 2006)
H3N2 viral hemaglutinin	Mevsimsel grip aşısı adayı	(Sachse, 2006)
Anti-insan transferrin antikoru	İnhibitör monoklonal antikor	(Collins, 2011)
Super folder yeşil floresan protein	Haberci (reporter) protein	(Yılmaz & Arslanyolu, 2015)

ortamına salgılatılarak üretimi sağlanan heterolog proteinlerin, organizmanın endojen sekretom proteazları tarafından degrade edildiği hipotezi oluşmaktadır.

1.5. Hipotez, Amaç ve Özgün Değer

Sekretomal proteazlarca zengin olan *T. thermophila*'da ticari öneme sahip proteinlerin üretim verimliliğinin düşüklüğü, kültür ortamına salgılanan proteazlar tarafından parçalanmalarından kaynaklanıyor olması, bu tez çalışmasının test edeceği hipotez olarak öne sürülmüştür. Tez çalışmasının amacı ise sekretomal proteolizden sorumlu proteaz kodlayıcı genlerden en az bir tanesinin doğal ırk SB210 MAK genomundan silinmesi ile besiyeri ortamında (spent culture medium, SCM) görülen proteolitik aktivite düşüşünün kazein gibi substralara karşı tanımlanmasıdır. Hipotezin test edilmesi için amaç doğrultusunda 3 adet deneysel hedef aşağıda tanımlanmıştır;

1) Literatür incelemesi, biyoinformatik araştırmalar ile vejetatif büyüme sırasında kültür ortamına extraselüler olarak salgılanan heterolog proteinlerin parçalanmasında görev alabileceği öngörülen 5 proteaz geninin belirlenmesi,

2) Belirlenen proteaz genlerinin homolog rekombinasyon veya coDel yaklaşımlarıyla SB210 ırkı makroçekirdek genomundan silinmesi (KO) ile mutant ırkların üretilmesi, DNA ve RNA seviyesinde mutantların karakterizasyonlarının yapılması,

3) Flask ortamında üretilecek KO mutant ırklarının zengin besiyeri içeren ortamda büyütülerek kültür ortamına salgıladığı proteaz aktivitesinin kontrol hücreleri ile karşılaştırmalı belirlenerek tanımlanması,

Bu tez çalışması öncesi literatürde proteaz yoksunu *Tetrahymena* ırklarının endüstriyel amaç ile oluşturulmamış olması, tezin özgün değerini oluşturmaktadır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

Deney protokolleri ve primer dizileri tezin “EKLER” bölümünde detaylı bir şekilde verilmiştir. Kullanılan cihazlar, kitler ve enzimler (marka, sipariş numarası) deney ve/veya protokolün ilgili bölümünde açıklanmıştır.

2.1. Flask Ortamında Büyütülen Doğal Suş SB210’un Sekretomal Proteolitik Aktivitesinin Belirlenmesi

T. thermophila SB210 suşunun besiyeri ortamına salgıladığı proteazlardan kaynaklı sekretomal proteolitik aktivitesi, ticari bir protein ilaç olan Ritüksimab (Rtm; MabThera) ve insan serum albüminin (HSA; EPORON marka eritropoietin şırıngalarına raf ömrünü uzatmak amacıyla eklenmektedir) substrat olarak kullanılmasıyla gösterilmiştir. NEFF zengin besiyeri (50 ml, %0.25 proteoz pepton, %0.25 maya özütü, %0,5 glikoz, 33.3 μ M FeCl₃) içeren flaska ~20.000 hücre/ml olacak şekilde *T. thermophila* SB210 ırkı ekilmiş ve 30 °C’de çalkalama olmaksızın inkübasyona (Genhart, Thermo Shaker THO 220) bırakılmıştır. İnokülasyondan 3 gün sonra logaritmik faz sekretomu, ertesi gün ise durağan faz sekretomu, 1000g’de 3 dk santrifüjlenerek (Beckman Coulter Allegra 25R) hücrelerinden arındırılmıştır. Sekretomun içerdiği proteazlarının aktivitesi için 37 μ g HSA substratı, enzim olarak ise 13,25 μ l konsantre edilmemiş logaritmik veya durağan faz sekretomu karıştırılıp 30 °C’de 30 dk, 1,5 saat, 3 saat ve 6 saat reaksiyona alınmıştır. Her reaksiyon için ayrıca 10 μ M sistein proteaz inhibitörü E-64 içeren bir reaksiyon tüpü daha hazırlanmıştır. Belirtilen reaksiyon süreleri sonunda örnekler EK-7’de detaylı olarak açıklanan glisin-SDS-PAGE protokolüne göre %15’lik yürütme ve %5’lik yükleme jelinde koşturulmuş ve coomassie boyamasına alınmıştır. Gece boyu distile su içinde arkaplan boyaması uzaklaştırılarak (destaining) jeller BioRad Gel-Doc EZ (BioRAD, #1708270) cihazında görüntülenmiştir.

Rtm substratının proteolitik degradasyonunun gözlenmesi için de benzer bir senaryo uygulanmış, ancak sadece konsantre edilmemiş durağan faz sekretomu ile reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Ayrıca reaksiyon süresi 1, 3, 6, 12, 24 ve 48 saat olacak şekilde genişletilmiştir. Her muamele süresi için 3 μ g Rtm substrat proteini ve 13,5 μ l sekretom örneği içeren bir çift deney tüpünden birine 10 μ M E-64 inhibitörü, diğerine ise eşit hacimde taze NEFF eklenmiştir. Belirtilen muamele zamanı sonrasında örnekler denatüre edilmeden

(negatif kontrol hariç) EK-7’de detaylı olarak açıklanan glisin-SDS-PAGE protokolüne göre %12’lik yürütme ve %5’lik yükleme jelinde koşturulmuş ve coomassie boyamasına alınmıştır. Sonrasında gece boyu arkaplan boyaması uzaklaştırılmış ve görüntülenmiştir.

2.2. Silinmesi Hedeflenen *T. thermophila* Sekretom Proteazlarının Belirlenmesi ve Biyoinformatik Yaklaşımlarla Tanımlanması

T. thermophila’da ekstraselüler ifade edilen proteaz genlerini belirlemek ve bu genler arasında KO için bir öncelik sırası oluşturmak için aşağıda belirtilen yöntem izlenmiştir:

- 1) Sekretom proteazları kaynaklı proteolitik degradasyon bu proteazları kodlayan genlerin ekspresyon seviyesi ile doğrusal ilişkili varsayımı, oldukça olası bir durumdur. Yani daha yüksek seviyede ifade edilen gen daha fazla proteaz enzimi üreteceği için sekretomun proteaz aktivitesine daha fazla katkıda bulunmalıdır. Bu nedenle Madinger ve arkadaşlarının (2010) zengin besiyeri sekretomunda belirlediği sekretomal proteaz genleri, Tetrahymena Genom Veritabanından (TGD) indirilmiş (Stover, 2006) ve vejetatif evrenin düşük, orta ve yüksek hücre yoğunluklarındaki (Ll, Lm, Lh) mRNA ifade seviyeleri ortalamalarına göre en yüksekten düşüğe doğru sıralanmıştır (EK-1).
- 2) Herrmann ve arkadaşları (2006) *T. thermophila* ekstraselüler ortamına oldukça fazla salgılandığını saptadığı 6 farklı sistein proteazı TtCyp1-6 olarak isimlendirmiş, bu peptidazların da mRNA ifade seviyeleri EK-1’deki sıralama tablosuna eklenmiştir.
- 3) Miao ve arkadaşları (2009) microarray analizi ile belirledikleri sürekli aktif sistein proteaz genlerini ek tablo olarak yayınlamıştır. Bu listedeki proteazlar TGD’den indirilmiş ve salgılatma sinyal peptidi taşıma olasılığı %50’den yüksek olan proteazlar da EK-1’deki tabloya eklenmiştir.
- 4) Birden fazla literatür kaynağında raporlanan proteaz genlerine öncelik verilerek mRNA ifade seviyesi en yüksek olan 5 sekretom proteaz geni KO için seçilmiş ve Tablo 2.1’de bilgileri verilmiştir.

Tablo 2.1. *T. thermophila* SB210 ırkının MAK genomundan KO edilmesi için belirlenen sekretom proteazlarının genel bilgileri

Standart isim	mRNA ifade seviyesi*	ER sinyal dizisi	Aminoasit sayısı	Büyüklik (kDa)	TTHERM	Referans
CTH34	59088	Var	375	41,5	00628610	(Miao vd., 2009)
CYP6	55563	Var	331	36,4	00760310	(Herrmann vd., 2006; Madinger vd., 2010; Miao vd., 2009)
CTH40	55479	Var	341	37,1	00641150	(Madinger vd., 2010; Miao vd., 2009)
CTH90	33857	Var	324	35,9	00161130	(Madinger vd., 2010; Miao vd., 2009)
CTH115	31189	Var	324	36,0	00683060	(Herrmann vd., 2006; Madinger vd., 2010)

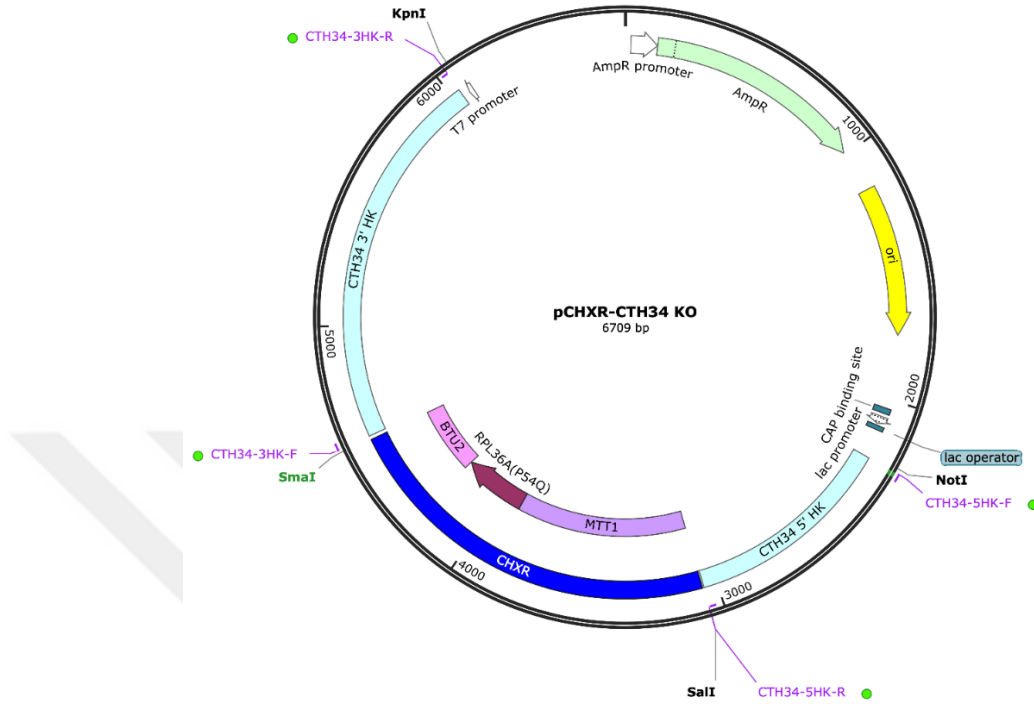
Proteaz genlerinin TTHERM numaraları, TGD veritabanında verilen kimlik numaralarıdır. CTH[numara] ise TGD veritabanında verilmiş olan *T.thermophila* gen isimlendirme kurallarına göre verilen standart gen ismidir (CTH: katepsin) ve bu tez kapsamında genleri ifade ederken standart isimler kullanılmıştır. TTHERM_00760310 geni için veritabanında herhangi bir standart isim verilmediğinden Herrmann ve ark. yayınında (Herrmann vd., 2006) verilen isme yakın bir isimlendirme yapılmıştır. İlgili proteazlara ait gen dizilerine TGD veritabanı ya da NCBI (National Center for Biotechnology Information) gen veritabanından ulaşılmıştır.

EK-1’de sıralanan literatürce saptanmış sekretom proteazlarının sinyal peptidi bulundurma olasılıkları SignalP-5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk>) tahmin programı yardımıyla belirlenmiş ve olasılık $\geq 50\%$ olanlar “sinyal peptidi içerir” olarak değerlendirilmiştir (Almagro Armenteros vd., 2019). Ayrıca MUSCLE (Multiple Sequence Alignment, <https://www.ebi.ac.uk>) programı kullanılarak bu proteazlar arasında hem nükleotid hem de aminoasit dizisi bakımından benzerlik analizi yapılmıştır (Madeira vd., 2019). Son olarak silinmesi hedeflenen proteaz genlerinin korunmuş motif ve benzerliğe dayalı klan, aile ve alt-ailelerinin belirlenebilmesi için aminoasit dizileri Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org>) veritabanında blastlanmış, seçilen *Tetrahymena* proteazlarının tanımlanması için korunmuş motif benzerliği ve örtüşme yüzdesi en yüksek olan eşleşmeler seçilmiştir (Waterhouse vd., 2018).

2.3. Homolog Rekombinasyon Yoluyla Gen Silme

2.3.1. Moleküler klonlama ve KO vektörünün hazırlanması

CTH34'ün *Tetrahymena* MAK genomundan silinmesi homolog rekombinasyon KO yöntemiyle yapılmıştır. Öncelikle KO vektörüne yapılandırmak üzere *CTH34* geninin upstream ve downstream bölgesinden homoloji kolları (HK) (sırasıyla 3' homoloji kolu ve 5' homoloji kolu) doğal suş SB210 genomik DNA'sı (gDNA) kalıp olarak kullanılan PZR ile üretilmiştir (EK-3.1). 5' HK üreten primerlerin 5' uçlarında NotI ve SalI, 3' HK dizisini üreten primerlerin ucunda ise SmaI ve KpnI restriksiyon enzim tanıma dizileri bulunmaktadır (EK-8). pCHXR-KO vektörü ile 3'HK fragmenti SmaI ve KpnI ile kesilip CHX direnç geninin hemen ardına gelecek şekilde ligasyon ile klonlanmıştır (EK-4.1) (Şekil 2.1). Ligasyon ürünü vektör kompetent *E. coli* DH5α hücrelerine (Invitrogen™ Subcloning Efficiency™ DH5α Competent Cells #18265017) ısı şoku ile transforme edilmiş ve koloni PZR ile pCHXR-5'HA vektörünü içeren bir koloniden, plazmit izolasyonu yapılmıştır (Macherey-Nagel, #740588.50). Elde edilen pCHXR-5'HA vektörü NotI ve SalI ile ikinci kez kesilmiş ve uçları aynı enzimle traşlanmış 5' HK, CHX direnç geninin hemen önüne klonlanmıştır. Pozitif transformant bir *E. coli* kolonisinden plazmit izolasyonu yapılmış ve elde edilen vektör pCHXR-CTH34KO olarak isimlendirilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Makroçekirdek homolog rekombinasyon KO vektörü olan pCHXR-CTH34KO'nun şematik yapısı. *Tetrahymena*'da homolog rekombinasyona dayalı somatik KO vektörü pCHXR-CTH34KO, CTH34 proteaz geninin KO'u için modifiye edilmiştir. AmpR promoter, AmpR, ori ve lac operan dizileri, vektörün *E. coli*'de çoğalmasını ve vektörü taşıyan kolonilerin amfisilin direncine dayalı seçimini sağlayan bluescript backbone dizisini oluşturmaktadır. Kadmiyumla indüklenen MTT1 promotorunun kontrolündeki mutant RPL36A (ribozomal protein L36A mutasyonu) CHX direnci sağlamakta ve BTU2 transkripsiyon terminasyon dizisiye beraber sikloheksamid direnç genini (CHXR) oluşturmaktadır. NotI ve SalI restriksiyon enzimleri CTH34 geninin upstream bölgesinden üretilen 815 bp 5' HK'yi, SmaI ve KpnI ise aynı genin downstream bölgesinden üretilen 1469 bp 3' HK'yi klonlamak için kullanılmıştır. Yeşil daireler ilgili HK'ların PZR amplifikasyonunu sağlayan ileri (F) ve geri (R) primerleri belirtmektedir.

2.3.2. *Tetrahymena* hücrelerinin kültürizasyonu, transformasyonu ve seçilimi

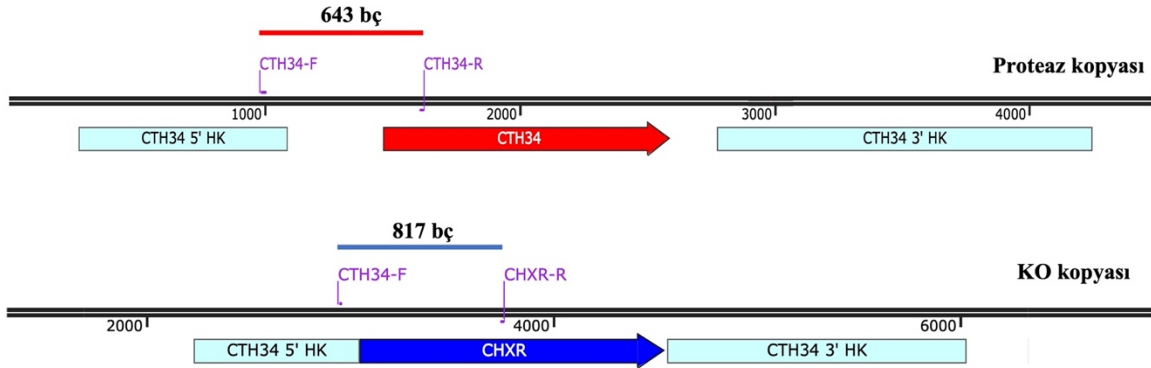
CTH34 geninin KO'u *T. thermophila* SB210 (TSC_SD00703, gal1-1/gal1-1 [GAL1/GAL1; gal-s, VI]) suşunda uygulanmıştır (<https://tetrahymena.vet.cornell.edu>). Bu suşun seçilmesinin ilk nedeni MAK genom sekanslamasının tamamlanması ile genom verisinin mevcut olması, ikinci nedeni ise araştırılan diğer diğer iki suşa kıyasla zengin besiyerinde bulunan sekretom proteaz sayısının görece daha az olmasıdır (Madinger vd., 2010). Böylece KO edilen genin sekretomal proteolize katkısının daha kolay gözlemlenebileceği düşünülmüştür. KO vektörü transformasyonu öncesi hücreler 50 ml NEFF zengin besiyeri içeren flaskta 30 °C'de çalkalama olmaksızın 1 milyon hücre/ml yoğunluğa gelene kadar büyütülmüştür. Sonrasında santrifüjleme yoluyla (1000g, 3dk) hücreler çöktürülüp

süpernatant boşaltılmış ve üzerine ~50 ml açlık tamponu (50 mM tris-HCl pH 7,4) eklenmiştir. Hücreler açlık tamponunda bu şekilde 2 gün inkübe edilmiştir. Oluşturulan konstraktın SB210 hücrelerine transformasyonu biyolistik silah (PDS-1000/He Particle Delivery System, Biorad, 165-2257) ile literatürde uygulanan rutin protokole göre gerçekleştirilmiştir (Cassidy-Hanley vd., 1997) (EK-5.1). Transformasyondan hemen sonra taze NEFF besiyeri eklenen transformant hücrelere 3 saat sonra 4,5 µg/ml CdCl₂ eklenmiş böylece CHX direnç geni ifadesi tetiklenmiştir. 24 saat sonra bu kültürün 3 ml'si 6-kuyulu tabağa alınarak 15 µg/ml CHX antibiyotigi (Serva, 15212) eklenerek inkübasyona alınmıştır. Antibiyotikli hücre kültürü her bir kuyusuna 100 µl gelecek şekilde 96-kuyulu tabağa dağıtılmıştır (toplam 24 kuyu). Takip eden 3 gün boyunca kuyular kontrol edilmiş ve canlı kalarak-çoğalan transformant kolonilere yaklaşık her 2 günde bir artan CHX ve azalan CdCl₂ konsantrasyonlarında besiyeri ile periyodik pasajlama yapılmıştır. Antibiyotik baskısıyla yönlendirilen fenotipik ayrışma (yaklaşık 20 gün veya 100 bölünme) sonucu MAK genomunda hiç CHX direnç gen kaseti taşımayan (doğal alel bakımından sabitlenmiş) hücreler CHX baskısında ölmekte, sadece direnç genini heteroploid ya da homoploid taşıyan hücreler hayatta kalmaktadır (Bölüm 1.3). Bu nedenle MAK genomunda *CHXR* geni bakımından sabitlenen hücreleri heteroploidlerden ayırabilmek için 240 µg/ml CHX ve 0,05 µg/ml kadmium baskısında çoğalan kolonilerden tek hücre izolasyonu yapılarak “tek hücre klon hatları” oluşturulmuştur. 45ploid MAK genomunda proteaz geni kopyalarının tümü silinen KO tek hücre klonlarının belirlenebilmesi için seçilen klonlardan genomik DNA izolasyonu yapılmıştır (EK- 2).

2.3.3. Tek hücre klonlarının KO karakterizasyonu

Elde edilen genomik DNA'lar Şekil 2.2'de deneysel tasarımı şematize edilen 3 primerli PZR analizi için kalıp olarak kullanılmıştır. Üç primerli PZR, poliploid MAK'taki *CHXR* kopya sayısının *CTH34* kopya sayısına oranını göstermesi için ileri primerin 5'HK'dan, geri primerlerden birinin *CTH34* ve diğerinin ise *CHXR* geni içinden tasarlandığı bir KO kontrol yöntemi kullanılmıştır (EK- 3.2). MAK'ta *CTH34* lokusunun bulunduğu minikromozom kopyalarında hangi varyant daha yüksek sayıdaysa o varyanttan üretilen PZR ürününün agaroz jelde daha yoğun bir bant vermesi prensibine dayanmaktadır. Böylece PZR sonucunda

817 bç büyüklüğünde olan *CHXR* ürünü ile 643 bç büyüklüğünde olan *CTH34* ürün bant yoğunlukları karşılaştırılıp MAK'taki kopya sayıları hakkında değerlendirme yapılabilmektedir. Bu amaçla 240 µg/ml CHX baskısı sonucunda klonların genomik DNA'ları kontrol edilmiş ve iki PZR ürününün de bant yoğunluklarının eşit olduğu görülmesi üzerine artan antibiyotik baskısıyla pasajlama işlemine 720 µg/ml CHX konsantrasyonuna kadar devam edilmiştir. Tekrar genomik DNA izolasyonu yapılan tek hücre klonları 3 primerli PZR analizine alınmış ve tüm klonlarda *CTH34* bant yoğunluğunun hala belirgin derecede yüksek olduğu görülmüştür. Bu nedenle CHX konsantrasyonu hücrelerin dayanabildiği maksimum konsantrasyon olan 1080 µg/ml'ye kadar arttırılmış, bu süreçte hücre kültürleri oldukça yavaş proliferasyon gösterdiği için pasajlanma süresi 1 haftaya kadar çıkmıştır. Son CHX konsantrasyonundan (1080 µg/ml) elde edilen klonlardan izole edilen genomik DNA'lar üçüncü kez 3 primerli PZR ile kontrol edilmiştir. MAK genomunda doğal alelin kopya sayısının en az görüldüğü iki *CTH34KO* klon hattı sonraki çalışmalarda kullanılmıştır. *CTH34* gen ifadesinin analizi için sonraki adımda *CTH34KO* hatlarından RNA izolasyonu



Şekil 2.2. Poliploid MAK genomunda *CTH34* geni kopya sayısı ile *CHXR* direnç geni kopya sayısını karşılaştırmak için tasarlanan 3 primerli PZR çalışma mekanizması. Siyah çift çizgiyle temsil edilen DNA zinciri üzerinde *CTH34* proteaz geni (kırmızı), *pCHXR-CTH34KO* vektörüne klonlanan homoloji kolları (açık mavi) ve *CHXR* antibiyotik direnç geni (mavi) gösterilmiştir. Hem genomda hem de vektörde ortak olan 5' HK'ya spesifik tasarlanan ileri primerin (*CTH34-F*), *CTH34* genine spesifik tasarlanan geri primer (*CTH34-R*) ile verdiği PZR ürünü (643 bç) kırmızı çizgiyle, direnç genine spesifik tasarlanan geri primer (*CHXR-R*) ile verdiği PZR ürünü (817 bç) mavi çizgiyle belirtilmiştir. 3 primerin de dahil edildiği PZR sonucu hangi ürün jelde daha yoğun bant görüntüsü oluşturmuşsa kalıp olarak kullanılan gDNA'da o genin (KO kopyası ya da proteaz kopyası) kopya sayısı daha fazla demektir.

yapılmış (NEB, #T2010), izole edilen RNA'ların 2000 ng'ından sentezlenen komplementer DNA'lar (cDNA) (Thermo Scientific, #K1621) PZR için kalıp olarak kullanılmıştır (EK- 6).

Seçilen KO hatların MAK genomunda *CHXR* direnç geni bakımından homoploid olup olmadığı incelenmiştir. Bunu için H1 ve H3 tek hücre KO klon hat hücreleri CHX antibiyotik baskısı olmadan 4 hafta boyunca 48-kuyulu tabakta 2-3 günde bir taze NEFF besiyerine pasajlanmıştır (10 µl hücre, 500 µl besiyeri). Bu süre boyunca H1 ve H3 KO mutant hat hücrelerinde az sayıdaki *CTH34* alel kopyası (1-5 kopya) kalmış ise artık antibiyotik baskısı kalkmış olduğu için alt pasajlarda doğal *CTH34* geni lehine ilerleyen fenotipik ayrışma sonucu proteaz aleli artmış hücreler oluşacak, böylece popülasyonda *CTH34* proteaz aleli tekrar ~45 kopya seviyesilerine çıkması söz konusu olacaktır. Pasajlama esnasında 1 aylık sürenin her haftası alınan hücre örneklerinin genomik DNA'sı 3 primerli PZR ile MAK *CHXR/CTH34* kopya miktarları bakımından analiz edilerek karşılaştırılmıştır.

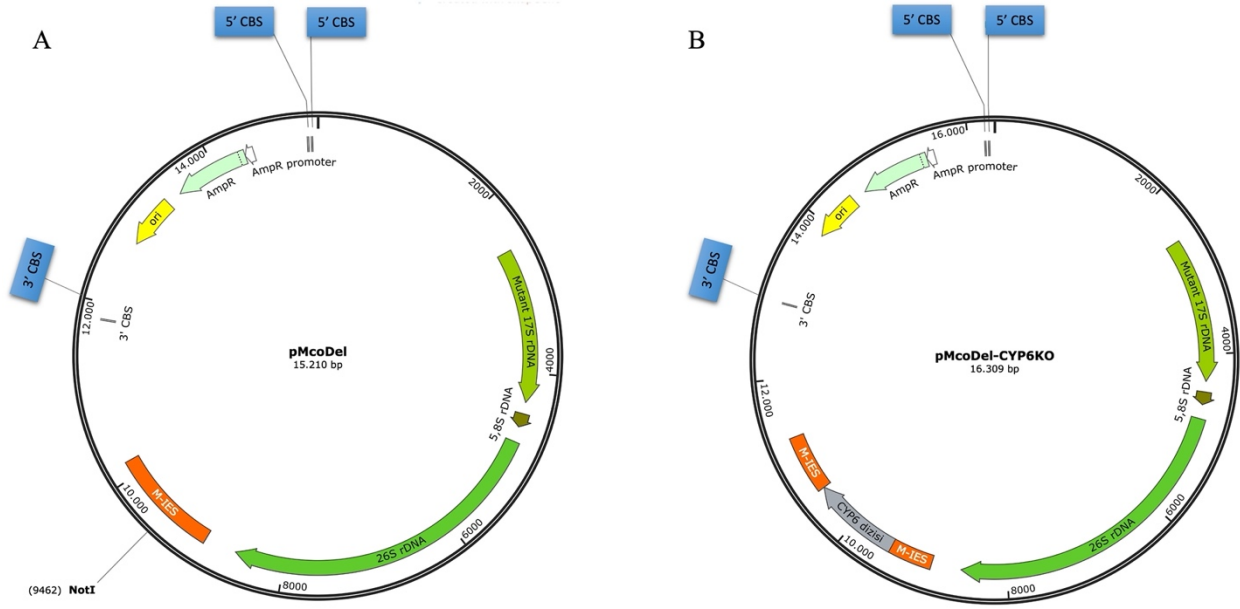
Son olarak, *Tetrahymena*'da rutin uygulanan sıvı nitrojende hücre dondurma sonrasında KO hatlar tekrar canlandırılırken CHX baskısının gerekliliği araştırılmıştır. Bunun için CTH34KO hatlardan birer tüp hücre canlandırılmış (EK- 7.2), canlandırma işleminden 4 gün sonra kültürlerden 500 µl alınıp her biri 5 ml NEFF içeren 12-kuyulu tabağa 2 tekrarlı olarak inoküle edilmiştir. Tekrarlardan birine 240 µg/ml konsantrasyonda CHX ve 0.05 µg/ml CdCl₂ eklenmiş diğerlerine antibiyotik eklemesi yapılmamıştır. İnokülasyondan 4 gün sonra CHX içermeyen kuyulardan 5 gün sonra ise CHX'li kuyulardan genomik DNA izolasyonu yapılmış ve 3 primerli PZR'de kalıp olarak kullanılmasıyla canlanma sırasında eklenen antibiyotik baskısının MAK *CHXR/CTH34* kopya miktarlarına etkisi belirlenmiştir.

2.4. Co-Delesyon Yoluyla Gen Silme

2.4.1. Moleküler klonlama ile KO vektörünün hazırlanması

CTH34 proteaz geninin homolog rekombinasyonla MAK genomundan silinmesi beklenenden daha uzun sürdüğü için kalan 4 proteaz geninin KO'u coDel yöntemiyle (Bölüm 1.3) gerçekleştirilmiştir. Her bir hedef gen için coDel vektörü hazırlanırken öncelikle PZR yöntemiyle genlerin içinden ~800-1000 bp büyüklüğünde DNA hedef dizileri üretilmiştir (EK- 3.3). Gen içinden üretilecek bu dizilere spesifik primer çiftlerinin 5' uçlarına, üretilen sekansların coDel vektörüne (pMcoDel) entegrasyonu için gerekli Gibson assembly

homoloji dizileri eklenmiş (Gibson vd., 2009) (EK- 8) ve NotI ile IES bölgesi kesilerek açılan pMcoDel vektörüne her bir gen dizisi Gibson assembly yöntemiyle entegre edilmiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. pMcoDel coDel KO vektörünün şematik yapısı ve gen dizi parçalarının klonlanma konumu. Vektör rDNA mini kromozom formunda olup 17S, 26S ve 5,8S rDNA genleri ile KO hedef dizinin klonlandığı M-IES (tip-A IES) dizisini içermektedir. 17S rDNA genindeki bir baz mutasyonu (A → G) pozitif transformantların paramomisin direnci göstermesine neden olmaktadır. Vektörün *E. coli*'ye transformasyonu ve vektör amplifikasyonu için gerekli elementler (AmpR promotörü, AmpR direnç geni, ori) CBS dizileri arasında bulunmaktadır. CBS'ler vektörün transformasyon sonrasında bu bölgelerden tanınip kırılarak lineer hale gelmesini ve telomer eklenmesiyle rDNA minikromozom benzeri bir yapı kazanmasını sağlamaktadır. A) pMcoDel vektörünün herhangi bir eklenti (insert) olmaksızın yapısını göstermekte olup IES dizisi ortasında NotI tanıma bölgesi içermektedir. B) Hedef gen dizisi NotI kesim bölgesinden Gibson assembly yöntemiyle vektöre entegre edilmekte ve böylece IES dizisi arasına yerleşmektedir (CYP6 hedef dizisi ile temsil edilmektedir).

Tablo 2.2. coDel yöntemiyle *Tetrahymena* MAK genomundan silinmesi hedeflenen proteaz genleri. Gen büyüklüğü, KO edilecek genin nükleotid sayısını verirken hedef dizi büyüklüğü, pMcoDel vektörüne klonlanmak üzere üretilen hedef sekansın nükleotid sayısını belirtmektedir.

KO edilen gen	Hedef dizi büyüklüğü (bç)	Gen büyüklüğü (bç)	Vektör ismi
<i>CYP6</i>	1103	996	pMcoDel-CYP6KO
<i>CTH40</i>	995	1026	pMcoDel-CTH40KO
<i>CTH90</i>	821	1419	pMcoDel-CTH90KO
<i>CTH115</i>	819	975	pMcoDel-CTH115KO

2.4.2. *T. thermophila* SB210 suşunun star A*III suşu ile çaprazlanması

Tetrahymena'da homolog rekombinasyon KO yöntemine göre hedef genin coDel yaklaşımıyla silinmesi daha kısa sürede gerçekleşmekte fakat IES eliminasyonunun konjugasyon sırasında olması, yöntemin konjugatif hücre hazırlama ve uygulama sürecini de içermesini gerektirmektedir. Bu durum ise uygulanabilirlik açısından daha fazla organizmal uzmanlık gerektiği anlamına gelmektedir. Tetrahymena Stok Merkezinden satın alınan SB210 suşu VI çiftleşme tipine sahiptir. Bu nedenle ancak farklı çiftleşme tiplerine sahip B2086 ve CU428 gibi farklı bir suş ile konjugasyona alınabilmektedir. Fakat Madinger ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada zengin besiyeri ortamına salınan proteinlerden oluşan sekretom içeriği proteazlar da dahil suşa bağlı farklılıklar içermektedir (Madinger vd., 2010). Bu nedenle coDel ile elde edilen KO mutant klonlarının hem SB210 suşundan türetilen homolog rekombinasyon KO mutant CTH34-KO klonu ile hem de pozitif kontrol olarak kullanılacak SB210 suşu ile karşılaştırmalı final proteolitik aktivite karakterizasyonların yapılabilmesi için SB210 suşundan farklı çiftleşme tipine sahip fakat tüm genomu homozigot (alelik genetik yapısı aynı olan) kardeş klonların üretilmesine ihtiyaç vardır. Bu amaçla SB210 ırkı ile STAR A*III hattı çaprazlanmıştır. Çiftleşme tipinin belirlenmesi epigenetik regülasyon ile fenotipik çeşitlenmeye bağlı olduğu için (A. M. Elliott & Hayes, 1953; Nanney & Caughey, 1953) bu çaprazlama sonucu oluşan kardeş karyonidler aynı genotipe sahipken eşeysel olgunluğa ulaştıklarında farklı çiftleşme tipleri görülebilmektedir.

SB210 ve A*III (TSC_SD00015) hücre hatları 1'er ml NEFF içeren 24-kuyulu tabağa ekilip 1 gün 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün her iki kültür de steril eppendorf tüplerine transfer edilip santrifüjlendikten (3000g, 3 dk) sonra süpernatant boşaltılıp 1 ml açlık tamponu eklenmiş ve hücreler tekrar kuyulara transfer edilmiştir. 2 gün boyunca 30 °C'de açlıkta bırakılan SB210 ve A*III hücre kültürleri her birinden 150 µl alınarak başka bir kuyuda karıştırılıp aynı koşullarda konjugasyona alınmıştır. Hücreler karıştırıldıktan ~4,5 saat sonra çift oluşturan hücreler gözlenmiş ve 8 çift izole edilmiştir (1. tur çiftleri). İzole edilen çiftler 1. tur sonrasında birbirinden ayrılmış ve bölünmeleri için NEFF besiyerine (200 µl) alınmış, 2 gün 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha önce yapıldığı gibi tekrar açlığa alınan hücrelerin her 4 saate bir gözlenerek çift oluşumu sağlanmıştır (2. tur) ve eşleşen

hücrelerden yaklaşık 8 saat sonra her 1. tur çiftinden 2-4 çift olmak üzere çiftleşen hücre izolasyonu yapılmıştır (2. tur çiftleri). İzole çiftlere 200 µl NEFF besiyeri eklenmiş eşeyssel olgunluğa ulaşana kadar (~2-3 hafta) periyodik olarak günlük taze besiyerine pasajlanmıştır. Sonrasında her 2. tur çiftten türetilen kardeşlerden 2-4 tek hücre izolasyonu yapılmış, izole edilen hücreler 96-kuyulu tabakta yeterince çoğaltıldıktan sonra her bir klon kültür 5 ml NEFF içeren cam tüplere stoklanmıştır.

Elde edilen tek hücre klonları farklı çiftleşme tiplerine sahip olduğundan konjugasyona girebilen (ergenliğe ulaşmış) klonların belirlenmesi için her bir klon 1 ml NEFF içeren 24-kuyulu tabağa ekilmiş ve 2 gün aynı koşullarda bölünmeye bırakılmıştır. Çoğalan tek hücre klonları açlık tamponuna alınmış ve 2 gün de açlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında hücreler kendileri hariç diğer kardeş hücre kültürleriyle 96-kuyulu tabakta eşit hacimlerde karıştırılmış ve 1 ila 2 saate bir konjugasyon yapıp yapmadıkları 4 ile 10. saatler arası gözlenmiştir. 10. saatin sonunda konjugasyon görülmeyen kuyulardaki hücreler için “hücre klonlarından en az biri henüz eşeyssel olgunluğa ulaşmadığından veya karıştırılan klonlar aynı çiftleşme tipine sahip olduğundan dolayı konjugasyona girmedi” sonucuna varılmıştır.

Başka bir klon hattıyla konjugasyona girebilen hücreler için 500 µl NEFF içeren 24-kuyulu tabağa ekim yapılmış ve hücreler 2 gün bölünmeye bırakılmıştır. Daha sonra, çoğalan kültürlerin 250 µl’si, 250 µl 2-deoksigalaktöz (5 mg/ml) (Alfa-Aesar, S25E026) ile karıştırılmıştır. A*III ile 2 tur konjugasyonu da başarılı bir şekilde tamamlayan hücreler 2-dgal direnç geni içeren MİK’ten geliştirilen MAK’a sahip oldukları için 2-dgal’e direnç göstermekte, bu hücreler bu nedenle 2-dgal eklendikten 4 gün sonra çoğalan dirençli hücre kolonilerinin varlığı ile ayırt edilmektedir. Bu tüm genomu homozigot kardeş (2-dgal dirençli homokaryon) hücre soyları SB210/2dR olarak isimlendirilmiştir. 4 klon hattı (SB210/2dR1, SB210/2dR2, SB210/2dR10 ve SB210/2dR11) seçilmiş sonraki coDel KO konjugasyonunda kullanılmak üzere stoklanmıştır (EK- 7.1).

2.4.3. *Tetrahymena* hücrelerinin kültürizasyonu, coDel transformasyonu ve seçim

Genomik dışlama çaprazlamasıyla SB210 suşunun soyundan elde edilen SB210/2dR1 ve SB210/2dR10 hatları 50 ml NEFF içeren ayrı iki flaska ekilmiş en az 400.000 hücre/ml

yoğunluğu gelene kadar (yaklaşık 2 gün) 30 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Yeterli hücre sayısına ulaşan hücre kültürleri 50 ml açlık tamponuna alınmış ve 2 gün de açlıkta bırakılmıştır. Konjugasyon için açlıktaki hücre sayıları thoma (Labart, 1/10 mm) sayımıyla belirlenmiş ve iki kültür eşit sayıda, toplamda 40 milyon hücre/ml olacak şekilde steril 1000 ml flaskta karıştırılmış ve 30 °C’de çalkalama olmaksızın inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler karıştırıldıktan ~4 saat sonra mikroskop altında belirli bir alandaki çift oluşturan hücreler ile tek hücreler sayılmış, çiftleri oluşturan hücre sayısının toplam hücre sayısına bölünmesiyle çiftleşme verimi hesaplanmıştır (Lu & Wolfe, 2001). Çiftleşme verimi>%80 şartı sağlandığında konjugasyonun 7. saatinde biyolistik transformasyon EK-5.2’de açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir. Toplamda 4 kontrakt için 4 atış yapılmış ve her atışta 10 milyon hücre kullanılmıştır. Transformasyon sonrasında gece boyu açlık tamponunda bırakılan transformantların 2,5 ml’sine 2,5 ml 2X NEFF eklenmiş, 3-4 saat 30 °C’de inkübe edilmiş ve ardından 100 µg/ml paramomisin eklenmiştir. Antibiyotik seçimini tamamlayan pozitif transformant kolonileri 1 hafta daha rutin bir şekilde pasajlanıp genomik DNA izolasyonu için 2 ml NEFF içeren 12 kuyulu tabağa inoküle edilmiştir.

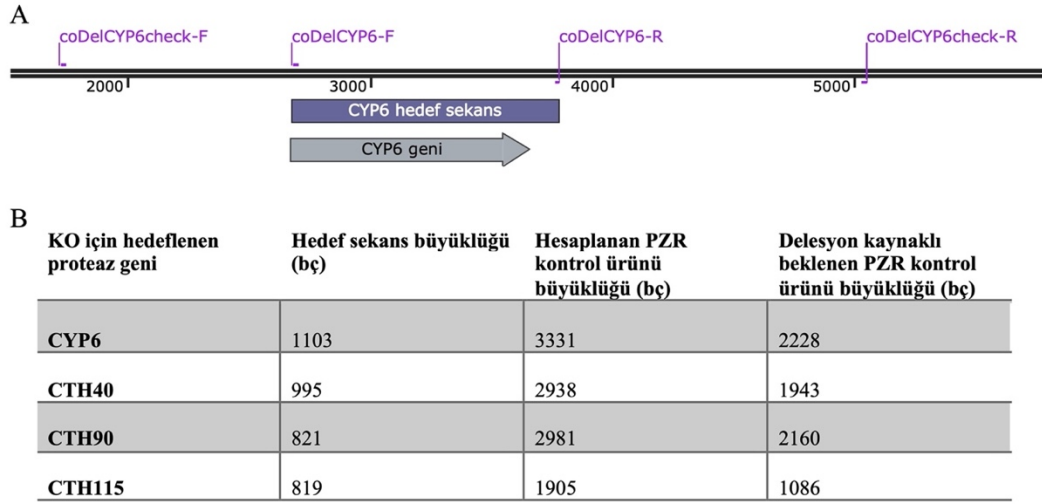
2.4.4. Tek hücre klonlarının KO karakterizasyonu

Pozitif transformant kolonilerden elde edilen genomik DNA’lar coDel KO kontrolü için kurulan PZR’de kalıp olarak kullanılmıştır. Silinmek istenen proteaz lokuslarında görülen DNA eliminasyonunu kontrol etmek için tasarlanan PZR’de ileri ve geri primerler vektöre klonlanan hedef DNA dizisine ~1000 baz uzaklıktaki upstream ve downstream bölgelerinden tasarlanmıştır. PZR sonucu üretilen ürün bandı hedef lokusta delesyon olduğu durumda daha küçük iken herhangi bir delesyon olmadığında hesaplanan büyüklükte görülmektedir (Şekil 2.4) (EK- 3.4). Bazı durumlarda PZR sonucunda hem delesyondan kaynaklı küçük bant hem de hesaplanan büyük bant görülmektedir (Hayashi & Mochizuki, 2015). Bu durum paramomisin dirençli transformantların makroçekirdeğindeki hedef gen 45ploid kopyasının bazılarında coDel ile DNA eliminasyonu gerçekleşirken bazılarında eliminasyon gerçekleşmemiş olarak yorumlanmıştır. Bu nedenle paramomisin dirençli kolonilerde hesaplanandan daha küçük bir PZR ürünü görüldüğü takdirde bu kolonilerden tek hücre klonları oluşturulmuş ve klonlardan elde edilen genomik DNA’lar tekrar kontrol

primerleriyle PZR'ye alınmıştır. Hedef proteaz sekansına ait tüm MAK kopyalarının silindiği klon hatlar (yani gen dizi büyüklüğü hesaplanan PZR bandı gözlenmeyen klonlar) isimlendirilip sonraki çalışmalar için stoklanmıştır.

MAK genomunda 45 kopyanın tam delesyonu gözlemlenen KO klonları belirlenmiş ve 1 ml NEFF içeren 24-kuyulu tabağa ekilmiştir. 2 gün süren inkübasyon sonrasında RNA izolasyonu yapılmış ve izole edilen RNA'lar KO klonlara ait cDNA sentezi için kalıp olarak kullanılmıştır. KO genlerine ait ekspresyon seviyesinin tayini, elde edilen cDNA'ların kalıp olarak kullanıldığı PZR ile belirlenmiştir (EK- 6). Böylece KO hatlardaki coDel ile silinen proteaz genlerinin ekspresyon seviyeleri doğal suş SB210 ile karşılaştırılmıştır. Silinen her gen için, KO edilen gen ifadesinin olmadığı veya minimum olduğu bir KO hat seçilmiş ve sekretomal proteolitik aktivite çalışmalarına bu hatlar ile devam edilmiştir.

Silinen proteaz genlerinin tüm kopyalarının MAK'tan elimine edildiğinden emin olmak için KO hatlar 1 ay boyunca paramomisin olmaksızın NEFF içeren cam tüplerde muhafaza edilmiştir. Bu esnada vejetatif bölünmeye devan eden hatlarda eğer silinen genin doğal kopyası varsa bu kopyanın fenotipik ayrışma sonucu kültürdeki bazı hücrelerde sayıca artması (recovery) beklenmektedir. Bu durumda "check" primerleriyle yapılan PZR sonucunda sadece beklenen mutant dizi ürünü değil hesaplanan gen kontrol ürün büyüklüğü de jelde gözlenmektedir. Bu nedenle 1 ay NEFF içeren cam tüpte muhafaza edilen KO hattı kültürlerinden genomik DNA izolasyonu yapılmış ve EK- 3.4'deki protokole göre PZR kurulmuştur.



Şekil 2.4. *T. thermophila* MAK genomundan silinmesi hedeflenen proteaz genleri için tasarlanmış coDel PZR kontrol deney tasarımı. A) coDel KO için hedeflenen genin (CYP6) ve bu geni içerecek şekilde üretilip pMcoDel vektörüne klonlanan DNA sekansının siyah çift çizgi ile temsil edilen MAK genomundaki yerleşimi gösterilmiştir. İç kısımdaki spesifik primerler hedef sekansların PZR ile üretimini sağlarken geni çevreleyen “check” primerleri, PZR kontrolüyle beklenen DNA eliminasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini göstermektedir. Hesaplanan PZR ürünü kontrol büyüklüğü (bç), hedef sekansın elimine edilmediği durumda elde edilecek olan PZR ürününün boyutunu belirtmektedir. B) Hedef genler için hesaplanan ve beklenen PZR kontrol ürünü bant büyüklükleri verilmiştir.

2.5. Proteaz KO *Tetrahymena* Hatlarının Flask Ortamında Büyüme Eğrilerinin Çıkarılması

Öncelikle flask ortamında hücre kültürü çoğalması sırasında *T. thermophila* hücre sayısı ile 600 nm’de ölçülen optik yoğunluk (optical density, OD) arasındaki korelasyon belirlenmiştir. Spektrofotometrik OD600 ölçümü bakteriler için uygulanan rutin bir hücre konsantrasyonu tayin yöntemi olup *Tetrahymena*’da özellikle toksikoloji çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Dirghangi & Pagani, 2013; Mar vd., 2020; Xu vd., 2002). OD600-hücre sayısı/ml standart eğrisinin oluşturulabilmesi için 50 ml NEFF içeren flaska ön kültürden (starter) ~50.000 hücre/ml olacak şekilde SB210 ekimi yapılmış ve hücreler çalkalama olmaksızın 30 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Zamanla büyümeye devam eden kültürün belirli saatlerinde (0, 8, 24, 32, 48, 56 ve 72. saat) Thoma lamı kullanılarak hücre sayımı ve mikrotabak okuyucu (microplate reader) ile aynı saate ait 3 tekrarlı OD600 ölçümü yapılmıştır. Ölçüm alınan saatlerdeki sayılan hücre sayısına karşılık gelen OD600 değerleri kullanılarak standart eğri oluşturulmuştur.

Ön kültür olarak 10 ml NEFF içeren flasklara ekilen proteaz KO hatlar ve SB210, iki gün boyunca 30 °C’de çalkalama olmaksızın inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında Thoma lamıyla hücre sayımı yapılan her bir hücre kültüründen 50 ml NEFF içeren flasklara ~50.000 hücre/ml yoğunlukta olacak şekilde ekim yapılmış ve aynı koşullarda inkübe edilmiştir. Hücre kültürleri büyümeye devam ederken belirli saatlerde (0, 8, 24, 32, 48, 56 ve 72. saat) mikrotabak okuyucuyla OD600 ölçümleri alınmış ve bu değerler daha önce yapılan standart eğri formülü kullanılarak hücre sayısı hesaplamasında kullanılmıştır. Birbirinden bağımsız olarak 3 kez tekrar edilen ölçümler sonucunda KO hatların doğal suş ile karşılaştırmalı büyüme eğrisi grafiği oluşturulmuştur. Büyüme eğrisinde 48. saat dış ortam örneklerinin alındığı saat olarak belirlenmiştir.

2.6. *T. thermophila* KO Hatlardan Alınan Dış Ortam örneklerinin *in vitro* Sekretomal Proteolitik Aktivite Analizi

2.6.1. Sekretom örneklerinin konsantre edilmesi

Seçilen *T. thermophila* proteaz KO hatları ile SB210, başlangıç hücre sayısı ~50.000 hücre/ml olacak şekilde 50 ml NEFF içeren flasklara ekilmiş ve 48. saate kadar büyütülmüştür. Sonrasında steril 50 ml falkon tüpe transfer edilmiş ve 1100 g’de 4 dk santrifüjlenerek hücre peleti çöktürülmüştür. Alınan 40 ml dış ortam, tüpün toplam hacmi 15 ml olduğu için 15+15+10 ml hacimlere bölünerek 10 kDa limitli ultrasantrifüj tüpleriyle (Millipore Ultracel-10, UFC901024) 4000 g’de 250-300 µl’ye kadar konsantre edilmiş ve konsantrant ayrı bir tüpte toplanmıştır. Ardından tüm konsantrantlar ultrasantrifüj tüpüne yüklenmiş, 2 kez 11 ml 1X PBS tamponuyla yıkanmış ve 1X PBS ile 1 ml’ye tamamlanmıştır. Böylece SB210 ve KO hatlardan alınan 10 kDa üzerindeki sekretom proteinleri 40 ml’den 1 ml’ye 40 kat konsantre edilmiş ve 100’er µl’lik hacimlere bölünerek (alikota olarak) -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

2.6.2. Konsantre edilmiş sekretom proteazlarının proteolitik aktivitelerinin karşılaştırmalı belirlenmesi

Elde edilen SB210 ve KO hatlara ait sekretom örneklerinin öncelikle Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlenmiştir. Bunun için düz tabanlı 96-kuyulu tabakta 250

µl bradford reaktifi (Sigma, B6916) üzerine 5 µl sekretom örneği eklenmiş ve 10 dk oda sıcaklığında horizontal çalkalayıcıda inkübe edilip 595 nm’de absorbans ölçülmüştür (3 tekrarlı). Konsantrasyon ölçümünden sonra tüm sekretomlar 0,05 mg/ml’ye seyreltilmiş ve 20 µl’si (toplam 1 µg protein) 6X örnek yükleme tamponuyla karıştırılıp %12’lik SDS-PAGE jeline yüklenmiştir (BSA 100 ng yüklenmiştir). EK-7.2’de verilen protokole göre koşturulan jeller kısa gümüş nitrat boyamasına (Chevallet, Luche ve Rabilloud, 2006) ya da coomassie G-250 boyamasına (EK-7.2) alınmıştır

SB210 ve KO ırk sekretomlarının protein konsantrasyonları 0,01 mg/ml’ye eşitlenip Pierce kolorimetrik proteaz aktivite kitiyle (Thermo Scientific, #23263) proteolitik aktivite analizine alınmıştır. Kit protokolüne uygun şekilde 50 µl sekretom örneği 4 tekrarlı şekilde düz tabanlı 96-kuyulu tabağa eklenmiş ve bu kuyulardan üçü üzerine 100 µl sülsinile kazein (2 mg/ml), bir kuyuya ise aynı hacimde 1X PBS ilave edilmiştir (Blank). Plate 20 dk 30°C’de inkübasyona bırakılmış, ardından 50 ul TNBSA çalışma solüsyonu eklenmiş ve oda sıcaklığında 20 dk inkübasyondan sonra 450 nm’de absorbans (A_{450}) ölçümü yapılmıştır (Epoch 2 microplate reader, BioTek). Blank A_{450} değeri, sekretom örneklerinin ortalama A_{450} değerlerinden çıkarılarak ΔA_{450} değerleri hesaplanmıştır. Sekretom proteaz aktivite deneyi bağımsız 3 tekrar ile yinelenmiş ve SPSS’de one-way ANOVA analiziyle istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Sekretomlar ve süksinile kazein reaksiyon karışımlarının 10 µl’si absorbans ölçümünden sonra ayrı tüplere alınmış, 2µl örnek yükleme tamponuyla (6X) karıştırılıp %18’lik glisin SDS-PAGE jeline yüklenmiştir (EK-7.2). Elektroforez sonrası jeller Coomassie boyamasına alınmış ve görüntülenmiştir. Süksinile kazein ile 30 dk ve 40 dk inkübasyon görüntüleri için de aynı prosedür uygulanmış, sadece 30°C’deki inkübasyon süreleri uzatılmıştır.

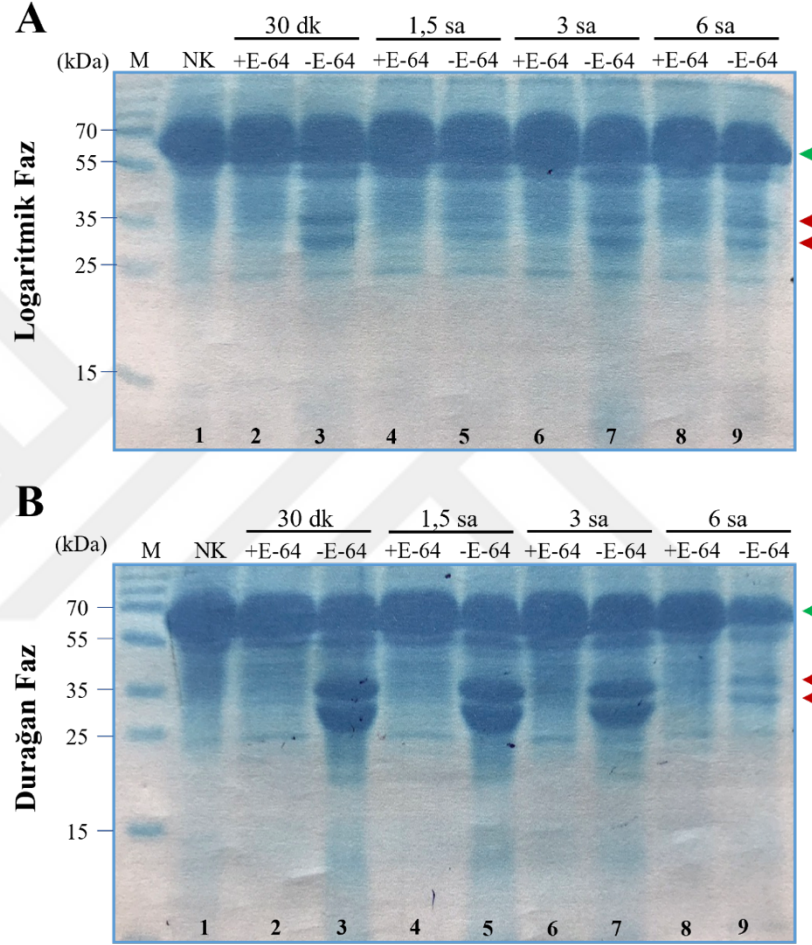
3. BULGULAR

3.1. Flask Ortamında oğaltılan SB210 İrki Hücre Kültüründen Alınan Kültür Ortamının Rtm ve HSA Substratlarına Karşı Gösterdiği Sekretomal Proteolitik Aktivite

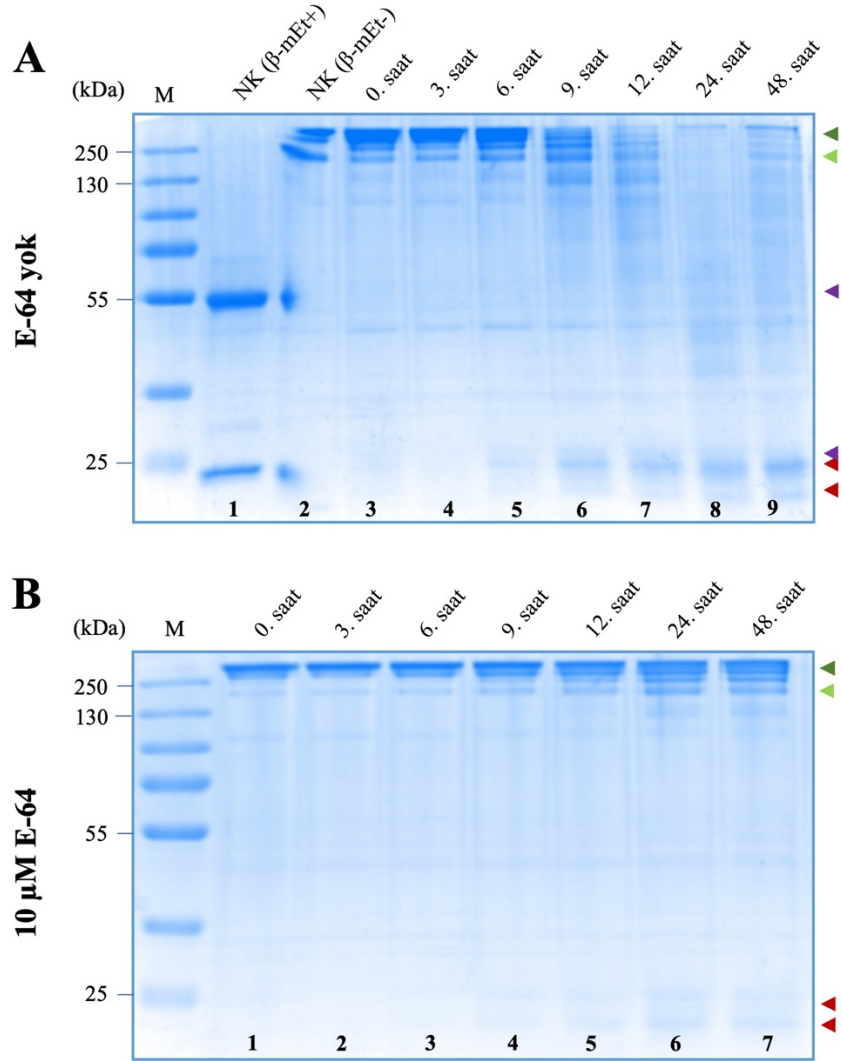
T. thermophila hücre kültürünün vejetatif büyüme sürecinde SCM'ye salgıladığı proteazlardan kaynaklanan sekretomal proteolitik aktivite, insan serum albümini (HSA) ve kanser ilacı monoklonal antikor ritüksimab (Rtm) proteinlerinin substrat olarak kullanıldığı birbirinden bağımsız iki proteolitik degradasyon deneyi ile araştırılmıştır. Sekretom proteazlarından kaynaklanan proteolitik aktivite, logaritmik faza kıyasla durağan fazda daha fazladır (Şekil 3.1). 37 µg HSA substratının kullanıldığı deneyde her iki fazda da ilk yarım saatte gözle görülür bir proteoliz gözlenmiş, Şekil 3.1'de yeşil ok ile gösterilen yaklaşık 66 kDa büyüklüğündeki substrat, kırmızı oklar ile gösterilen 25 ve 35 kDa büyüklüğünde iki büyük parçaya ayırmıştır (Şekil 3.1, 3, 5, 7 ve 9. kuyular). Sistein proteazların geri dönüşümsüz inhibitörü olan E-64'ün eklendiği logaritmik ve durağan faz sekretomu içeren örneklerde ise degradasyon neredeyse tamamen inhibe edilmiş, sekretom eklenmeyen negatif kontrol (1. kuyu) benzeri parçalanmamış bir protein bandı gözlenmiştir (Şekil 3.1, 2, 4, 6 ve 8. kuyular).

Anti-kanser monoklonal antikor ilacı olan Rtm'nin substrat olarak kullanıldığı ikinci deneyde ise E-64'ün eklenmediği reaksiyon şartlarında 250 kDa protein marker bandının üstünde kalan Rtm dimeri (koyu yeşil) ile 130-250 kDa arasında kalan Rtm monomeri (açık yeşil) sekretom proteazları tarafından 12 saatte büyük oranda parçalanmış, 24. saate kadar ise neredeyse tamamen yok edilmiştir (Şekil 3.2-A). Kırmızı oklar ile gösterilen ~25 kDa ve <25kDa büyüklüğündeki protein bantları ilk 6 saatte görülmezken 9. saatten 48. saate kadar giderek artan bir yoğunlukta protein bandına dönüşmesi, bu proteinlerin Rtm'nin parçalanması ile oluştuğunu desteklemektedir. Reaksiyon ortamına E-64 eklenmesi Rtm'nin parçalanmasını tamamen durdurmasa da 48. saate kadar önemli derecede azaltmış, kırmızı oklar ile gösterilen Rtm parçalarının yoğunluğunu da oldukça düşürmüştür (Şekil 3.2-B). Bu bulgular literatürü destekler nitelikte olup *T. thermophila* SB210 ırkına ait sekretom proteazlarının yüksek bir proteolitik aktiviteye sahip olduğunu, büyük çoğunluğunun sistein

proteazlardan oluştuğunu ve sistein proteaz inhibitörü kullanımının hücre kültür ortamının proteolitik degradasyonunu büyük oranda düşürdüğünü göstermiştir (Herrmann vd. 2006).



Şekil 3.1. HSA proteininin *Tetrahymena* sekretom proteazları tarafından büyüme evresine ve muamele süresine bağlı degradasyon analizi. Flask ortamında büyütülen SB210 hücre kültürüne ait konsantre edilmemiş logaritmik faz (A) ve durağan faz (B) SCM örnekleri 37 μ g HSA ile değişen sürelerde *in vitro* proteoliz reaksiyonuna alınarak coomassie ile boyanmış %15'lik SDS-PAGE jelde görüntülenmiştir. Yeşil ok: HSA (66 kDa) ana protein bandı, Kırmızı oklar: HSA'nın proteoliziyle oluşan protein bantları, NK: negatif kontrol, +E-64: 10 μ M E-64 eklenmiş reaksiyon, -E-64: E-64 eklenmemiş reaksiyon. M: PageRuler Plus, Prestained protein marker, #26619.

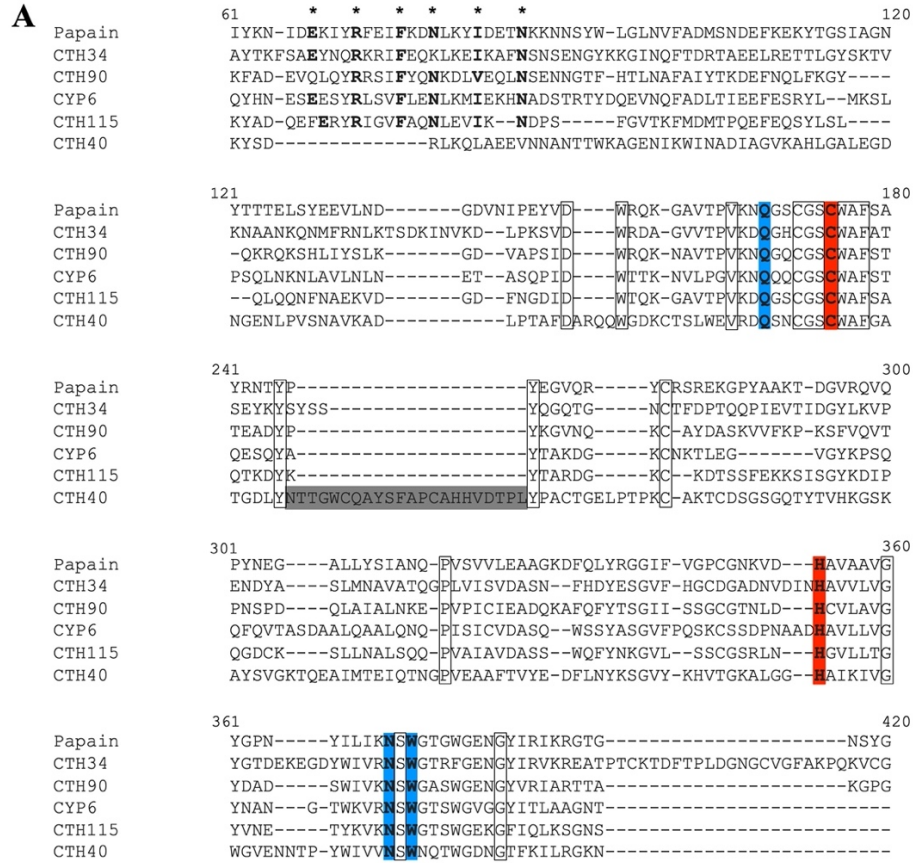


Şekil 3.2. Monoklonal antikor ilacı Rtm'nin *Tetrahymena* durağan faz sekretom proteazları tarafından muamele süresine bağlı degradasyon analizi. A) Flask ortamında büyütülen SB210 hücre kültürüne ait konsantre edilmemiş durağan faz SCM örnekleri 3 μ g Rtm ile değişen sürelerde in vitro proteoliz reaksiyonuna alınarak coomassie ile boyanmış %12'lik SDS-PAGE jelde görüntülenmiştir. B) aynı reaksiyonlara 10 μ M E-64 eklenmiştir. Koyu yeşil ok: β -mEt ilave edilmeyen dimer Rtm protein bandı (~300 kDa), Açık yeşil ok: β -mEt ilave edilmeyen monomer Rtm protein bandı (~150 kDa), Mor oklar: β -mEt ilave edilen Rtm protein ağır zincir (~50 kDa) ve hafif zincir (~25 kDa) bantları, Kırmızı oklar: Rtm'nin proteoliziyle oluşan bantlar, NK: Negatif kontrol, M: PageRuler Plus, Prestained protein marker, #26619.

3.2. KO Edilmesi Amaçlanan Sekretom Proteaz Genlerinin Biyoinformatik Olarak Belirlenmesi

Literatürde zengin besiyeri ortamında büyütülen *Tetrahymena* hücrelerinin sekretomunda ifade edildiği iddia edilen ve/veya literatürde karşılaşıp ER yönlendirme sinyal peptidi bulundurma olasılığı %50'nin üzerinde olan proteazlar arasından ifade seviyesi en yüksek olan 5 tanesi seçilmiştir. TTHERM_00083480 ve TTHERM_00683010 genlerinin ortalama ifade seviyesi daha yüksek olmasına karşın (Tablo EK-1.1) bu genlerin SB210 ırkındaki mRNA ekspresyonu literatürde raporlanmadığı için *CTH34*, *CYP6*, *CTH40*, *CTH90* ve *CTH115* sekretomal proteolitik aktiviteden en fazla sorumlu olabilecek proteazları kodlayan olası genler olarak belirlenmiştir (Materyal ve Yöntem, Başlık 2.2). Hedeflenen 5 gen de TGD veritabanında papain ailesi sistein proteaz kodlayıcı gen olarak nitelendirilmiş, MEROPS peptidaz veri tabanında (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>) blastlama yapıldığında hepsinin klan CA, aile C1 ve alt-aile C1A'ya (papain ailesi sistein proteazlar) dahil peptidazları kodladığı belirlenmiştir.

Swiss-model programı ile yapılan modelleme CTH40'ın katepsin B-benzeri, diğerlerinin ise katepsin L-benzeri bir proteaz yapısına sahip olduğunu göstermiştir. MUSCLE online program ile yapılan hizalamada hedeflenen genler tarafından kodlanan proteazların tümünün, katalizi gerçekleştiren (kırmızı) ve yardımcı (mavi) amino asitleri koruduğu görülmüştür (Şekil 3.3-A). Ayrıca CTH34, CYP6, CTH90 ve CTH115'de katepsin L-benzeri sistein proteazlara özgü ERFNIN motifi (* ile işaretli) ile CTH40'da katepsin B-benzeri sistein proteazlarda görülen "occluding loop peptidi (gri) belirlenmiştir. Enzimin üç boyutlu yapısı dikkate alındığında papain ailesi sistein proteazlar arasında özellikle katepsin L-benzeri peptidazların pro-bölgesinde korunan ERFNIN motifinin takip eden β -sheet amino asitleriyle kovalent olmayan bağlar yardımıyla pro-bölgenin stabilitesini sağladığı belirtilmektedir (Wiederanders, Kaulmann ve Schilling, 2003). Papain ailesi sistein proteazlarda bu pro-bölgesi enzimin inhibe edilmesini ve zimojen aktivasyonu ile pH'a bağlı aktivasyonunu sağlamaktadır. Katepsin B-benzeri papain ailesi sistein proteazlarda görülen "occluding loop" peptid dizisinin ise substratın C-ucunun enzime bağlanmasını teşvik ederek katepsin B'nin peptidildipeptidaz aktivitesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Musil vd., 1991). Hedef genler ve ifade ettikleri protein dizileri arasında yine MUSCLE ile yapılan benzerlik



B

	CTH34	CYP6	CTH40	CTH90	CTH115
CTH34		%55,2	%54,4	%56,3	%56,5
CYP6	%34,5		%51,9	%57,3	%56,8
CTH40	%29,0	%27,8		%50,1	%50,7
CTH90	%33,0	%37,6	%27,5		%54,9
CTH115	%34,1	%41,8	%27,1	%35,0	

Amino asit dizisi benzerlik yüzdesi

Nükleotid dizisi benzerlik yüzdesi

Şekil 3.3. Literatür ve biyoinformatik araştırmalarla belirlenip KO edilmesi hedeflenen *T. thermophila* SB210 sekretom proteazlarının korunmuşluk ve benzerlik incelemesi. A) SB210 ırkında ifade edildiği bildirilip ifade seviyesi en yüksek olan 5 proteaz geni papain ailesi sistein proteaz (klan CA, alt-aile C1A) kodlayıcı gen olarak sınıflandırılmış, peptidazların amino asit dizileri bu ailenin temsilcisi papain (*Carica papaya*) ile karşılaştırıldığında katalitik amino asitler (kırmızı) ve katalizi teşvik eden diğer amino asit kalıntılarının (mavi) tamamen korunmuş olduğu görülmüştür. Bunlar dışında yine papain ve hedef peptidaz dizilerinde ortak korunmuş amino asitler siyah çerçeveye, katepsin L-benzeri peptidazlara özgü ERFNIN motifi * ile ve katepsin B-benzeri peptidazlara özgü “occluding loop” gri ile belirtilmiştir. B) MUSCLE online hizalama programı kullanılarak hizalanan hedef *Tetrahymena* proteazlarının gen dizisi (mavi) ve peptid dizisi (kırmızı) yüzde benzerlik skorları verilmiştir.

analizi, bu DNA dizilerinin gen düzeyinde %50-57, protein düzeyinde %27-42 benzerlik içerdiğini göstermiştir (Şekil 3.3-B). *Tetrahymena* makroçekirdeğinden silinmesi amaçlanan bu 5 proteaz geni ve kodladıkları proteinlerle ilgili bahsedilen biyoinformatik bilgiler Tablo 3.1’de özetlenmiştir.

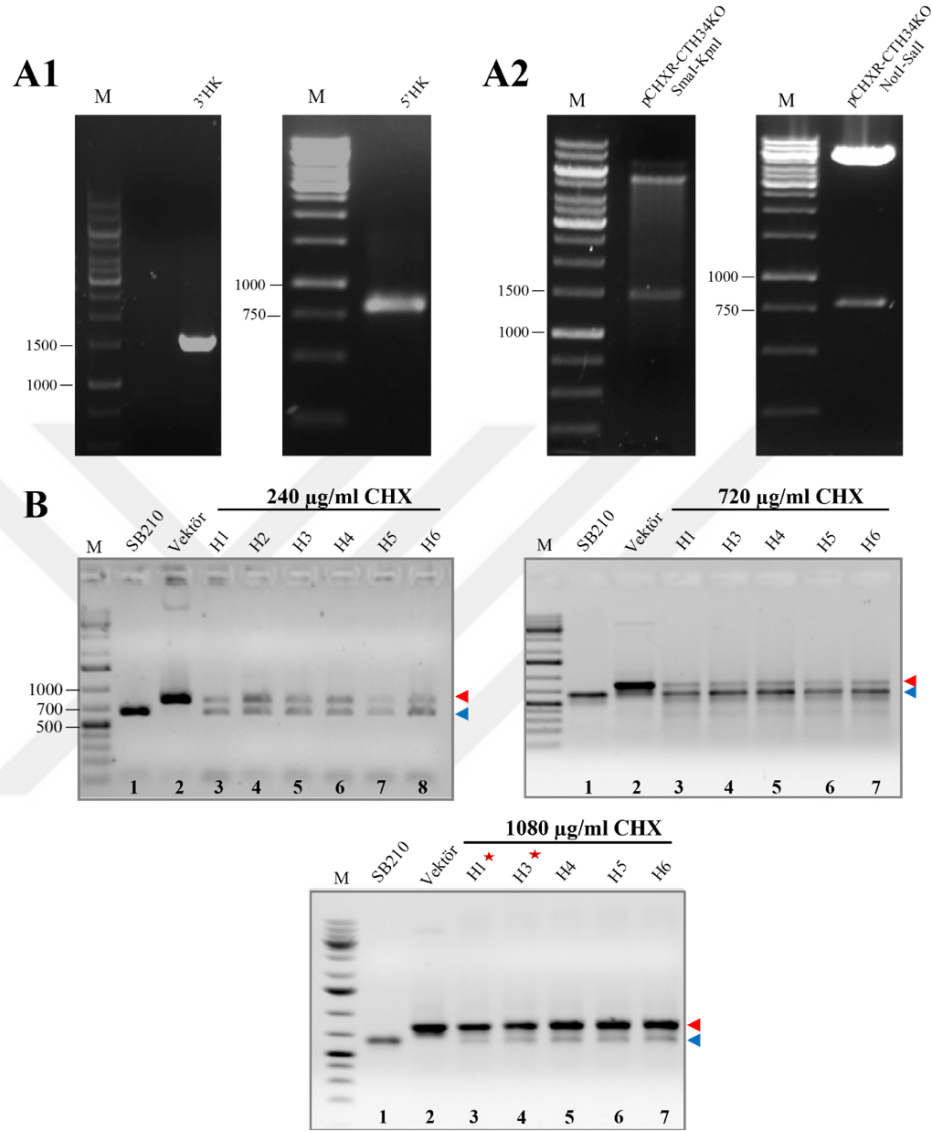
Tablo 3.1. *Hedef proteazlar için yapılan biyoinformatik analiz bilgilerini özetlenmesi.*

TGD standart isim	CTH34	CYP6	CTH40	CTH90	CTH115
TTHERM	00628610	00760310	00641150	00161130	00683060
NCBI gen ID (NW 00...)	2476355.1	2476154.1	2476421.1	2476534.1	2475961.1
Kodladığı protein	Klan CA, altaile C1A sistein proteaz				
SignalP-5.0 salgılatma sinyal peptid tahmini	%100	%77	%70	%71	%60
Swiss-Model Kalıp protein	İnsan prokatepsin L, 1cs8.1.A	İnsan prokatepsin L, 1cs8.1.A	İnsan prokatepsin B, 1pbh.1.A	I86F mutant papain, 4qrv.1.A	İnsan prokatepsin L, 1cs8.1.A
Swiss-Model QMEANDisCo skoru	0,68±0,05	0,68±0,05	0,74±0,05	0,68±0,05	0,69±0,05

3.3. *T. thermophila*’da CTH34 Geninin Homolog Rekombinasyon ile MAK Genomundan Silinmesi

CTH34 sistein proteaz geninden PZR ile üretilen 3’ ve 5’ homoloji kollarından önce SmaI-KpnI kesimini takip eden ligasyon ile 3’HK, ardından NotI-SalI kesimini takip eden ligasyon ile 5’HK, pCHXR vektörüne CHX direnç genini çerçeveleyecek şekilde klonlanmıştır (Şekil 2.1). Klonlamanın kontrolü aynı enzim çiftleriyle yapılan kesimlerin HK bantlarını vermesiyle teyit edilmiştir (Şekil 3.4-A1 ve A2). Vektör, KpnI restriksiyon enzimiyle lineerizasyonu sonrasında *T. thermophila* SB210 ırkı hücrelerine transforme edilmiş ve *CHXR* antibiyotik direnç geninin homoloji kolları yardımıyla *CTH34* lokusuna yerleşmesi amaçlanmıştır. 15 µg/ml CHX seçiliminde hayatta kalan koloniler 240 µg/ml seviyesine kadar artan antibiyotik ve azalan CdCl₂ konsantrasyonunda periyodik pasajlanmıştır. Bu aşamada antibiyotik baskısına maruz bırakılan kolonilerden 6 tek hücre izole edilmiştir. Tek hücre klonlarından izole edilen genomik DNA 3 primerli PZR ile *CHXR* varyantı bakımından kontrol edildiğinde tüm klonların MAK’larında hala yarı yarıya *CTH34* kopyalarını

taşıdıkları görülmüştür (Şekil 3.4-B, 240 µg/ml CHX jeli, kırmızı ok). Böylece antibiyotik baskısı artırılarak periyodik pasajlamalara devam edilmiş, 720 µg/ml CHX konsantrasyonuna gelindiğinde (Şekil 3.4-B, 720 µg/ml CHX jeli, kırmızı ok) klon hat genomları tekrar kontrol edilmiş ve tüm hatların *CHXR* varyantı bakımından heterozigot oldukları gözlenmiştir (bu esnada H2 klonu kaybedilmiş, 5 klon hattıyla deneylere devam edilmiştir). Bunun üzerine antibiyotik baskısına 1080 µg/ml CHX konsantrasyonuna kadar devam edilmiştir. Bu konsantrasyonun SB210 hücreleri için hayatta kalabildikleri en yüksek CHX konsantrasyonu olduğu ve tek hücre klonu hatların bir sonraki konsantrasyon olan 1200 µg/ml CHX konsantrasyonuna pasajlandıklarında yaşamadıkları gözlenmiştir. Ayrıca CHX baskısı arttıkça hücrelerin pasajlama için gerekli hücre sayısına ulaşmaları için geçen sürenin uzadığı görülmüştür. Hücre kültürlerinin periyodik pasajlama günleri takip edildiğinde, 240 µg/ml'den 360 µg/ml CHX içeren besiyerine pasajlama için hücrelerin yeterli yoğunluğa ulaşması 2 gün sürerken 960 µg/ml'den 1080 µg/ml'ye pasajlama için hücrelerin yeterli yoğunluğa ulaşması 7 gün sürmüştür. En son 1080 µg/ml CHX baskısındaki tek hücre klonlarından genomik DNA saflaştırılmış ve PZR kontrol deneyi yinelenmiştir. Klon hatların hepsinde *CHXR* mutant geninin *CTH34* kopya sayısına kıyasla daha yüksek sayıya ulaşmış olduğu, yani büyük oranda proteaz geninin KO edildiği ancak *CTH34* kopyalarının az sayıda da olsa korunmuş olabileceği görülmüştür (Şekil 3.4-B, 1080 µg/ml CHX jeli, kırmızı ok ve mavi ok). *CTH34* bant yoğunluğunun görece en az olduğu H1 ve H3 hatları ileriki deneyler için seçilmiştir (Şekil 3.4-B yıldız ile işaretlenmiştir).



Şekil 3.4. *pCHXR-CTH34KO* vektörüne klonlanmak üzere geni çerçeveleyen homoloji kollarının (HK) üretilmesi, restriksiyon-ligasyon yöntemiyle vektöre entegre edilmesi ve transformant *Tetrahymena* tek hücre klonlarının antibiyotik baskısına genomik seviyede cevabı. A1) CTH34 geninin downstream bölgesinden PZR ile amplifiye edilen 1469 bp büyüklüğündeki 3'HK ve upstream bölgesinden amplifiye edilen 815 bp büyüklüğündeki 5'HK bantlarını gösteren etidyum bromid ile boyanmış agaroz jel görüntüsü. A2) *pCHXR-CTH34KO* vektörüne ait restriksiyon enzim çifti (3'HK için *SmaI-KpnI*, 5'HK için *NotI-Sall*) kontrol kesimleri. Üstte kalan bantlar kesim sonrası kalan vektör iskeletini, alttaki bantlar ise kesilen HK'ları göstermektedir. B) Periyodik pasajlamalar ile arttırılan farklı CHX konsantrasyonlarının transformant hatlarda MAK CTH34 kopya sayısına etkisi. CTH34 geni mavi ok ile gösterilen 643 bp PZR ürününü, aynı lokusa yerleştirilmiş CHXR geni kırmızı ok ile gösterilen 817 bp PZR ürünü oluşturmaktadır. Yıldız şekli ileriki çalışmalar için seçilip dondurulan CTH34KO hatları temsil etmektedir. M: Gene Ruler 1-kb DNA Marker, ThermoScientific #SM0313.

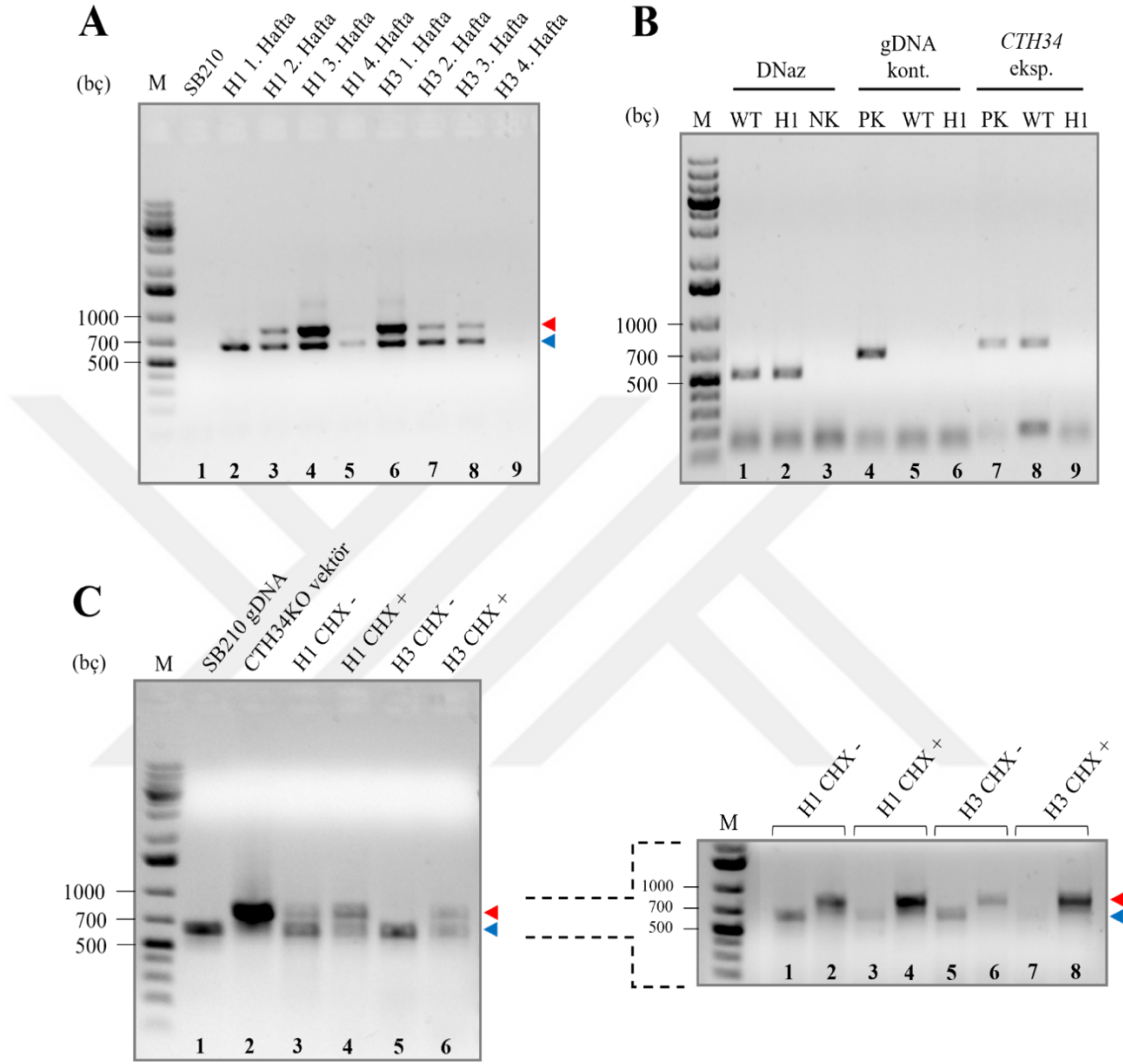
Sekil 3.4-B’de görülen *CTH34* ürünü bandın kaynağı MAK’ta kalan az sayıdaki proteaz gen kopyaları olabileceği gibi genin MİK’ten gelen diploid kopyalarından üretilen PZR ürünleri de olabileceği göz ardı edilmemelidir. Bunun araştırılması için *T. thermophila* CTH34KO hatları olarak seçilen H1 ve H3, 4 hafta boyunca herhangi bir antibiyotik baskısı olmaksızın pasajlanarak bölünmeye zorlanmış ve her hafta kültürlerden hücre örnekleri alınıp genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. *CTH34* kopya sayısı bakımından kontrol edilen KO hat genomlarında her iki hatta da 1. hafta sonunda proteaz geni kopya sayısının arttığı (recovery) ve ilerleyen haftalarda da gen kopya sayılarının benzer profilde kaldığı görülmüştür (Şekil 3.5-A kırmızı ve mavi ok ile gösterilen bantlar). Sonuç olarak, maksimum seviyede antibiyotik baskısına rağmen *CTH34*, SB210 hücrelerinin MAK’ından tamamen KO edilememiş, proteaz geninin az sayıda kopyası MAK genomunda korunmuştur.

MAK’ta silinemeyen *CTH34* kopyalarından proteaz ekspresyon seviyesi araştırılmış, bunun için 720 µg/ml CHX baskısında büyütülen H1 hattı ve SB210 hücrelerinden RNA izolasyonu yapılmış, hücre kültüründe belirli bir zamanda ifade edilen genlerin mRNA’ların da dahil olduğu toplam RNA içeriğinden cDNA üretilmiştir. H1 ve SB210’a ait cDNA’ların kalıp olarak kullanıldığı, *CTH34* geni kodlayan bölgeye spesifik primerlerle yapılan PZR sonucunda, bu genin doğal ırkta ifade edildiği ancak CTH34KO hat H1’de korunan proteaz geni kopyalarının neredeyse hiç ekspresyona neden olmadığı bulunmuştur (Şekil 3.5-B, 9.kuyu). RNA’ların kalıp olarak kullanıldığı PZR’de bant gözlenmemesi, izolasyonda genomik DNA kontaminasyonu olmadığını ve elde edilen sonuçların mRNA’dan sentezlenen cDNA’lara ait olduğunu göstermiştir. Bu durumda, H1 hattında her ne kadar gene ait tüm kopyalar MAK genomundan silinememiş olsa da bu kopyaların CTH34 peptidazı ifadesi göz ardı edilebilir bulunmuştur.

Herhangi bir genetik modifikasyona maruz bırakılan *Tetrahymena* hatlarını stabil bir şekilde uzun süre saklanmanın yolu sıvı azotta dondurmaktır. Bu nedenle elde edilen proteaz KO hatlar da ihtiyaç halinde canlandırılmak üzere zaman kaybetmeden sıvı azotta dondurulmuştur. Son olarak bu hücrelerin canlandırma sırasında CHX gerektirip gerektirmediği incelenmiştir. Sıvı azottan alınıp uygun bir şekilde canlandırılan H1 ve H3 hattı hücreleri hareketlendikleri gün (canlandırma protokolü uygulandıktan 4 gün sonra) 2 ayrı kültür olarak ayrılmış, kültürlerden birine 240 µg/ml CHX eklenirken diğerine herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Genomik DNA izolasyonuna imkân verecek yoğunluğa gelene

kadar (CHX+ kültürler için 5 gün, CHX- kültürler için 4 gün) inkübasyona bırakılan H1 ve H3 kültürleri yeterli hücre yoğunluğuna ulaşınca genomik DNA izolasyonu için peletlenmiştir. Eşit DNA konsantrasyonu kullanılarak gerçekleştirilen 3 primerli PZR ile karşılaştırılan MAK *CTH34* kopya sayısının canlandırma sırasında CHX eklenmeyen kültürde daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.5-C). Sonuç olarak, canlandırma sırasında *CTH34*KO fenotipinin korunması için H1 ve H3'ün yeniden canlandırılması sırasında olabildiğince kısa sürede antibiyotik baskısı uygulanması ve deneysel çalışma öncesinde artan antibiyotik konsantrasyonlarıyla bir süre periyodik pasajlanma yapılması gerektiği anlaşılmıştır.

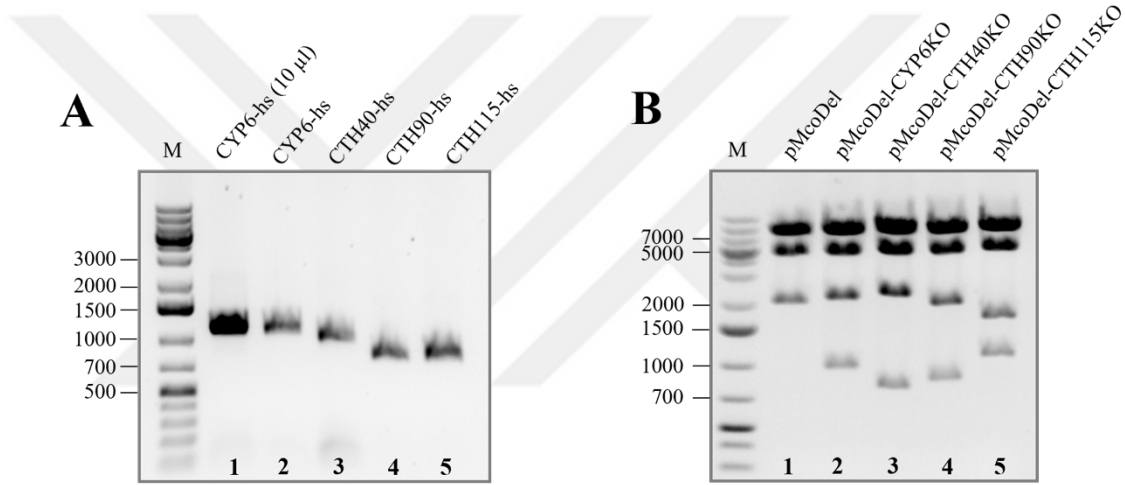
CTH34 ekspresyonunun elde edilen KO hatları H1 ve H3'de neredeyse tamamen elimine edilmiş olmasına rağmen *Tetrahymena* SB210 ırkında bu genin tam olarak KO edilememesi, kültürizasyon ve canlandırma sırasında sürekli bir CHX bağımlılığı yaratmıştır. Ortaya çıkan bu olumsuz durum tezde KO edilmesi amaçlanan diğer proteaz genleri için bir yöntemsel alternatif geliştirilmesi ihtiyacını doğurmuştur. Bu nedenle kalan 4 proteaz geninin KO'u için daha hızlı KO hat elde edilmesini sağladığı öne sürülen ve *Tetrahymena*'da DNA eliminasyonunun ektopik indüksiyonuna dayalı hedeflenmiş gen bozulması (targeted gene disruption) olarak ifade edilen co-Delesyon yaklaşımının uygulanması benimsenmiştir.



Şekil 3.5. *CTH34KO* hat olarak seçilen H1 ve H3'ün KO karakterizasyonu. A) 4 hafta boyunca CHX baskısı olmadan pasajlanan H1 ve H3 hattı hücrelerinde CHXR (kırmızı ok) ve CTH34 bandı (mavi ok) yoğunluğunun değişimi. B) *CTH34KO* hatlardan H1 için yapılan CTH34 mRNA ifade analizi sonuçları. CTH34 eksp; kalıp olarak cDNA'ların ve gene özgü primerlerin kullanıldığı PZR sonucu. DNaz; kalıp olarak cDNA'ların ve *T. thermophila* SB210 hücrelerinde ekspresyonu olduğu bilinen DNaz geni primerlerinin kullanıldığı PZR sonuçları. gDNA kont.: Kalıp olarak toplam RNA izolasyonu ile elde edilen RNA'ların ve DNaz primerlerinin kullanıldığı gDNA kontaminasyonu kontrol PZR reaksiyonu. Kırmızı ok: CHXR gen ürünü (817 bç). Mavi ok: CTH34 gen ürünü (643 bç). WT: SB210 ırkı cDNA kalıp; NK: negatif kontrol; PK: pozitif kontrol (SB210 ırkı gDNA kalıp); H1: CTH34KO hat H1 cDNA kalıp. Sağ taraftaki jelde 3 primerli PZR, CHXR ve CTH34 bandının antibiyotik eklenen ve eklenmeyen kültürlerdeki yoğunluk farkını daha net göstermek amacıyla birer çift primerle ayrı tüplerde kurulmuştur. M: Gene Ruler 1-kb plus DNA Marker, ThermoScientific #SM1343.

3.4. *T. thermophila*'da *CYP6*, *CTH40*, *CTH90* ve *CTH115* Genlerinin coDel Yöntemiyle MAK Genomundan Silinmesi

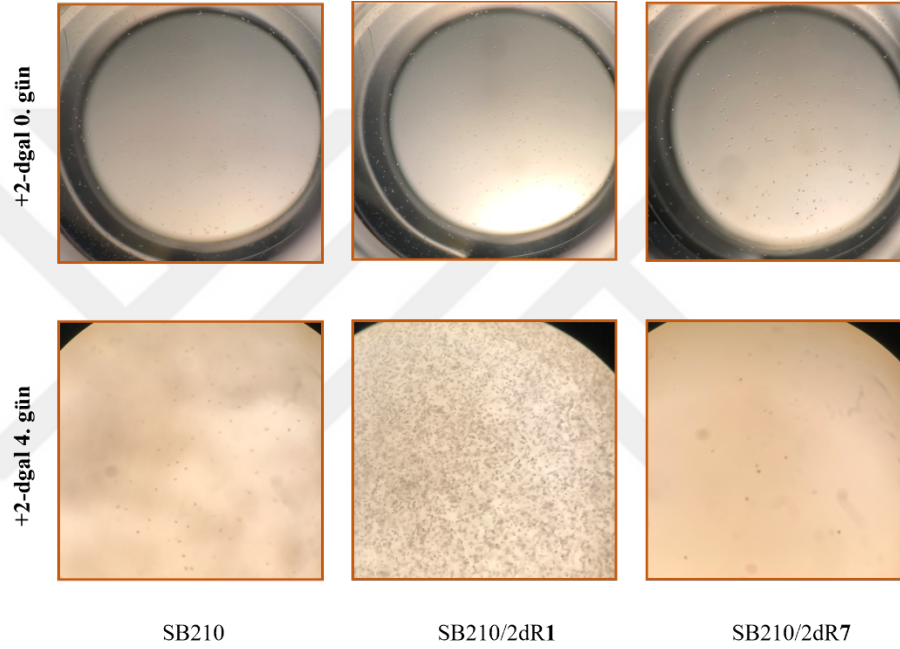
Hedeflenen proteaz genlerinin büyük bir kısmını kapsayacak şekilde üretilen hedef sekanslar Gibson assembly ligasyonu ile başarılı bir şekilde pMcoDel vektörünün *NotI* kesim bölgesine entegre edilmiş, yapılandırılan vektörler *EcoRI* restriksiyon kesimiyle doğrulanmıştır (Şekil 3.6-B).



Şekil 3.6. coDel yöntemi ile 4 proteaz geninin genomdan silinmesi için üretilen hedef sekanslar ve bu sekansların pMcoDel vektörüne entegrasyonu. *Tetrahymena* somatik genomundan silinmek üzere hedeflenen *CYP6*, *CTH40*, *CTH90* ve *CTH115* genleri içinden belirlenmiş hedef sekanslar (sırasıyla 1103, 995, 821 ve 819 bp) PZR ile üretilmiş (A) ve Gibson ligasyonu ile pMcoDel vektörüne yerleştirilmiştir. Bu entegrasyon vektörde *EcoRI* restriksiyonuna karşı farklı parçalanmalara neden olduğu için (B) yapılandırılan vektörler *EcoRI* restriksiyonuyla teyit edilmiştir. Kesim sonrası beklenen bant büyüklükleri: pMcoDel *EcoRI* kesimi: 8200-4800-2100 bp; pMcoDel-CYP6KO *EcoRI* kesimi: 8200-4800-2200-1000 bp; pMcoDel-CTH40KO *EcoRI* kesimi: 8200-4800-2300-800 bp; pMcoDel-CTH90KO *EcoRI* kesimi: 8200-4800-2000-900 bp; pMcoDel-CTH115KO *EcoRI* kesimi: 8200-4800-1700-1100 bp. M: Gene Ruler 1-kb plus DNA Marker, ThermoScientific #SM1343.

Bu vektörlerin *Tetrahymena*'ya transformasyonu konjugasyon sırasında yapılmaktadır. Konjugasyon sırasında SB210 ırkı genotipinin korunması için sadece bu ırkın genotipini taşıyıp aynı zamanda birbirinden farklı çiftleşme tipleri sergileyen hücre hatlarına ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla SB210 hattı star A*III hattı ile genomik dışlama çaprazlamasına alınmış, sonrasında eşeysel olgunluğa ulaşmış izole edilen 24 tek hücre klonu arasından konjugasyona girdiği gözlenen 11 tanesi seçilmiş ve 2,5 mg/ml 2-dgal seçilimine maruz bırakılmıştır. 6 tek hücre hattının 2-dgal eklenen besiyerinde hayatta kalıp çoğaldığı, diğer

yandan negatif kontrol SB210’da dahil kalan 5’inde 4 günün sonunda hücre sayısının gözle görülür derecede düştüğü gözlenmiştir (Şekil 3.7). Hem konjugasyona girip hem de 2-dgal direnci gösteren hatlar tamamen SB210 ırkı genomuna sahip, tüm-genom homozigot hatlardır ve aynı genetik altyapıya sahip oldukları için sekretomal proteolitik aktivite değişimi açısından SB210 ile karşılaştırılmalarında sorun görülmemiştir.

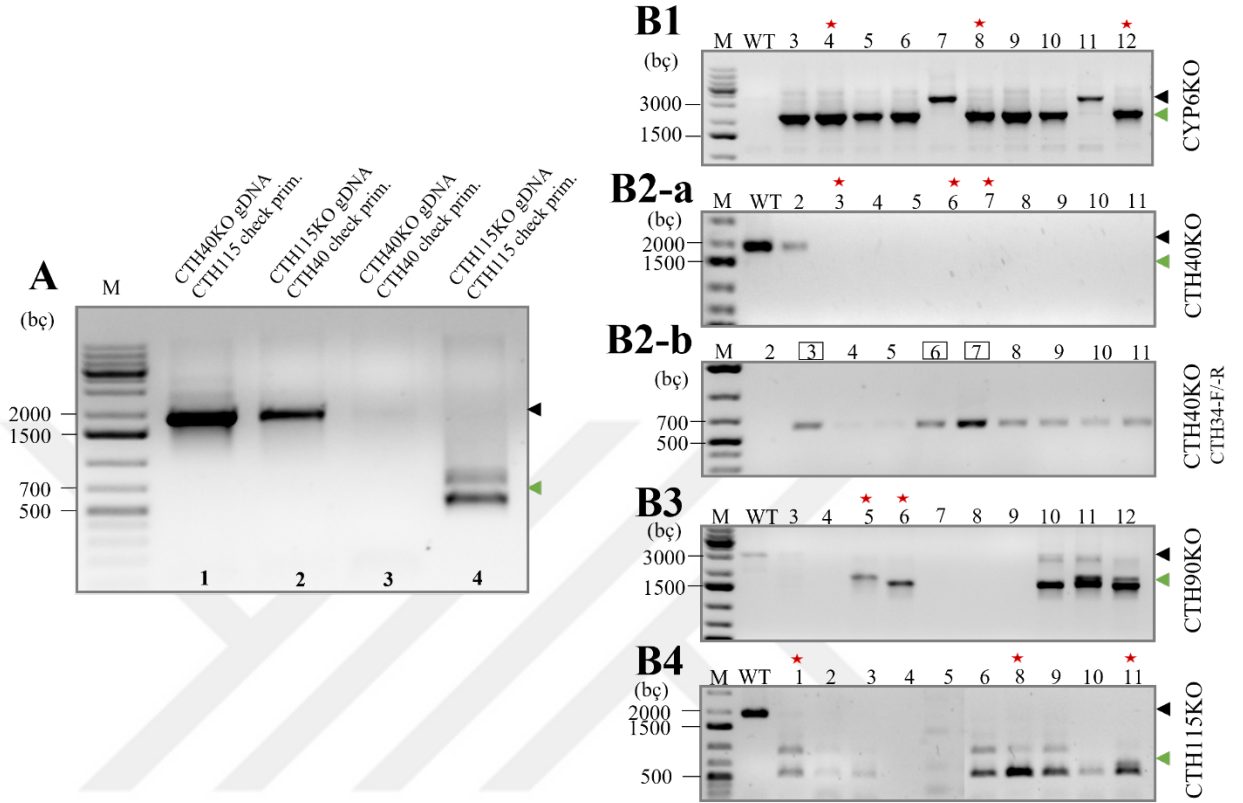


Şekil 3.7. Star hat ile genomik dışlama çaprazlaması yapılarak SB210 ırkından türetilen, SB210 genetik materyaline sahip Tetrahymena alt-ırklarının 2-dgal seçilimi. 2-dgal direnç geni bakımından heterokaryon olan SB210 ırkının star hat A*III ile konjugasyonu sonucu oluşan soy 2-dgal direncine göre seçilmiştir. Kuyular içindeki küçük noktalar Tetrahymenanın ışık mikroskopi (Nicon SMZ745, 5X büyütme) görüntüsüdür. SB210/2dR1: 2-dgal dirençli SB210 alt ırkı. SB210/2dR7: 2-dgal hassas SB210 alt ırkı. SB210: 2-dgal hassas heterokaryon.

CYP6, *CTH40*, *CTH90* ve *CTH115* proteaz genlerinin KO’u, 2-dgal seçilimini tamamlayan hücre hatlarından iki tanesinin (SB210/2dR1 ve SB210/2dR10) konjugasyon evresinde coDel transformasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Par seçilimini tamamlayan kolonilerden elde edilen tek hücre klonları taranmış, hedef dizilerin delesyonu nedeniyle bant düşmesinin (Şekil 3.8, yeşil ok) görüldüğü *CYP6*KO klonlarından 4, 8 ve 12 (Şekil 3.8-B1); *CTH90*KO klonlarından 5 ve 6 (Şekil 3.8-B3); *CTH115*KO klonlarından 1, 8 ve 11 nolu hatlar (Şekil 3.8-B4) seçilmiştir. *CTH40*KO hatların taranması için ilk önce ~2000 bp büyüklüğünde bir DNA dizisi üreten dış “check” primerleri tasarlanmıştır. Ancak kontrol

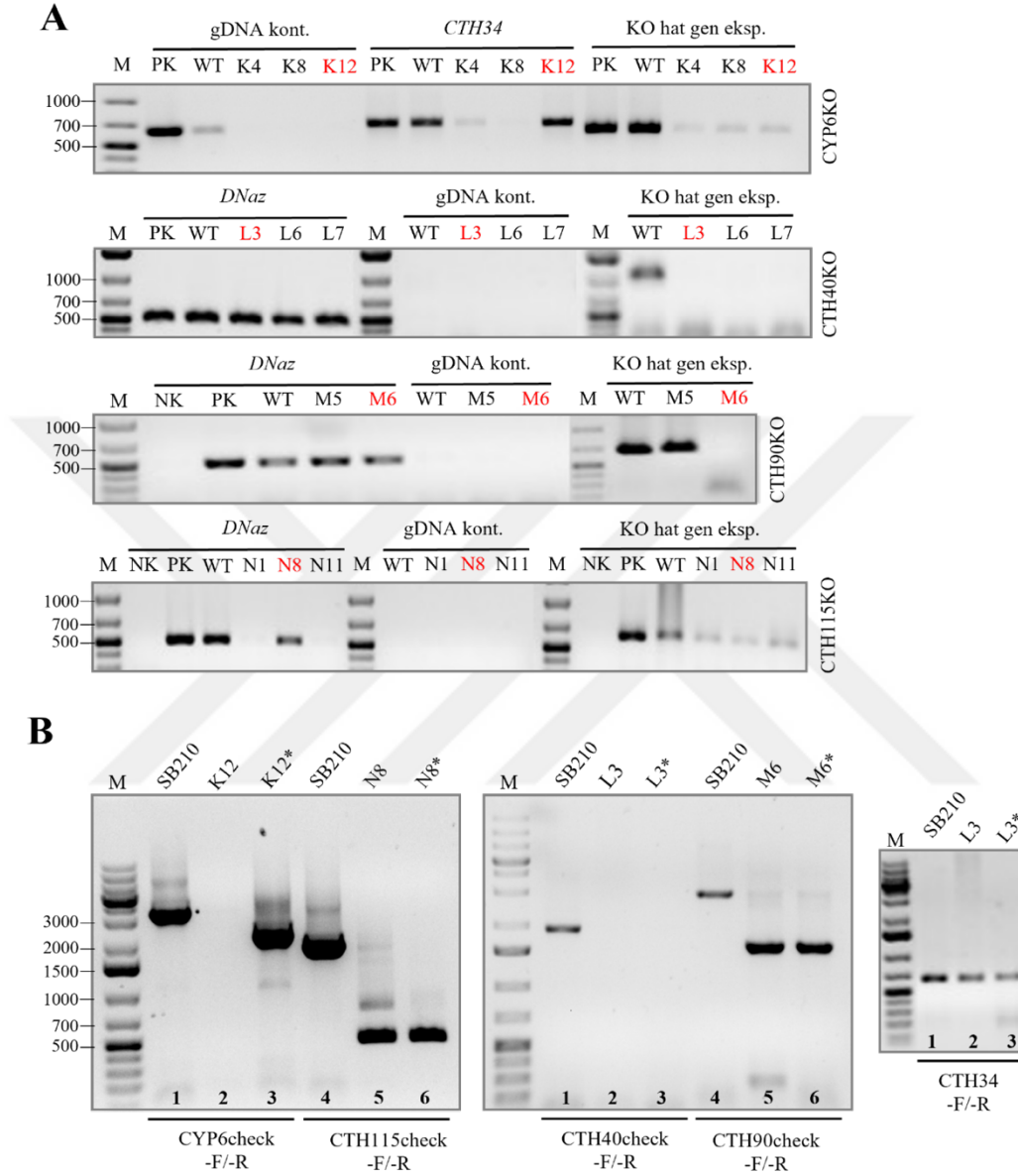
grupları çalışmasına rağmen (Şekil 3.8-A, 1 ve 2. kuyu) bu primer çifti CTH40KO hatlarında ürün vermemiştir (Şekil 3.8-A, 3. kuyu). Bunun nedeni geç konjugasyon safhasında IES eliminasyonu ile teşvik edilen *CTH40* co-delesyonunun, primer oturma bölgelerinden en az birini de içerecek şekilde gerçekleşmesidir. Bu sebeple *CTH40* hedef sekansı kapsayacak şekilde ~3000 bp büyüklüğünde ürün veren yeni bir primer çifti tasarlanmıştır. Fakat bu primer çiftinin hiçbir şekilde PZR ürünü vermediği gözlenmiştir (veri gösterilmemiştir). A-T zengini bir genoma sahip olan *T. thermophila*'da tekrar primer tasarlamak yerine CTH40KO klonlarına ait genomik DNA'lar, iyi çalıştığı bilinen bir primer çiftiyle (CTH34-F/-R) PZR'ye alınmış ve çoğunda beklenen büyüklükte bant görülmüştür (Şekil 3.8-B2-b). "CTH40 check" primer çiftiyle sonuç vermeyip harici primer çiftiyle yapılan PZR sonucu beklenen büyüklükte bir bant veren CTH40KO klonlarından 3, 6 ve 7 seçilmiştir (Şekil 3.8-B2-a ve B2-b). Seçilen CYP6KO hatlar "K" harfiyle, CTH40KO hatlar "L" harfiyle, CTH90KO hatlar "M" harfiyle ve CTH115KO hatlar "N" harfiyle kodlanmıştır.

Sonraki adımda seçilen hatlarda KO edilen genlerin ekspresyonu incelenmiştir. Bunun için tüm KO hatlardan ve doğal ırk SB210'dan total RNA izolasyonu yapılmış ve ilgili proteaz genlerine spesifik tasarlanan primer çiftleriyle PZR kurulmuştur. Şekil 3.9-A'da görüldüğü üzere CYP6KO hatların karşılaştırıldığı SB210 RNA'sı (WT) hariç izole edilen RNA'ların hiçbirinde genomik DNA kontaminasyonu gözlenmemiştir. SB210'da bu genin ekspresyonunun genomik DNA kontaminasyonu kaynaklı görülmediği, daha sonra genomik DNA kontaminasyonu içermeyen bir SB210 cDNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PZR ile doğrulanmıştır (veri paylaşılmamıştır). CYP6KO hatlardan K4 ve K8'de DNaz bantlarının çok zayıf olduğu gözlenmiş, bu hatlardaki *CYP6* ekspresyonu noksanlığının nedeninin etkili çalışmayan kalıp cDNA olabileceği düşünülmüştür. CTH40KO hatlarında ilgili proteazların ekspresyonunun durdurulduğu, CTH115KO hatları ve K12'de ise gözle görülür oranda azaldığı görülmüştür. Bu nedenle sekretom çalışmaları için KO hat seçimi CTH40KO ve CTH115KO hatları arasında rastgele yapılmıştır. Sadece 2 klon hattında coDel ile hedef sekans eliminasyonu görülen CTH90KO hatlarından M5'de bu proteazın ifadesi hala SB210 hücreleriyle aynı seviyede devam etmiş, M6'da ise tamamen elimine edilmiştir. *In vitro* proteolitik aktivite analizlerine hedef proteaz genlerine ait ekspresyonların azaldığı/durdurulduğu K12, L3, M6 ve N8 hücre hatları ile devam edilmiştir.



Şekil 3.8. Pozitif *coDel* transformant kültürlerinde tek hücre klon hatlarının oluşturulması ve bu hatlarda hedef gen eliminasyonunun kontrol edilmesi. A) CTH40 “check” primerleri ile kurulan kontrollü PZR sonucu. B) CTH40KO hatlar hariç diğer KO tek hücre hatlarında tasarlan “check” primerleriyle hedef DNA dizisi eliminasyonu kontrol edilmiş, delesyon kaynaklı beklenen bantların (yeşil ok) görüldüğü hatlardan en fazla 3 tanesi (kırmızı yıldız ile işaretlenenler) ileriki çalışmalar için seçilmiştir. M: Gene Ruler 1-kb plus DNA Marker, ThermoScientific #SM1343.

Tetrahymena’da somatik KO hatlar yaratıldıktan sonra yapılan genetik manipülasyon, amitoz ile bölünme ve fenotipik ayrışmanın görüldüğü vejetatif büyüme evresinde bu hat kültürlerinde stabil bir şekilde devam edebilmelidir. Bu nedenle aktif çalışma sırasında zengin besiyeri içeren cam tüplerde stoklanan *Tetrahymena* KO hatlarının bu süreçte olası genomik değişimi incelenmiştir. Elde edilen KO hatlar par olmaksızın NEFF içeren cam tüplerde ~1 ay stoklanmış ve bu sürenin sonunda genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. “check” primerleriyle PZR kontrolü yapılan KO hatları genomik DNA’ları 1 ay öncesiyle karşılaştırıldığında (yıldız ile işaretli KO hatlar ile karşılık gelen işaretli hatlar) hiç bir hatta silinen proteaz geninin geri dönüşü (recovery) gözlenmemiştir (Şekil 3.9-B). Sonuç olarak 4



Şekil 3.9. *coDel* ile hedef sekans eliminasyonu görülen KO hatlarında silinen genlerin ekspresyon analizi ve ~1 ay cam tüp stoğunda tutulan KO hatların genomik kararlılığının belirlenmesi. A) Proteaz KO hatlarda silinen proteaz genlerinin mRNA ifade analizi sonuçları. KO hat gen eksp: cDNA kalıpları ile gene özgü primerlerin kullanıldığı PZR sonucu (CYP6KO:680 bç, CTH40:995 bç, CTH90: 600 bç ve CTH115: 600 bç), DNaz: cDNA kalıpları ile SB210 hücrelerinde ifade edildiği bilinen DNaz geni primerlerinin kullanıldığı PZR sonuçları. Genomik DNA kont.: RNA kalıpları ile DNaz primerlerinin kullanıldığı gDNA kontaminasyonu kontrol PZR sonucu. WT: SB210 ırkı cDNA kalıp; NK: negatif kontrol; PK: pozitif kontrol (SB210 ırkı gDNA kalıp. B) ~1 ay NEFF içeren cam tüplerde antibiyotiksiz stoklanan KO hücre hatlarından elde edilen gDNA'lar (* ile işaretlenmiştir) ile daha önce aynı hatlardan izole edilen gDNA'ların aynı "check" primer çiftleri ile karşılaştırılmıştır. Doğal ırk gDNA'sında (SB210) ve 1 ay stoklanan L3 gDNA'sında (* ile işaretlenmiştir) bant görülmesi (sağdaki jel) daha önce açıklandığı gibi bu hatta silinen proteaz geninin geri kazanımı olmadığını göstermektedir. Genomik kontrol için kullanılan primer çiftleri jel görüntüsü altında verilmiştir. M: Gene Ruler 1-kb plus DNA Marker, ThermoScientific #SM1343.

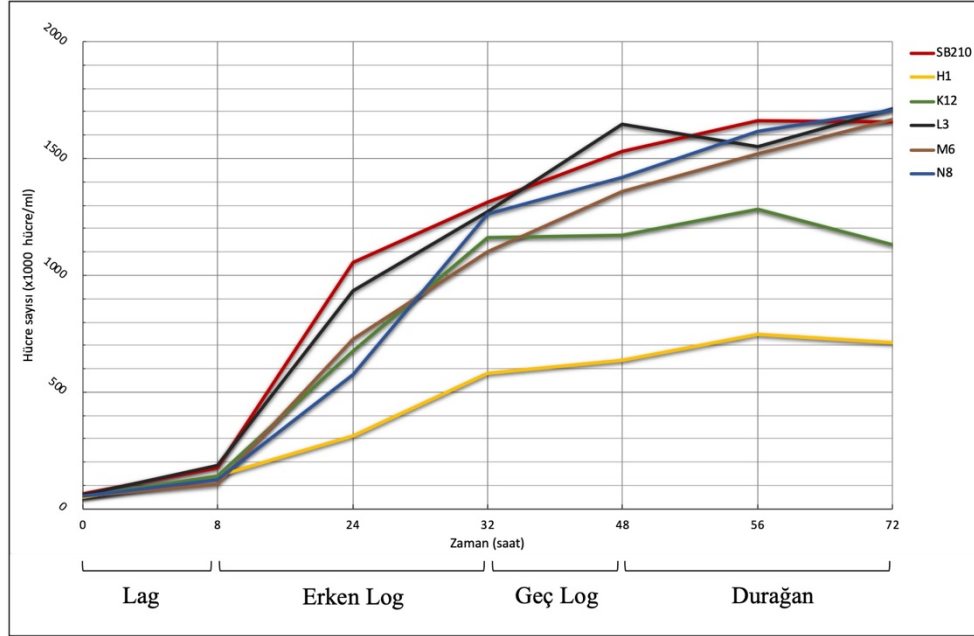
farklı sekretomal proteaz geninin KO edildiği, antibiyotik baskısı gibi herhangi bir kimyasal gerektirmeden kararlı bir genoma sahip *Tetrahymena* mutant hatları elde edilmiştir.

3.5. Flask Ortamında Doğal Suş SB210 ile Karşılaştırmalı Olarak Proteaz KO Hatlarına Ait Büyüme Eğrilerinin Çıkarılması

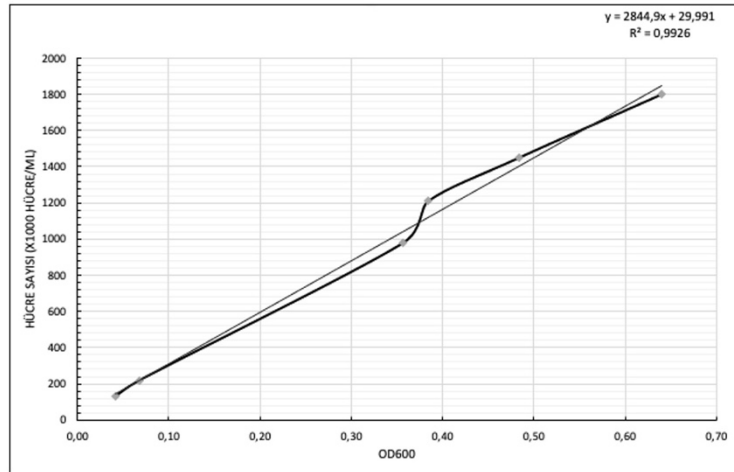
Rekombinant protein üretimi için elzem olan bir husus üretim konakçısının besiyerinde kültürize edildiğinde yüksek hücre yoğunluğuna çıkabilmesidir. Bu bakımdan KO edilen genlerin flask ortamında hücre büyümesine etkisinin belirlenmesi ve doğal suş ile karşılaştırılması oldukça önemlidir. Bu amaçla 5 proteaz KO hücre hattı (CTH34KO H1, CYP6KO K12, CTH40KO L3, CTH90KO M6, CTH115KO N8) sıvı nitrojenden canlandırılmış ve 50 ml NEFF içeren flasklara ~50.000 hücre/ml yoğunluk ile inoküle edilip 72. saate kadar takip edilmiştir. Ancak 6 flask kültürünü tekrarlı olarak mikroskop altında thoma lamıyla saymak zahmetli bir süreçtir. Bu nedenle hücre sayımı OD600 ölçümleriyle Şekil 3.10-B'deki standart grafiğe göre grafiğin OD-hücre sayısı dönüşüm formülü kullanılarak yapılmıştır. Bağımsız 3 deneysel tekrar ile oluşturulan *Tetrahymena* proteaz KO hücre hatları büyüme eğrisinde, SB210 hücre sayıları ve zamana bağlı artış oranları dikkate alınarak ilk 8 saat lag fazı, 8-32. saat arası erken log fazı, 32-48. saat arası geç log fazı ve 48. saat sonrası durağan faz olarak belirlenmiştir. Yaklaşık 50.000 hücre/ml hücre yoğunluğuyla başlanan grafikte (Şekil 3.10-A) doğal suş SB210'a kıyasla (kırmızı eğri) proteaz yoksunu ırklardan L3'ün (gri eğri) zamana bağlı büyüme eğrisinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir. Bu nedenle CTH40'ın genomdan silinmesi popülasyonun flask ortamında büyüme eğrisine herhangi bir etki göstermemektedir. Buna karşın durağan faza daha erken (~32. saat) girmiş olan H1 ve K12 hatlarıyla diğer KO hatlarda büyüme eğrisinin belirli fazlarında SB210'a kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düşüşler görülmüştür. H1 hattı hücrelerinde (sarı eğri) lag fazından sonra büyüme oldukça yavaşlamış ve en fazla ~750.000 hücre/ml yoğunluğa ulaşılabilmiştir. Erken log fazı sonunda hücre sayısını doğal suş seviyesine çıkarabilen K12 (yeşil eğri) kültürünün ise geç log fazında ve durağan fazda hücre sayısı yaklaşık aynı kalmıştır. Lag ve erken log fazında K12 ile benzer bir büyüme eğrisi sergileyen M6 (kahverengi eğri) ve N8 (mavi eğri) sırasıyla 48 ve 32 saat sonra genetik manipülasyona adaptasyon göstermiş ve hücre sayısında SB210 benzeri değişim

gözlenmiştir. Standart sapma barları ve SB210'a kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunan ($p \leq 0,05$) değerler EK-11'de verilen sütun grafikte gösterilmiştir.

A



B

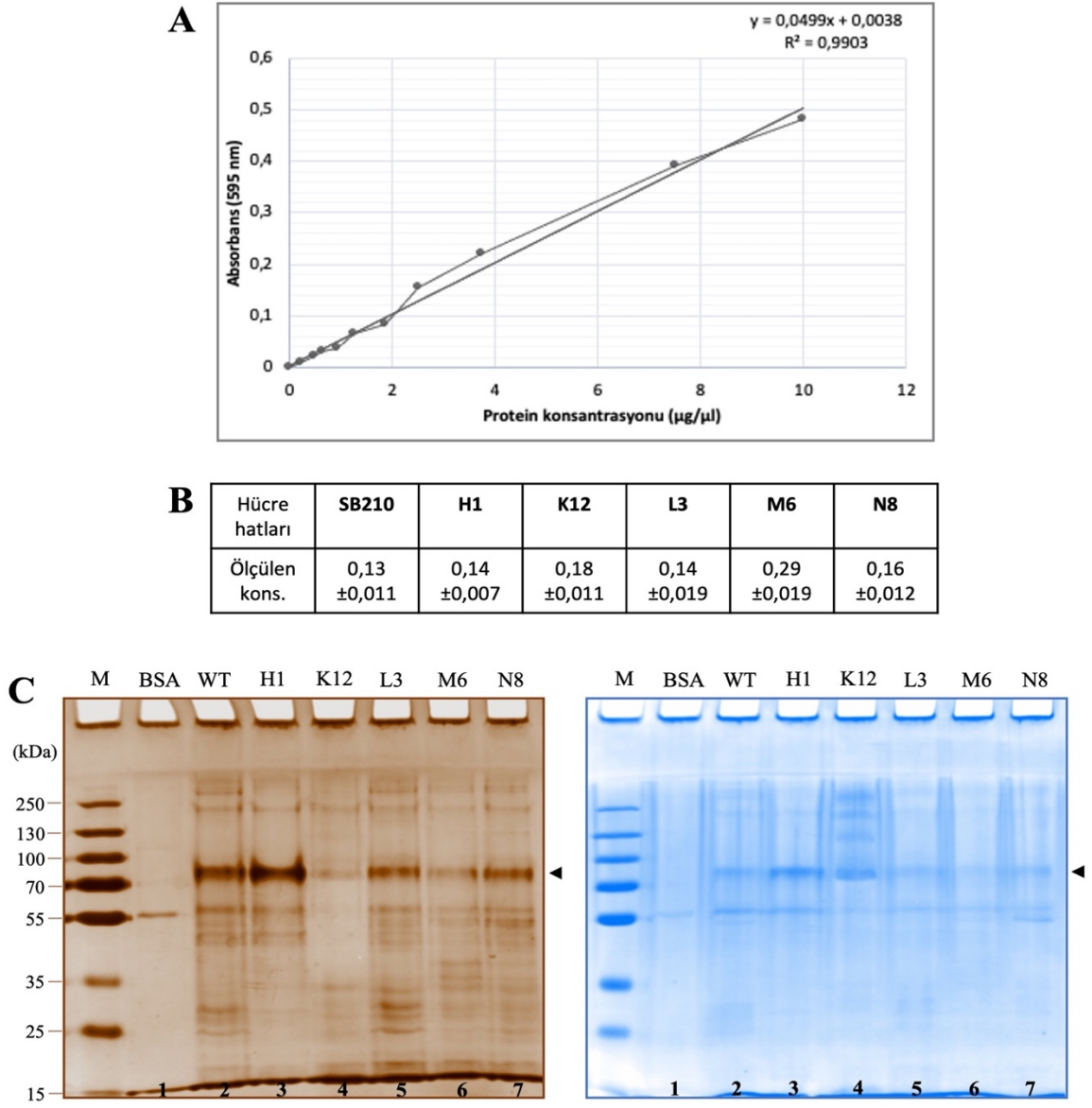


Şekil 3.10. Doğal suş SB210 ve KO hatların flask ortamında büyüme eğrisi karşılaştırması ile 600 nm optik yoğunluk değerine karşı hücre sayısı standart grafiği. A) SB210'un zamana bağlı hücre sayısı artışına göre belirlenen fazlarda KO edilen proteazların popülasyon büyümesine etkisi görülmektedir. Büyüme eğrilerinde renklerin temsil ettiği hücre kültürleri grafik üzerinde verilmiştir. B) SB210 flask kültürünün thoma'da sayılan hücre sayısı ile mikrotabak okuyucu yardımıyla alınan OD600 değeri arasındaki lineer ilişki ($R^2=0,99$) ve bu ilişkiyi ifade eden lineer eğri formülü gösterilmiştir (sağ üst köşedeki formülde x yerine OD600 değeri girilerek hesaplanan hücre sayısı bulunup bu sayı 1000 ile çarpılır).

3.6. *T. thermophila* KO Hatlarının *in vitro* Sekretomal Proteolitik Aktivite Karakterizasyonu

Yaklaşık aynı hücre sayısından başlatılıp log fazı sonu-durağan faz başlangıcına kadar büyütülen flask kültürlerinin aynı saatinden alınan hücresiz sekretom örnekleri 40 kat konsantre edilip protein miktar tayini yapılmış ve alikotlanarak saklanmıştır. Her tekrar çalışmasında yeni bir tüp (alikit) çıkarılmış ve daha önce sığır serum albümini (BSA) ile çıkarılan standart grafik (Şekil 3.11-A) referans alınarak sekretom protein konsantrasyonu hesaplaması yapılmıştır. Deney tekrarları sırasında kullanılan alikotlardan hesaplanan sekretom proteini konsantrasyon ortalamaları (mg/ml, N=6) Şekil 3.11-B’de standart hata değerleriyle beraber verilmiştir. Bradford ile hesaplanan protein konsantrasyonlarının doğruluğu, SB210 (WT) ve KO hat sekretom konsantrasyonları eşitlenip SDS-PAGE’de yürütülerek teyit edilmek istense de sekretom proteinleri SB210 ve KO ırkları arasında farklı bant profilleri oluşturmuş hem gümüş boyama hem de coomassie boyama sonucunda ana bant yoğunluklarında tekrarlı deneylere rağmen eşitsizlik gözlenmiştir (Şekil 3.11-C, ana bant siyah ok ile belirtilmiştir). Coomassie boyamasına göre protein bantlarını daha detaylı gösteren SDS-PAGE gümüş boyama sonucunda (Şekil 3.11-C, sol) SB210 ve KO sekretomları arasında çoğunlukla 15-55 kDa arasında bantlaşma ve bant yoğunluk farklılıkları görülmesine rağmen özellikle K12 sekretomunun yüklendiği 4. kuyu protein bantlarının hem sayı hem yoğunluk bakımından önemli derece düşük olduğu fark edilmektedir. Sekretom örneklerinin aynı miktarda yüklendiği ve coomassie boyamasının yapıldığı jel görüntüsünde (Şekil 3.11-C, sağ) aynı kuyuda ana bandın üzerinde 100-250 kDa hizalarında proteinlerin var olduğu ve ana bant ile bu bantların gümüş boyamayla boyanamadığı gözlenmiştir. İki jel boyama yöntemiyle de KO ırklar ve doğal ırk arasında protein miktarı eşitliğinin teyit edilebileceği bir referans bant belirlenememiştir.

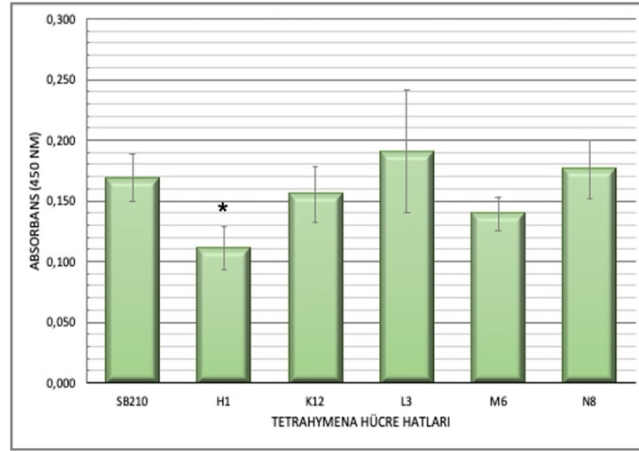
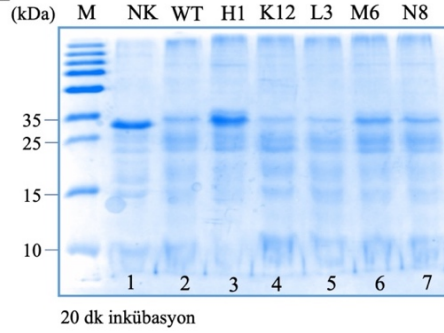
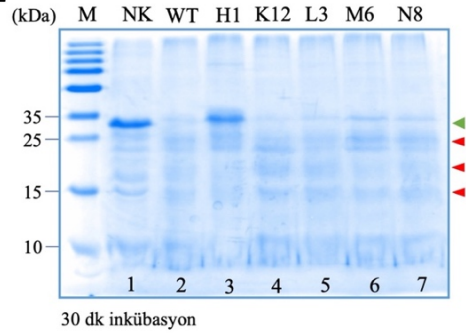
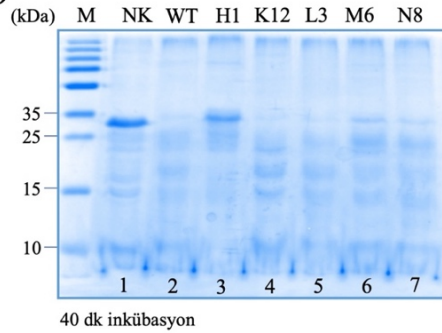
Sekretomal proteolitik aktivite analizi için SB210 ve KO sekretom örnekleri 3 bağımsız tekrarlı olarak süksinile kazein ile reaksiyona alınmıştır. CTH34KO hattı olan H1 hariç diğer proteaz yoksunu mutant ırkların sekretomal proteolitik aktivitesinde SB210 suşuna kıyasla



Şekil 3.11. 40 kat konsantre edilip alikotlanan SB210 ve KO flask kültürleri sekretom örneklerinin konsantrasyon tayini. Alikotlanan sekretomlarla yapılan her deney öncesi örneklerin bradford ile absorbans ölçümü alınmış ve daha önce oluşturulan standart eğri (A) formülüne göre ($R^2=0,99$) konsantrasyonları hesaplanmıştır. B) Hesaplanan sekretom konsantrasyonu ortalamaları ($N=6$) mg/ml cinsinden ortalamanın standart hatasıyla beraber verilmiştir. C) Konsantrasyon hesaplamasına göre eşitlenen SB210 ve KO ırkı sekretom örneklerinin 1 µg'ı %12 glisin SDS-PAGE jelinde yürütülmüş ve gümüş nitrat (sol) ya da coomassie (sağ) ile boyanmıştır. BSA (66,5 kDa) gümüş boyama için kontrol olarak eklenmiştir. Siyah ok: Sekretom proteinleri arasında en kalın gözüken ana bant, WT: SB210 ırkı sekretomu, M: PageRuler Plus, Prestained protein marker, #26619

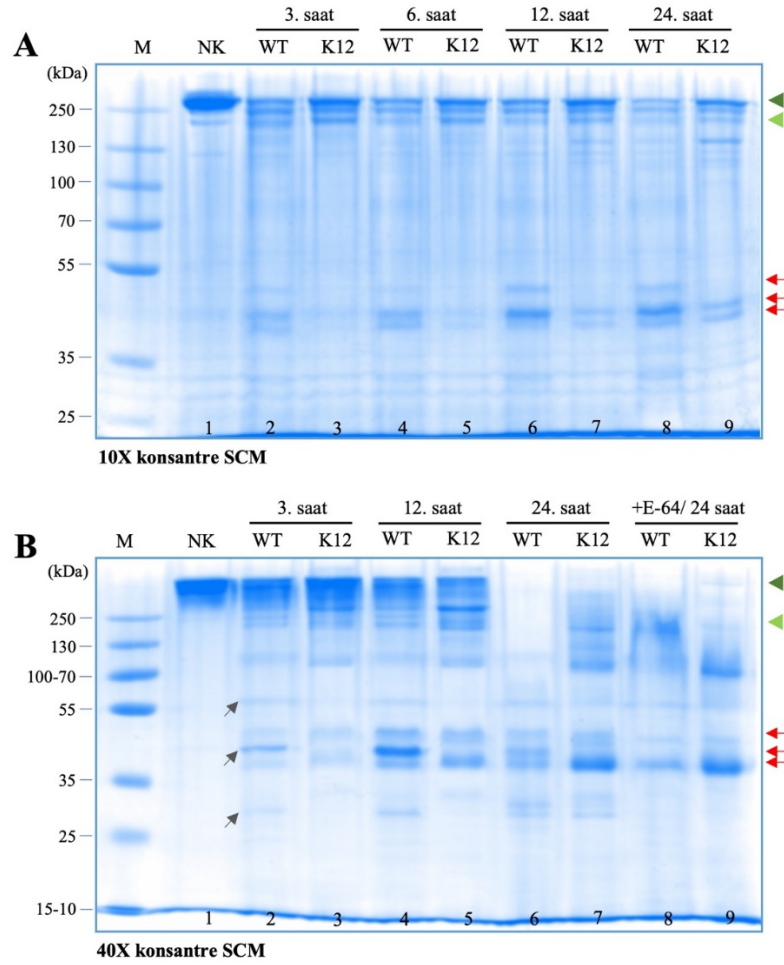
istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken H1 hattı sekretomunun proteolitik aktivitesinde, parçalanmış substrat miktarına karşılık gelen absorbans değerine göre %34,3 oranında anlamlı bir düşüş yakalanmıştır (Şekil 3.12, $p < 0,05$; $N=3$). Süksinile kazeinin substrat olarak kullanıldığı reaksiyondan kolorimetrik ölçüm sonrası alınan örnekler SDS-PAGE jelinde yürütüldüğünde H1 sekretomuyla muamele edilen substrat bandının daha yoğun kaldığı ve bu proteaz KO ırk sekretomunda SB210'a kıyasla daha düşük bir proteolitik aktivite görüldüğü doğrulanmıştır (Şekil 3.12-B1). Ayrıca sekretomların süksinile kazein ile inkübasyon süresi 40 dk'ya kadar uzatıldığında bile SB210, K12 ve L3 sekretomu kuyularında substratın neredeyse tamamen parçalandığı, bunun aksine H1 kuyusunda substrat bandının hala korunduğu (Şekil 3.12-B3) dikkat çekmektedir. Sonuç olarak *in vitro* aktivite deneylerinde, büyüme eğrisinin aynı saatinden alınıp eşit oranda konsantre edilen ve proteolitik aktiviteye eşit miktarda eklenen 5 proteaz KO hat sekretomundan sadece H1 sekretomunda istatistiksel olarak anlamlı bir proteolitik aktivite düşüşü görülmüş, bu da *Tetrahymena*'da MAK genomundan silinen proteazlar arasından sadece *CTH34*'ün sekretomal proteolizi yavaşlattığını bulgusunu ortaya çıkarmıştır. Nitekim CTH34KO hat H1'in kültürizasyonu sürecinde hücre sayısının düşük kalması ve KO karakterinin korunması için sürekli bir antibiyotik baskısına ihtiyaç duyulması, *CTH34*'ün olasılıkla hücre bölünmesini de kapsayan önemli bir biyolojik görev üstlenebileceğine işaret etmektedir.

Tez çalışmasının ilk zamanlarında SB210 ve KO kültür sekretomları 10 kat konsantre edilip eşit miktarda sekretom örnekleri süksinile kazein ile 1 saat reaksiyona alındığında, CYP6KO hat K12'nin sekretomal proteolitik aktivitesinde anlamlı bir düşüş olduğu görülmüş (veri sunulmamıştır), bu sebeple K12 sekretomu aynı zamanda Rtm ile de *in vitro* proteolitik aktiviteye alınmıştır. Reaksiyondaki miktarları eşitlenen (0,185 μ g) 10 kat konsantre sekretomlardan kaynaklanan Rtm dimer (Şekil 3.13, koyu yeşil ok) ve monomer (açık yeşil ok) degradasyonu, K12 sekretom kuyularında (Şekil 3.13-A, 3, 5, 7 ve 9. kuyu) zamana bağlı olarak çok daha yavaş artarken çalışılan tüm saatlerde kontrol olarak kullanılan doğal ırk SB210 kuyularında (2, 4, 6 ve 8) gözle görülür derecede daha hızlı parçalanma olduğu gözlenmiştir. Ayrıca SB210 sekretomu tarafından 35-55 kDa aralığında 3 belirgin band olarak parçalara bölünen substratın K12 sekretomu tarafından 2 belirgin banda parçalandığı (Şekil 3.13-A, kırmızı oklar) görülmektedir. İlerleyen zamanda SB210 ve KO hat sekretomları daha hassas ve güvenilir protein miktar ölçümü için 40 kat konsantre edilmiş

A**B1****B2****B3**

Şekil 3.12. SB210 ve proteaz KO hatların sekretomal proteolitik aktivitelerinin in vitro belirlenmesi. A) Proteaz KO hatlar ile SB210'un sekretomal peptidaz aktivitesi kantitatif olarak ölçülmüş (3 tekrarlı) ve ortalamalar sütun grafik olarak verilmiştir. Hata barları ölçülen değerlerin standart sapmasını vermektedir. * sembolü $p < 0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı sonucu belirtmektedir B) 30 °C'de 20 dk (B1), 30 dk (B2) ve 40 dk (B3) inkübasyona bırakılan aktivite reaksiyonundan optik okuma sonrasında 10 µl örnek alınmış ve %18 SDS-PAGE jelinde yürütülerek süksinile kazeinin (24 kDa) parçalanma profili görüntülenmiştir. Yeşil ok: kazein bandı; Kırmızı bantlar: kezeinden parçalanmış bantlar; M: PageRuler Plus, Prestained protein marker, #26619; NK: negatif kontrol.

ve eşitlenen sekretom protein miktarları süksinile kazein ile 20 dk muamele edilerek proteaz KO hatların sekretomal proteolitik aktivite değişimleri ölçülmüştür (Şekil 3.12-A). Bu deneyde K12 sekretomunda kazeine karşı istatistiksel olarak anlamlı bir aktivite düşüşü gözlenmemiştir. Fakat Rtm'ye karşı yapılan *in vitro* proteolitik aktivite deneyinde 40 kat konsantre SB210 ve K12'nin protein miktarları eşitlenmiş (0,825 µg) sekretomlarının substrat üzerinde zamana bağlı farklılaşmış bir parçalanmaya neden olduğu (Şekil 3.13-B) ve özellikle 24. saatte proteaz KO ırkı K12'nin aksine SB210 sekretom proteazlarının Rtm'yi tamamen parçaladığını görülmektedir (6 ve 7. kuyu). Bununla beraber bazı parçalanma bantlarının SB210 reaksiyonlarında 3. saatten itibaren görülmesine rağmen (gri oklar) bu bantların K12 reaksiyonlarında hiç gözlenmediği ya da 24. saatten itibaren görünür olduğu dikkat çekmektedir. E-64 sistein proteaz inhibitörünün eklendiği 8. ve 9. kuyularda proteolizin tam olarak durdurulamadığı fark edilmiştir. Bunun olası açıklaması ise ilave edilen inhibitör konsantrasyonunun sekretom protein miktarından fazla olması ve E-64'ün reaksiyona önceden eklenip proteaz inhibisyonu için gerekli sürenin verilmemesi nedeniyle yetersiz kaldığı olarak düşünülmüştür. Aynı muamele süresine rağmen 40 kat konsantre edilen sekretomların eklendiği reaksiyonlarda, 10 kat konsantre edilen sekretomların eklendiği reaksiyonlara kıyasla daha fazla degradasyon ve bantlaşma görülmesinin nedeni reaksiyondaki sekretom protein miktarlarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Şekil 3.13-A, 2, 3, 6, 7, 8 ve 9. kuyu ile Şekil 3.13-B, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7. kuyu).



Şekil 3.13. SB210 ile CYP6KO hat K12'nin 10 kat ve 40 kat konsantre edilen sekretomlarının Rtm substratına karşı gösterdiği zamana bağlı *in vitro* proteolitik aktivitesi. A) 3 μ g Rtm'nin 10 kat konsantre edilmiş ve 0,185 μ g'a ayarlanmış SB210 ve CYP6KO ırk K12 sekretomlarıyla zamana bağlı proteolitik degradasyon sonucu. B) A) 3 μ g Rtm'nin 40 kat konsantre edilmiş ve 0,825 μ g'a ayarlanmış SB210 ve CYP6KO ırk K12 sekretomlarıyla zamana bağlı E-64 eklenmiş (10 μ M) ve eklenmemiş proteolitik degradasyon sonucu. Koyu yeşil ok: dimer Rtm protein bandı (~300 kDa), Açık yeşil ok: monomer Rtm protein bandı (~150 kDa), Gri oklar: K12 sekretomunun sebep olduğu substrat degradasyonunda görülmeyip SB210'da görülen parçalanma bantları, Kırmızı oklar: İki jel görüntüsünde de Rtm'nin proteoliziyle oluşan ortak parçalanma bantları, NK: Negatif kontrol, WT: doğal ırk SB210 sekretomu, M: PageRuler Plus, Prestained protein marker, #26619.

4. TARTIŞMA

1960’lardan bu yana *Tetrahymena* türlerinde hem hücre içi hem de hücre dışı proteaz aktivitesinin araştırıldığı pek çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar genel olarak organizmanın besiyeri ortamına salgıladığı proteazların biyokimyasal ve enzimatik karakterizasyonunu, büyüme sırasında besiyerine ilave edilen metabolitlerin proteazlar dahil hidrolazların salgılanmasına etkisini, ekstraselüler proteazların kısmi saflaştırılmasını ve biyoreaktörde üretimini kapsamaktadır (Banno vd., 1982; Blum, 1975; De Coninck vd., 2000; Dickie & Liener, 1962; Levy vd., 1976; Straus vd., 1992). *T. thermophila*’nın sekretomuna salgıladığı belirli proteazların makroçekirdekten silindikten sonra sekretomal proteolitik aktivite değişiminin *in vitro* koşullarda araştırıldığı bu çalışmada, silinen proteazlar literatürde çeşitli *Tetrahymena* suşlarında hücre-dışı ortama salgılandığı belirlenmiş proteinlerdir (CTH34 peptidazı hariç) (Tablo 2.1, Referanslar).

Besiyerine salgılanan proteazların homojen olarak saflaştırılması, aktivite, moleküler ağırlık, optimum pH ve aktivite gösterdiği substrata dayalı grup ve/veya alt grubunun (katepsin L-benzeri, katepsin B-benzeri vb.) tahmin edilmesi ilk kez Banno ve arkadaşları tarafından yapılmış, *T. pyriformis* W suşundan izole edilen sekretomal sistein proteazın pH 6,5-8,0 arası maksimum aktivite gösterdiği, 22-23 kDa büyüklüğünde olduğu ve bu enzimin katepsin B-benzeri özellikler sergilediği raporlanmıştır (Banno vd., 1983). Suzuki ve arkadaşları yine *T. pyriformis*’ten ardışık kromatografik yöntemlerle 28 kDa büyüklüğünde papain ailesi sistein proteazlara ait bir sekretomal proteaz izole etmiş ve bu proteazı tetraain olarak isimlendirmişlerdir (Suzuki vd., 1997). Saflaştırması kısmen gerçekleştirilen tetraain, SDS-PAGE jelinde 26 ve 28 kDa büyüklüğünde iki bant olarak görülmüş, florojenik substrat seçiciliği bakımında ise katepsin B-benzeri sistein proteaz olabileceği tahmin edilmiştir. Ayrıca hücre kültürü logaritmik fazdan durağan faza geçerken tetraain salgılanmasının zamanla arttığı ve bu artışın dış ortamın toplam proteolitik aktivitesindeki yükseliş ile örtüştüğü gösterilmiştir. Bu bilgi tez kapsamında ortaya konan ilk bulguyla (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2) tutarlılık göstermektedir. Aynı yayında hücre inokülasyonundan itibaren kültür ortamının zamana bağlı artan proteolitik aktivitesi, BSA substratının jelde gözlenen parçalanma oranıyla temsil edilmiştir. *T. pyriformis*’te sekretom proteazlarından kaynaklı BSA’da (UniProt ID: P02769) görülen bu parçalanma paterni, BSA ile amino asit dizisi

bakımından %75,95 benzerlik gösteren (MUSCLE ile hizalama yapılmıştır) HSA'nın (UniProt ID: Q56G89) parçalanmasıyla örtüşmektedir (Şekil 3.1-A ve B). Tetraının homojen olarak saflaştırıldığı, aminoasit dizisinin belirlenip hizalandığı ve enzimatik karakterizasyonunun ortaya koyulduğu bir sonraki çalışmada (Suzuki vd., 1998), bu proteazın 330 amino asit uzunluğunda (ilk 16 amino asit sinyal dizisi, 103 amino asit proenzim dizisi ve 211 amino asit peptidaz dizisi) olduğu belirlenmiş, durağan fazda daha yüksek seviyelere çıktığı gösterilmiştir. Ayrıca homojen olarak saflaştırılan tetraının enzimatik ve dizisel özellikleri incelenmiş ve aslında katepsin L alt grubunun bir üyesi olduğu sonucuna varılmıştır. Yayında tam peptid dizisi verilen tetraın TGD'de aratılmış fakat gen ya da protein bazında herhangi bir bilgiye ulaşılamamıştır. Herrmann ve arkadaşları yayınlarında tetraının CYP6 homologu olduğunu belirtmesi üzerine (Herrmann vd., 2006) amino asit dizileri TGD'de blastlanmış ve *T. thermophila* CYP6 ile %76 benzerlik gösterdiği (E-skoru; 1e-134) görülmüştür (EK-10). Bu sebeple tetraın gibi CYP6'nın da sekretomda aktivite göstermesi ve saflaştırılabilecek kadar yüksek miktarda olması oldukça olasıdır. Nitekim CYP6-KO ırk sekretomunun (K12) süksinile kazeine karşı istatistiksel olarak anlamlı bir aktivite düşüşü göstermemesine rağmen Rtm'nin proteolizini gözle görülür derecede düşürmesi, bu olasılığı desteklemektedir. Fakat K12 hattı sekretomunun Rtm degradasyonunu ne kadar yavaşlattığı hususunda daha ileri kantitatif analizler gereklidir. Ayrıca bu sonuç *Tetrahymena* proteaz KO hatlarının farklı proteinlerde farklı etkiye sahip olabileceği ihtimalini de düşündürmektedir. Bunun dışında literatürde *Tetrahymena* sekretomundan saflaştırılan ve dizi bilgisi paylaşılan bir diğer proteaz ise pCyp (TTHERM_00881440) olarak isimlendirilen bir papain ailesi sistein proteazıdır. Fakat bu proteazın özellikle açlık evresinde ifade artışına sahip olduğu ve rekombinant protein üretim evresi olan vejetatif evrede çok az ifade edildiği raporlanmıştır (Karrer vd., 1993) (Tablo EK-1.1). Her ne kadar *T. thermophila* sekretomunda tesbit edilen bir proteaz olsa da vejetatif evrede ifadesi çok düşük olduğundan dolayı pCyp ile ilgili inceleme sınırlı tutulmuştur.

KO edilmek üzere *Tetrahymena* sekretom proteazlarının araştırılması, Madinger ve arkadaşlarının (2010) bu organizmada sekretom proteinlerinin (constitutive protein secretion) çalışması ile başlamıştır (Madinger vd., 2010). SB210'un da dahil olduğu 3 ırkta zengin besiyeri ve açlık koşullarında sekretomda bulunan proteinlerin kütle spektrometresiyle kimliklendirdirilmesi yapılmış ve yayının ek belgelerinde SB210, SB281

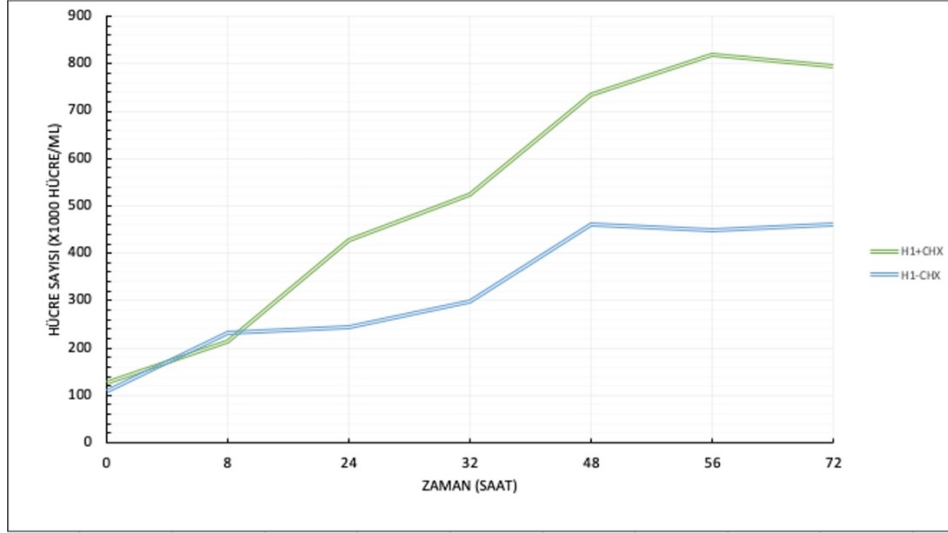
ve CU428 suşu zengin besiyeri ortamında tesbit edilen sekretom proteinleri listelenmiştir (Ek Tablo-4). Listede sekretomal proteazlar seçilip TGD veritabanında mRNA ekspresyon seviyesine göre Tablo EK-1.1’de sıralanmıştır. SB21 ırkında MAK genomunda ifade edildiği iddia edilen ilk 5 proteaz geni bu tez çalışmasında aynı ırkın genomundan silinerek mutant ırklar oluşturulmuştur. KO edilip sekretomal proteolitik aktivite düşüşünün en yüksek görüldüğü gen olan *CTH34*’ün kodladığı proteaz Madinger ve arkadaşlarının (2010) tesbit ettiği sekretom proteinlerinden biri değildir. Yayında SB210 da dahil flaskta çalkalamalı büyütülen 3 *Tetrahymena* ırkının durağan faz dış ortamı konsantre edilmiş ve SDS-PAGE jelde yürütülmesiyle elde edilen sekretom protein bantları (makalede 1 nolu şekil, 4. kuyu), bu tezde sunulan SB210 sekretomu bantlarıyla (Şekil 3.11-C, 2. kuyu, gümüş boyama jelinde 250 kDa üzerinde görülen bantlar hariç) büyüklük olarak karşılaştırılmıştır. İki şekilde de belirgin olan bantların benzer büyüklüklere denk geldiği gözlenmiştir (bant büyüklükleri protein belirteçlerine göre tahmin edilmiştir). *T. thermophila* kültürünün sekretoma salgıladığı baskın peptidazları kimliklendirmek için yapılan bir diğer çalışmada (Herrmann vd., 2006), organizmanın dış ortama salgıladığı proteazların büyük çoğunluğunun sistein proteazlar olduğu bilgisinden (Straus vd., 1992) yola çıkılarak, sistein proteazlara yüksek afinite ve özgünlükte bağlanan E-64 inhibitörünün kullanıldığı bir afinite stratejisi geliştirilmiştir. Bahsi geçen yayında bu tez çalışmasında KO edilen CYP6 ve CTH115’in de bulunduğu 6 proteazın sekretomda baskın olduğu sonucuna varılmıştır. Bu proteazları kodlayan genlerin ifade seviyelerinin görece yüksek olması (Şekil EK1-1) tezde KO edilecek proteazların hedeflenmesi için uygulanan yaklaşımın mantıklı olduğunu göstermektedir. Ayrıca Herrmann ve ark. tarafından dış ortamda tesbit edilen bu 6 peptidaz Madinger ve ark.’nın yayınında da zengin besiyeri ortamında kimliklendirilen proteazlar arasındadır. Bu proteazlardan CYP6’nın KO edilmesi kazeinden ziyade Rtm’ye karşı sekretomal proteolitik aktivite düşüşüne neden olurken CTH115’in KO edilmesi kazeine karşı aktivite düşüşüne anlamlı bir katkı sağlamamıştır. Bu nedenle CTH115-KO mutant ırkının başka substratlar ile araştırılmasına ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır.

Madinger’in yayınında (2010) tesbit edilen *CTH40* ve *CTH90* genlerinin ifade seviyeleri “baskın” proteazlardan yüksek olmasına rağmen Herrmann’ın (2006) çalışmasında E-64 afinitesiyle dış ortamda yakalanamamış olması değinilmesi gereken bir diğer konudur. Bu durum ilk olarak CTH40 ve CTH90’ın kültür ortamına salgılanmak yerine daha çok hücre

içi endozomal ve/veya lizozomal yapılarda lokalize olabileceği ve belirli bir fazda ya da bir tepki oluşturmak için salgılanabileceğini düşündürmektedir. Literatürde *T. pyriformis* lizozomal yapıların sükroz yoğunluk sedimentasyonu yoluyla fraksiyonlara ayrılabilirdiği ve bu fraksiyonların proteazlar da dahil asit hidrolaz içeriklerinin farklılaştığı bildirilmekte, tercihen yüksek yoğunluklarda gelen lizozomlardan hücre dışına salgılama yapıldığı iddia edilmektedir (Blum, 1976; Müller vd., 1966). Daha yakın tarihli bir çalışma, *T. thermophila*'da CTH40 gibi bir diğer catepsin B-benzeri sistein proteaz olan CTH39'un (TTHERM_00083480) fagozomda görevli bir protein olduğunu ve CTH39-GFP ile oluşturulan füzyon proteinin *Tetrahymena* fagozomlarının lumeninde lokalize olduğunu göstermiştir (Jacobs vd., 2006). Tablo EK-1.1'de ekspresyon seviyesine göre 4. sırada olan bu peptidaz CTH40 ile %67 amino asit dizi benzerliği göstermektedir. Bu durum, hücre dış ortamında tesbit edilen proteazların birincil görevlerinin ekstraselüler degradasyon olmayabileceği ve fazla miktarda ifade edilseler bile sekretomda miktarsal olarak azınlıkta kalabileceklerini işaret etmektedir. Bu açıdan bakıldığında CTH40-KO ve CTH90-KO hatlarda sekretomal proteolitik aktivite düşüşü görülmemesi bu peptidazların asli olarak intraselüler veziküllerde görevli olmalarıyla açıklanabilir sonucuna varılmıştır.

Salgılatma sinyal peptidi bulundurma ile ekspresyon seviyesinin yüksekliği dikkate alınarak seçilen *CTH34*'ün gen kopyalarının kısmen silinmesi ile ifadesinin baskılanması, SB210 ırkında %34'lük bir proteolitik aktivite kaybına neden olmuştur. Ancak bu gen somatik KO yöntemiyle hiçbir şekilde MAK genomundan tamamen silinememiş ve ifadesinin baskılandığı KO hattı H1'in flask kültüründeki hücre sayısının yüksek derecede düşmesine neden olmuştur. Bu durum ilk olarak proteazın regülatif bir görevinin olabileceğini akla getirmekle beraber flask kültüründe hücre sayısındaki azalmanın nedeni olarak ortama eklenen CHX baskısı da düşünülebilir. Bunun üzerine H1 hattı hücreleri CHX baskısının hücre sayısına etkisinin gözlenmesi için CHX içeren ve içermeyen flasklara ekilmiştir ve CHX içermeyen flask kültüründe H1'in hücre sayısının daha da düştüğü gözlenmiştir (Şekil 4.1). İkinci olarak literatürde *Tetrahymena* katepsinleriyle (katepsin lizozomal proteazların genel ismidir) ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında aspartil katepsin CTH3'ün (TTHERM_00321680) peptid sekresyonunu sağlayan mukozist kesiciklerinin oluşumu için gerekli GRL (granule lattice) propeptidini işleyerek fonksiyonel hale getirdiği ve CTH4'ün (sistein katepsin, TTHERM_00445920) de GRL proteinlerinin normal

kesilmesini ve işlevsel mukozist oluşumunu sağladığı bildirilmiştir (Kumar vd., 2014, 2015). Bu açıdan düşünüldüğünde CTH34 proteinin de hücrede proliferasyonu etkileyen hayati bir regülatif görevinin olması oldukça olasıdır. Son olarak ise CHX'in çeşitli hücre kültürlerinde çift zincir kırığı oluşturarak DNA hasarı yaratmak için kullanılması (Gonzalez-Suarez vd., 2009; Tsabar vd., 2015), yoğun CHX baskısında tutulan ve kültürlene edilen CTH34-KO ırk H1'de bu antibiyotik DNA bozulmasından kaynaklı hücre büyümesinin etkilemesine neden olmuş olabilir. CTH34'ün hücre proliferasyonu ile ilişkili bir fonksiyonunun olup olmadığı, bu genin germ hattı KO yaklaşımlarıyla (homolog rekombinasyon ya da CRISPR/Cas9 ile) MİK'ten silinip star hat çaprazlamasıyla elde edilen homozigot KO soyunun yaşayamadığının teyit edilmesiyle öğrenilebilir. MİK KO hattın hayatta kalması durumunda düşük hücre sayısına rağmen doğal suş ile karşılaştırmalı olarak bir model substrat protein seçilmeli ve rekombinant protein üretim verimliliğine etkisi sınanmalıdır. Çünkü hücre sayısı dezavantajına rağmen düşen sekretom proteolizinin toplam verimi yükseltmesi de bir olasılıktır.



Şekil 4.1. Flask kültürizasyonu sırasında CHX eklenmemesinin CTH34KO hattı H1 klonu hücre sayısına etkisi. "Materyal ve Yöntem" bölümünün 2.5 başlığında açıklanan protokol aynı şekilde uygulanmış fakat eşit sayıda H1 hattı hücresi ekilen bir flaska 240 µg/ml CHX ve 0,05 µg/ml CdCl₂ eklenirken diğer flaska eklenmemiştir. Bu durumda büyüme eğrisinde lag fazı olarak belirtilen ilk 8 saat sonrasında CHX eklenmeyen flask kültüründe hücre sayısının çok yavaş arttığı gözlenmiştir. Deney 1 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Hem kantitatif hem de kalitatif *in vitro* proteolitik aktivite deneylerinde proteaz yoksunu mutant *Tetrahymena* kültürleri ve doğal SB210 kültürü arasında sekretoma salgılanan proteazlardan kaynaklanan proteolitik aktivitelerin tarafsız bir şekilde karşılaştırılabilmesi için flask kültürlerine aynı hücre sayılarıyla inokülasyon yapılmış, birbirine yakın fazlardan (log fazı sonu/durağan faz başlangıcı) aynı zamanda sekretom toplanarak aynı konsantrasyon prosedüründen geçirilmiş ve her deneye eşit miktarda protein yüklenmiştir. Bu çalışma sekretomal proteolitik aktivite değişimini temel olarak reaksiyona eklenen toplam protein miktarı eşitliğine göre değerlendirmiştir. Bu nedenle sekretom konsantrasyon ölçüm güvenilirliğini arttırmak için sekretom proteinleri 40 kat konsantre edilmiş, böylece toplam sekretom protein miktarı bradford ile ölçülebilir aralığa çekilmiştir. Alikotlanarak -80 °C’de muhafaza edilen sekretom örnekleri her çalışma için bir kez çözülmüş, kullanılan her alikotun önce protein konsantrasyonu ölçülmüş ve ölçümlerde ciddi bir sapma olmadığı teyit edilmiştir (Şekil 3.11-B). Bradford ile ölçülen protein konsantrasyonlarına dayalı eşitlenen protein miktarlarının gerçekten eşit olduğunun teyidi için sekretomlar ayrıca SDS-PAGE jellerinde yürütülüp hem gümüş nitrat hem de coomassie ile boyanmıştır (Şekil 3.11-C). Fakat iki boyamada da mutant ırk ve SB210 sekretomlarının birbirinden bant çeşitliliği ile bant yoğunluğu açısından oldukça farklılaştığı gözlenmiştir. Bunun birinci nedeni genomdan silinen/ ifadesi baskılanan proteaz genlerinin hücresel bir fonksiyonu (örneğin direk veya indirek transkripsiyonel veya post-transkripsiyonel regülasyon ile) kontrol eden bir sinyal kaskadının parçası olması ve bu nedenle yoksunluğunda başka sekretom proteinlerinin protein ifadesinin azalmasına veya artmasına neden olmasıdır. H1 (CTH34-KO) ve K12 (CYP-KO) kültürlerinde yapılan proteaz delesyonunun/ baskılanmasının flask kültürü büyüme eğrisini etkilemesi, böyle bir etkinin hipotetik olarak bulunduğu kabulü ile açıklanabilir. İkincisi ise organizma tarafından sekretoma salgılanan diğer endojen proteinlerin de sekretom proteazları tarafından direk veya indirek degrade ediliyor veya edilemiyor olması şeklinde bir hipotez ile açıklanabilir. Bu durumda proteaz yoksunu ırk sekretomlarında silinen proteaz genine bağlı daha az parçalanma olacağından dolayı doğal ırk sekretomunun KO ırk sekretomlarından daha fazla bir protein bantlaşması (veya daha az bir protein bantlaşması) gösteriyor olması mümkün olur. Şekil 3.11-C’de gümüş nitratla boyanan jelde (sol) 2, 3, 5, 6 ve 7. kuyulardaki ~70 kDa hizasında olan ana protein bant yoğunluğu ile bu protein altında oluşan bantlaşma sayısı

dikkate alındığında kabaca bant yoğunluğu azaldıkça bantlaşma sayısının artması bu duruma örnek olarak verilebilir. Bunun tek istisnası K12 sekretomunun yüklendiği 4. kuyudur. Ancak ilginç bir şekilde bu kuyuda gümüş nitrat ile belirgin olmayan ana protein bandı ile üstündeki bantların aynı miktarda protein yüklenen coomassie boyanmış jelde (sağ) oldukça yoğun görülmesi, bu hipotezi destekleyen örnek bir durum olarak verilebilir. Bu noktada gümüş nitrat boyamasıyla ilgili literatür incelendiğinde boyama metodunun çalışma prensibine bağlı olarak bazı proteinleri boyayamadığı (negatif boyama); yani bant görünümü ve yoğunluğunun protein miktarından çok özellikle proteinin amino asit dizisi tarafından indirgenen gümüş zerreciklerinin (silver grains) miktarına bağlı olduğu görülmektedir (Hempelmann ve Krafts, 2017; Yüksel ve Gracy, 1985). Sonuç olarak belirtilen iki sebepten herhangi biri (ya da her ikisi) nedeniyle protein miktarı eşitliği SDS-PAGE ile teyit edilemese de alikotlar arası bradford ölçümlerinin tutarlılığı konsantrasyon ölçümlerinin güvenilir olduğunu göstermiştir. Bu nedenle proteaz KO klonlarının SDS-PAGE gümüş boyama protein patternlerinin silinen genlere bağlı değişim göstererek oluştuğu sonucuna varılmıştır.

Hücre dışına salgılandığı bilinen ve hücrede yüksek ekspresyon seviyesine sahip 5 sistein proteaz kodlayıcı genin her biri *T. thermophila* SB210 suşu somatik makroçekirdek genomundan silinerek proteaz KO hat oluşturulmuş ve bu KO hatlardan sadece birinde %34,3'lük bir sekretomal proteolitik aktivite düşüşü bulunmuştur. Ayrıca mevcut bulgular *Tetrahymena*'da bir proteazın sekretoma salgılanıyor olmasının ve mRNA ifade seviyesinin vejetatif evrede yüksek olmasının, dış ortamdaki katalitik aktivitesiyle ve miktarıyla doğrudan ilişkili olmayabileceğini göstermektedir. Bu nedenle biyoteknolojik rekombinant protein üretim verimliliği yüksek hücre hatlarının yapılandırılabilmesi için alternatif çözümlere ihtiyaç olduğu anlaşılmaktadır. Bu bağlamda son yıllarda medikal amaçlı rekombinant protein üretimi için en çok tercih edilen memeli (özellikle CHO) hücre hatlarında üretilmesi amaçlanan biyofarmasötik proteinin dizisi, yapısı ve biyolojik özelliklerine spesifik geliştirilen mutant hücre üretimi ile sorun çözümlenmeye çalışılmaktadır. Örneğin CHO'da "üretilmesi zor (difficult to express, DTE)" proteinlerden olduğu belirtilen TIMP-2 ve TIMP-3'ün (metalloproteinaz doku inhibitörleri) rekombinant üretimi sürecinde bu proteinlerin üretimini kısıtlayan adımın "post-translasyonel işlemler" olduğu belirlenmiştir. Sonrasında bu sınırlama, furin proteazının natif kesim bölgesiyle sekretuvar büyüme hormonunun pro-dizisinde kısa bir bölgenin birleştirilerek bir füzyon

proteini oluşturulması ve rekombinant biyofarmasötik proteinin hücrede üretimiyle eş zamanlı olarak yüksek furin ifadesiyle çözülmüştür (Hussain vd., 2017). Ürün-spesifik çözüm yaklaşımları sadece ürün miktarını arttırmaya değil glikoproteinler için glikan heterojenitesini düşürmeye yönelik de geliştirilmektedir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada N-bağlı glikosilasyonda belirleyici adımları kontrol eden anahtar genleri belirlemek amacıyla CHO glikosiltransferazlarında bir KO görüntüleme taraması gerçekleştirilmiş ve CHO hücrelerinin KO edilen glikosiltransferazları tolere ettiği gösterilmiştir. Bu sayede CHO hattında yapılan tekli ya da çoklu glikotransferaz KO'ları ile siyalik asitsiz ama çoklu LacNAc içeren EPO ve α 6-fukosilasyon yoksunu homojen biantenar yapıda N-glikan içeren IgG üretilmiştir (Yang vd., 2015). Bu açıdan *Tetrahymena*'da da benzer bir yaklaşımla üretilmesi amaçlanan rekombinant proteine sipesifik sekretomal proteazların belirlenip genomdan silinmesi ve üretim verimliliğinin sınırlı proteaz silinmesi şartlarında değerlendirilmesi, proteazlarca zengin bir organizmada heterolog protein üretimi için daha doğrudan bir yaklaşım olacaktır. *Tetrahymena*'nın biyolojik avantajları da göz önüne alındığında (genomik manipülasyonun kolaylığı ve KO edilen genlerin tek bir çaprazlamayla homozigot olarak ifade edilebilmesi gibi) rekombinant üretilen proteini parçaladığı tesbit edilen proteazların tekli/çoklu KO kombinasyonu ile üretilen mutantlar ile canlılığa negatif etkisinin en az olduğu fakat üretim verimliliğine etkisinin en fazla olduğu mutant ırkların geliştirilmesi bu tez çalışmasının önerdiği bir sonraki adımdır.

5. SONUÇ

Tetrahymen thermophila SB210 suşunda hücre dışına salgılandığı ve ekspresyon seviyesi yüksek olduğu literatüre göre öngörülen 5 proteaz geni belirlenerek, farklı iki yöntem ile organizmanın makçekirdek genomundan silinmiş veya büyük oranda baskılanmıştır. KO hatların bu genetik modifikasyonu popülasyon büyümesine ve sekretomal proteolitik aktiviteye etkisi tanımlanmış, sekretomal proteolizin %34,3 oranında düşen CTH34KO hattının H1 klonunun büyüme eğrisinin de kontrole göre düşen bir eğri gösterdiği bulunmuştur. CYP6KO hattının K12 klonu ise kazeine karşı anlamlı bir proteolitik aktivite düşüşü göstermese de ticari ilaç molekülü ritüksimab substratının parçalanmasını yavaşlatmış, fakat bu mutant hattın büyüme eğrisinin de proteaz delesyonundan olumsuz etkilendiği bulunmuştur. Bu bulgular ışığında *Tetrahymena* sekretomunda önemli bir proteolitik aktivite düşüşüne neden olabilecek proteazların hücrede regülatör görevi de üstlenebileceği bulunmuştur. Fakat bu mutant hatların flask yerine optimum çoğalma şartları sağlayan biyoreaktörde tekrar tanımlanması gerektiği ortaya çıkmıştır. Rekombinant üretilmesi amaçlanan proteinler üzerindeki degradasyon oranının sekretomda yüksek ifade edilen belirli proteazlardan ziyade rekombinant proteinin amino asit dizisine bağlı olarak değiştiği sonucuna varılmıştır. Bu sebeple üretilmek istenen rekombinant proteine özgün, hücre bölünmesini etkilemeyecek proteazların kimliklendirilmesi ve germ hattı KO yöntemleriyle (homolog MİK knock-out'u veya CRİSPR/Cas9 KO'u) daha kararlı mutant ırklarının oluşturularak araştırmaların bu yönde devam ettirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKÇA

- Alam, S., Banno, Y., & Nozawa, Y. (1993). Purification and Characterization of Phospholipase C Preferentially Hydrolysing Phosphatidylcholine in *Tetrahymena* Membranes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 40(6), 775-781. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1993.tb04473.x>
- Aldag, I., Bockau, U., Rossdorf, J., Laarmann, S., Raaben, W., Herrmann, L., Weide, T., & Hartmann, M. W. (2011). Expression, secretion and surface display of a human alkaline phosphatase by the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *BMC Biotechnology*, 11(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-11>
- Allen, S. L. (1967). Genomic Exclusion: A Rapid Means for Inducing Homozygous Diploid Lines in *Tetrahymena pyriformis*, Syngen 1. *Science*, 155(3762), 575-577. <https://doi.org/10.1126/science.155.3762.575>
- Allen, S. L., & Nanney, D. L. (1958). An analysis of nuclear differentiation in the selfers of *Tetrahymena*. *Am. Nat.*, 92(864), 139-160.
- Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, 37(4), 420-423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
- Arai, H., Inoue, K., Natori, Y., Banno, Y., Nozawa, Y., & Nojima, S. (1985). Intracellular Phospholipase Activities of *Tetrahymena pyriformis* 1. *The Journal of Biochemistry*, 97(6), 1525-1532. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135209>
- Banno, Y., & Nozawa, Y. (1985). Purification and Characterization of Lysosomal α -Glucosidase Secreted by Eukaryote *Tetrahymena* 1. *The Journal of Biochemistry*, 97(2), 409-418. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135075>
- Banno, Y., Yano, K., & Nozawa, Y. (1982). Biochemical Characterization of Secreted Proteases During Growth in *Tetrahymena pyriformis* WH-14: Comparison of Extracellular with Intracellular Proteases. *The Journal of Protozoology*, 29(1), 91-98. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1982.tb02886.x>
- Banno, Y., Yano, K., & Nozawa, Y. (1983). Purification and Characterization of a Secreted Protease from *Tetrahymena pyriformis*. *European Journal of Biochemistry*, 132(3), 563-568. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07400.x>
- Blum, J. J. (1975). Effects of metabolites present during growth of *Tetrahymena pyriformis* on the subsequent secretion of lysosomal hydrolases. *Journal of Cellular Physiology*, 86(1), 131-142. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040860115>
- Blum, J. J. (1976). Lysosomal hydrolase secretion by *Tetrahymena*: A comparison of several intralysosomal enzymes with the isoenzymes released into the medium. *Journal of Cellular Physiology*, 89(3), 457-472. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040890311>
- Boldrin, F., Santovito, G., Gaertig, J., Wloga, D., Cassidy-Hanley, D., Clark, T. G., & Piccinni, E. (2006). Metallothionein Gene from *Tetrahymena thermophila* with a

- Copper-Inducible-Repressible Promoter. *Eukaryotic Cell*, 5(2), 422-425.
<https://doi.org/10.1128/EC.5.2.422-425.2006>
- Brown, J. M., Marsala, C., Kosoy, R., & Gaertig, J. (1999). Kinesin-II Is Preferentially Targeted to Assembling Cilia and Is Required for Ciliogenesis and Normal Cytokinesis in *Tetrahymena*. *Molecular Biology of the Cell*, 10(10), 3081-3096.
<https://doi.org/10.1091/mbc.10.10.3081>
- Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., & Allis, C. D. (1996). Tetrahymena Histone Acetyltransferase A: A Homolog to Yeast Gcn5p Linking Histone Acetylation to Gene Activation. *Cell*, 84(6), 843-851.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81063-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81063-6)
- Bruns, P. J., Brussard, T. B., & Kavka, A. B. (1976). Isolation of homozygous mutants after induced self-fertilization in Tetrahymena. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(9), 3243-3247. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.9.3243>
- Calow, J., Behrens, A.-J., Mader, S., Bockau, U., Struwe, W. B., Harvey, D. J., Cormann, K. U., Nowaczyk, M. M., Loser, K., Schinor, D., Hartmann, M. W. W., & Crispin, M. (2016). Antibody production using a ciliate generates unusual antibody glycoforms displaying enhanced cell-killing activity. *MAbs*, 8(8), 1498-1511.
<https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1228504>
- Cassidy-Hanley, D., Bowen, J., Lee, J. H., Cole, E., VerPlank, L. A., Gaertig, J., Gorovsky, M. A., & Bruns, P. J. (1997). Germline and Somatic Transformation of Mating Tetrahymena thermophila by Particle Bombardment. *Genetics*, 146(1), 135-147.
<https://doi.org/10.1093/genetics/146.1.135>
- Cervantes, M. D., Coyne, R. S., Xi, X., & Yao, M.-C. (2006). The Condensin Complex Is Essential for Amitotic Segregation of Bulk Chromosomes, but Not Nucleoli, in the Ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Molecular and Cellular Biology*, 26(12), 4690-4700.
<https://doi.org/10.1128/MCB.02315-05>
- Cole, E. S., & Bruns, P. J. (1992). Uniparental cytogamy: A novel method for bringing micronuclear mutations of Tetrahymena into homozygous macronuclear expression with precocious sexual maturity. *Genetics*, 132(4), 1017-1031.
<https://doi.org/10.1093/genetics/132.4.1017>
- Collins, K. (2011). *Production of aglycosylated monoclonal antibodies in ciliates* (World Intellectual Property Organization Patent Sy WO2011/116387A1).
- Collins, K. (Ed.). (2012). *Tetrahymena thermophila* (1st ed). Elsevier/Academic Press.
- Cowan, G. J. M., Bockau, U., Eleni-Muus, J., Aldag, I., Samuel, K., Creasey, A. M., Hartmann, M. W. W., & Cavanagh, D. R. (2014). A Novel Malaria Vaccine Candidate Antigen Expressed in Tetrahymena thermophila. *PLoS ONE*, 9(1), e87198.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087198>
- Craik, D. J., Fairlie, D. P., Liras, S., & Price, D. (2013). The Future of Peptide-based Drugs: Peptides in Drug Development. *Chemical Biology & Drug Design*, 81(1), 136-147.
<https://doi.org/10.1111/cbdd.12055>

- Çalışeki, M., Üstüntanır Dede, A. F., & Arslanyolu, M. (2021). Characterization and use of *Tetrahymena thermophila* artificial chromosome 2 (TtAC2) constructed by biomimetic of macronuclear rDNA minichromosome. *Microbiological Research*, 248, 126764. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126764>
- De Coninck, J., Verdier-Denantes, I., Duyme, F., Bouquelet, S., & Dumortier, V. (2000). Modeling *Tetrahymena thermophila* growth and protease production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25(1), 58-61. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000013>
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 10.
- Dickie, N., & Liener, I. E. (1962). A study of the proteolytic system of *Tetrahymena pyriformis* W I. Purification and partial characterization of the constituent proteinases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 64(1), 41-51. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(62\)90758-8](https://doi.org/10.1016/0006-3002(62)90758-8)
- Dirghangi, S. S., & Pagani, M. (2013). Hydrogen isotope fractionation during lipid biosynthesis by *Tetrahymena thermophila*. *Organic Geochemistry*, 64, 105-111. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2013.09.007>
- Doerder, F. P., Lief, J. H., & Doerder, L. E. (1975). A Corrected Table For Macronuclear Assortment In *Tetrahymena Pyriformis* , Syngen 1. *Genetics*, 80(2), 263-265. <https://doi.org/10.1093/genetics/80.2.263>
- Dorai, H., Santiago, A., Campbell, M., Tang, Q. M., Lewis, M. J., Wang, Y., Lu, Q.-Z., Wu, S.-L., & Hancock, W. (2011). Characterization of the proteases involved in the N-terminal clipping of glucagon-like-peptide-1-antibody fusion proteins. *Biotechnology Progress*, 27(1), 220-231. <https://doi.org/10.1002/btpr.537>
- Dorey, E. (2021). Biopharma financing digest—June 2021. *Biopharma Dealmakers*.
- Eisen, J. A., Coyne, R. S., Wu, M., Wu, D., Thiagarajan, M., Wortman, J. R., Badger, J. H., Ren, Q., Amedeo, P., Jones, K. M., Tallon, L. J., Delcher, A. L., Salzberg, S. L., Silva, J. C., Haas, B. J., Majoros, W. H., Farzad, M., Carlton, J. M., Smith, R. K., ... Orias, E. (2006). Macronuclear Genome Sequence of the Ciliate *Tetrahymena thermophila*, a Model Eukaryote. *PLoS Biology*, 4(9), e286. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040286>
- Elguero, M. E., Nudel, C. B., & Nusblat, A. D. (2019). Biotechnology in ciliates: An overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(2), 220-234. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1530188>
- Elliott, A. M., & Hayes, R. E. (1953). MATING TYPES IN TETRAHYMENA. *The Biological Bulletin*, 105(2), 269-284. <https://doi.org/10.2307/1538642>
- Elliott, P., Hohmann, A., & Spanos, J. (2003). Protease expression in the supernatant of Chinese Hamster Ovary cells grown in serum-free culture. *Biotechnology Letters*, 25(22), 1949-1952. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000003992.09492.4b>

- EvaluatePharma. (2019). *World Preview 2019, Outlook to 2024* (Sy 12; s. 26). EvaluatePharma.
- Flickinger, C. J. (1965). THE FINE STRUCTURE OF THE NUCLEI OF TETRAHYMENA PYRIFORMIS THROUGHOUT THE CELL CYCLE. *Journal of Cell Biology*, 27(3), 519-529. <https://doi.org/10.1083/jcb.27.3.519>
- Freudl, R. (2018). Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0901-3>
- Gaertig, J., Gao, Y., Tishgarten, T., Clark, T. G., & Dickerson, H. W. (1999). Surface display of a parasite antigen in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Nature Biotechnology*, 17(5), 462-465. <https://doi.org/10.1038/8638>
- Gaertig, J., Thatcher, T. H., Gu, L., & Gorovsky, M. A. (1994). Electroporation-mediated replacement of a positively and negatively selectable beta-tubulin gene in *Tetrahymena thermophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(10), 4549-4553. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.10.4549>
- Gao, S. X., Zhang, Y., Stansberry-Perkins, K., Buko, A., Bai, S., Nguyen, V., & Brader, M. L. (2011). Fragmentation of a highly purified monoclonal antibody attributed to residual CHO cell protease activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4), 977-982. <https://doi.org/10.1002/bit.22982>
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343-345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Gimenes, N. C., Silveira, E., & Tambourgi, E. B. (2021). An Overview of Proteases: Production, Downstream Processes and Industrial Applications. *Separation & Purification Reviews*, 50(3), 223-243. <https://doi.org/10.1080/15422119.2019.1677249>
- Gonzalez-Suarez, I., Redwood, A. B., Perkins, S. M., Vermolen, B., Lichtensztejn, D., Grotzky, D. A., Morgado-Palacin, L., Gapud, E. J., Sleckman, B. P., Sullivan, T., Sage, J., Stewart, C. L., Mai, S., & Gonzalo, S. (2009). Novel roles for A-type lamins in telomere biology and the DNA damage response pathway. *The EMBO Journal*, 28(16), 2414-2427. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.196>
- Gorovsky, M. A., Shang, Y., & Song, X. (2001). *Tetrahymena metallothionein gene promoter and its use* (World Intellectual Property Organization Patent Sy WO2003006480A1).
- Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *tetrahymena* extracts. *Cell*, 43(2), 405-413. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90170-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90170-9)
- Guberman, A., Hartmann, M., Tiedtke, A., Florin-Christensen, J., & Florin-Christensen, M. (1999). A method for the preparation of *Tetrahymena thermophila* phospholipase A₁ suitable for large-scale production. *Journal of Applied Microbiology*, 86(2), 226-230. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00651.x>

- Hartmann, M., Grenningloh, M., & Tiedtke, A. (2002). *DNA sequence of the enzyme phospholipase A1 of ciliate tetrahymena, and the use of the same* (U.S. Patent and Trademark Office Patent Sy US7045330B2).
- Hartmann, M., Sachse, C., Apelt, J., & Bockau, U. (2009). *System For The Heterologous Expression of a Viral Protein in a Ciliate Host Cell* (European Patent Office Patent Sy EP2443232B1).
- Hartmann, M. W. W., Weide, M., Herrmann, L., & Niebur, N. (2006). *Tetrahymena heat inducible promoters and their use* (European Patent Office Patent Sy EP1902138B1).
- Hayashi, A., & Mochizuki, K. (2015). Targeted Gene Disruption by Ectopic Induction of DNA Elimination in *Tetrahymena*. *Genetics*, 201(1), 55-64. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.178525>
- Hellenbroich, D., Valley, U., Ryll, T., Wagner, R., Tekkanat, N., Kessler, W., Roß, A., & Deckwer, W.-D. (1999). Cultivation of *Tetrahymena thermophila* in a 1.5-m³ airlift bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(4), 447-455. <https://doi.org/10.1007/s002530051415>
- Herrmann, L., Erkelenz, M., Aldag, I., Tiedtke, A., & Hartmann, M. W. (2006). Biochemical and molecular characterisation of *Tetrahymena thermophila* extracellular cysteine proteases. *BMC Microbiology*, 6(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-19>
- Homberg, J. van den, van de Vondervoort, P., Fraissinet-Tachet, L., & Visser, J. (1997). *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: The problem of proteases. *Trends Biotechnol*, 15(7), 256-263.
- Hussain, H., Fisher, D. I., Abbott, W. M., Roth, R. G., & Dickson, A. J. (2017). Use of a protein engineering strategy to overcome limitations in the production of “Difficult to Express” recombinant proteins: “Difficult to Express” Recombinant Proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(10), 2348-2359. <https://doi.org/10.1002/bit.26358>
- Idiris, A., Tohda, H., Bi, K., Isoai, A., Kumagai, H., & Giga-Hama, Y. (2006). Enhanced productivity of protease-sensitive heterologous proteins by disruption of multiple protease genes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(2), 404-420. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0489-0>
- Iwamoto, M., Mori, C., Hiraoka, Y., & Haraguchi, T. (2014). Puromycin resistance gene as an effective selection marker for ciliate *Tetrahymena*. *Gene*, 534(2), 249-255. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.10.049>
- Jacobs, M. E., DeSouza, L. V., Samaranayake, H., Pearlman, R. E., Siu, K. W. M., & Klobutcher, L. A. (2006). The *Tetrahymena thermophila* Phagosome Proteome. *Eukaryotic Cell*, 5(12), 1990-2000. <https://doi.org/10.1128/EC.00195-06>
- Jayaram, J., Papoyan, A., Bisharyan, Y., Cassidy-Hanley, D., Zhang, X., Colussi, P., Appleton, J., Gagliardo, L., & Clark, T. G. (2010). *An Alternative Platform for Rapid Production of Effective Subunit Vaccines*. . 23. 6-13. *T*. 23(8), 6-13.

- Jin, F. J., Watanabe, T., Juvvadi, P. R., Maruyama, J., Arioka, M., & Kitamoto, K. (2007). Double disruption of the proteinase genes, *tpaA* and *pepE*, increases the production level of human lysozyme by *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5), 1059-1068. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1088-4>
- Kahn, R. W., Andersen, B. H., & Brunk, C. F. (1993). Transformation of *Tetrahymena thermophila* by microinjection of a foreign gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(20), 9295-9299. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.20.9295>
- Kamaruddin, N., Storms, R., Mahadi, N. M., Illias, R. Md., Bakar, F. D. A., & Murad, A. M. A. (2018). Reduction of Extracellular Proteases Increased Activity and Stability of Heterologous Protein in *Aspergillus niger*. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 43(7), 3327-3338. <https://doi.org/10.1007/s13369-017-2914-3>
- Karrer, K. M., Peiffer, S. L., & DiTomas, M. E. (1993). Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(7), 3063-3067. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.7.3063>
- Kim, N.-S., Jang, S.-H., Yu, H.-Y., Chung, N.-D., Kwon, T.-H., Yang, M.-S., & Kim, T.-G. (2013). Amylase and cysteine proteinase gene knockdown in rice cells using RNA interference for enhancing production of recombinant proteins. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 114(1), 97-107. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0309-z>
- Kim, N.-S., Kim, T.-G., Kim, O.-H., Ko, E.-M., Jang, Y.-S., Jung, E.-S., Kwon, T.-H., & Yang, M.-S. (2008). Improvement of recombinant hGM-CSF production by suppression of cysteine proteinase gene expression using RNA interference in a transgenic rice culture. *Plant Molecular Biology*, 68(3), 263-275. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9367-8>
- Kiy, T., & Rüsing, M. (2005). *Expression of recombinant human proteins in Tetrahymena* (U.S. Patent and Trademark Office Patent Sy US6962800B2).
- Kiy, T., & Tiedtke, A. (1992a). Mass cultivation of *Tetrahymena thermophila* yielding high cell densities and short generation times. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(5). <https://doi.org/10.1007/BF00240728>
- Kiy, T., & Tiedtke, A. (1992b). Continuous high-cell-density fermentation of the ciliated protozoon *Tetrahymena* in a perfused bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(2). <https://doi.org/10.1007/BF00174458>
- Kour, D., Rana, K. L., Thakur, S., Sharma, S., Yadav, N., Rastegari, A. A., Yadav, A. N., & Saxena, A. K. (2019). Disruption of Protease Genes in Microbes for Production of Heterologous Proteins. *Çinde New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (ss. 35-75). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63503-7.00003-6>
- Kumar, S., Briguglio, J. S., & Turkewitz, A. P. (2014). An aspartyl cathepsin, *CTH3*, is essential for proprotein processing during secretory granule maturation in *Tetrahymena thermophila*. *Molecular Biology of the Cell*, 25(16), 2444-2460. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-03-0833>

- Kumar, S., Briguglio, J. S., & Turkewitz, A. P. (2015). Secretion of Polypeptide Crystals from *Tetrahymena thermophila* Secretory Organelles (Mucocysts) Depends on Processing by a Cysteine Cathepsin, Cth4p. *Eukaryotic Cell*, 14(8), 817-833. <https://doi.org/10.1128/EC.00058-15>
- Kuroda, K., Kitagawa, Y., Kobayashi, K., Tsumura, H., Komeda, T., Mori, E., Motoki, K., Kataoka, S., Chiba, Y., & Jigami, Y. (2007). Antibody expression in protease-deficient strains of the methylotrophic yeast *Ogataea minuta*. *FEMS Yeast Res*, 7(8), 1307-1316.
- Landowski, C. P., Huuskonen, A., Wahl, R., Westerholm-Parvinen, A., Kanerva, A., Hänninen, A.-L., Salovuori, N., Penttilä, M., Natunen, J., Ostermeier, C., Helk, B., Saarinen, J., & Saloheimo, M. (2015). Enabling Low Cost Biopharmaceuticals: A Systematic Approach to Delete Proteases from a Well-Known Protein Production Host *Trichoderma reesei*. *PLOS ONE*, 10(8), e0134723. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134723>
- Laux, H., Romand, S., & Bodendorf, U. (2019). *Novel Vertebrate Cells and Methods for Recombinantly Expressing a Polipeptide of Interest* (European Patent Office Patent Sy EP3536776).
- Laux, H., Romand, S., Nuciforo, S., Farady, C. J., Tapparel, J., Buechmann-Moeller, S., Sommer, B., Oakeley, E. J., & Bodendorf, U. (2018). Degradation of recombinant proteins by Chinese hamster ovary host cell proteases is prevented by matriptase-1 knockout. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(10), 2530-2540. <https://doi.org/10.1002/bit.26731>
- Levy, M. R., Sisskin, E. E., & McConkey, C. L. (1976). A protease that increases during a period of enzymic and metabolic adjustment in *Tetrahymena*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 172(2), 634-647. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(76\)90118-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(76)90118-1)
- Li, S. W., Yu, B., Byrne, G., Wright, M., O'Rourke, S., Mesa, K., & Berman, P. W. (2019). Identification and CRISPR/Cas9 Inactivation of the C1s Protease Responsible for Proteolysis of Recombinant Proteins Produced in CHO Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(9), 2130-2145. <https://doi.org/10.1002/bit.27016>
- Lim, A., Doyle, B. L., Kelly, G. M., Reed-Bogan, A. M., Breen, L. H., Shamlou, P. A., & Lambooy, P. K. (2018). Characterization of a cathepsin D protease from CHO cell-free medium and mitigation of its impact on the stability of a recombinant therapeutic protein. *Biotechnology Progress*, 34(1), 120-129. <https://doi.org/10.1002/btpr.2530>
- Liu, X., Meng, L., Wang, X., Yang, Y., & Zhonghu, B. A. I. (2021). Effect of Clp protease from *Corynebacterium glutamicum* on heterologous protein expression. *Protein Expression and Purification*, 105928. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105928>
- Lu, E., & Wolfe, J. (2001). Lysosomal enzymes in the macronucleus of *Tetrahymena* during its apoptosis-like degradation. *Cell Death & Differentiation*, 8(3), 289-297. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400807>
- Madeira, F., Park, Y. mi, Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D., & Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and

- sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W636-W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
- Madinger, C. L., Collins, K., Fields, L. G., Taron, C. H., & Benner, J. S. (2010). Constitutive Secretion in *Tetrahymena thermophila*. *Eukaryotic Cell*, 9(5), 674-681. <https://doi.org/10.1128/EC.00024-10>
- Mahajan, R. T., & Badgular, S. B. (2010). Available online through www.jpronline.info. *Journal of Pharmacy Research*, 9, 21.
- Mandal, M. K., Ahvari, H., Schillberg, S., & Schiermeyer, A. (2016). Tackling Unwanted Proteolysis in Plant Production Hosts Used for Molecular Farming. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00267>
- Mandal, M. K., Fischer, R., Schillberg, S., & Schiermeyer, A. (2014). Inhibition of protease activity by antisense RNA improves recombinant protein production in *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 (BY-2) suspension cells. *Biotechnology Journal*, 9(8), 1065-1073. <https://doi.org/10.1002/biot.201300424>
- Mar, P. D., El Khalfi, B., & Soukri, A. (2020). Protective effect of oregano and sage essentials oils against the effect of extracellular H₂O₂ and SNP in *Tetrahymena thermophila* and *Tetrahymena pyriformis*. *Journal of King Saud University - Science*, 32(1), 279-287. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.05.005>
- McDonald, J. K. (1985). An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: Aspects related to nomenclature and classification. *The Histochemical Journal*, 17(7), 773-785. <https://doi.org/10.1007/BF01003313>
- Meerman, H., & Georgiou, G. (1994). Construction and Characterization of a Set of E. coli Strains Deficient in All Known Loci Affecting the Proteolytic Stability of Secreted Recombinant Proteins. *Nat Biotechnol*, 12, 1107-1110.
- Merriam, E. V., & Bruns, P. J. (1988). Phenotypic assortment in *Tetrahymena thermophila*: Assortment kinetics of antibiotic-resistance markers, tsA, death, and the highly amplified rDNA locus. *Genetics*, 120(2), 389-395. <https://doi.org/10.1093/genetics/120.2.389>
- Meyer, H.-P., & Schmidhalter, D. R. (Ed.). (2014). *Industrial scale suspension culture of living cells*. Wiley Blackwell/Wiley-VCH.
- Miao, W., Xiong, J., Bowen, J., Wang, W., Liu, Y., Braguinets, O., Grigull, J., Pearlman, R. E., Orias, E., & Gorovsky, M. A. (2009). Microarray Analyses of Gene Expression during the *Tetrahymena thermophila* Life Cycle. *PLoS ONE*, 4(2), e4429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004429>
- Mitragotri, S., Burke, P. A., & Langer, R. (2014). Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: Formulation and delivery strategies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(9), 655-672. <https://doi.org/10.1038/nrd4363>
- Mochizuki, K., & Gorovsky, M. A. (2005). A Dicer-like protein in *Tetrahymena* has distinct functions in genome rearrangement, chromosome segregation, and meiotic prophase. *Genes & Development*, 19(1), 77-89. <https://doi.org/10.1101/gad.1265105>

- Morrow, K. J., & Langer, E. S. (2020). *A Biopharma Year In Review—And A Look Ahead To 2020*. 5.
- Müller, M., Baudhuin, P., & De Duve, C. (1966). Lysosomes in *Tetrahymena pyriformis* I. Some properties and lysosomal localization of acid hydrolases: Lysosomes In *Tetrahymena*. *Journal of Cellular Physiology*, 68(2), 165-175. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040680211>
- Nanney, D. L., & Caughey, P. A. (1953). Mating Type Determination in *Tetrahymena Pyriformis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 39(10), 1057-1063. <https://doi.org/10.1073/pnas.39.10.1057>
- Nanney, D. L., & Preparata, R. M. (1979). Genetic Evidence Concerning the Structure of the *Tetrahymena thermophila* Macronucleus*†. *The Journal of Protozoology*, 26(1), 2-9. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1979.tb02722.x>
- Neurath, H., & Walsh, K. A. (1976). Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(11), 3825-3832. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.11.3825>
- Orias, E. (2012). *Tetrahymena thermophila* Genetics: Concepts and Applications. İçinde *Methods in Cell Biology* (C. 109, ss. 301-325). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385967-9.00010-4>
- Orias, E., & Flacks, M. (1975). Macronuclear genetics of *Tetrahymena* i. Random distribution of macronuclear gene copies in *t. Pyriformis* , syngen 1. *Genetics*, 79(2), 187-206. <https://doi.org/10.1093/genetics/79.2.187>
- Peng, C., Shi, C., Cao, X., Li, Y., Liu, F., & Lu, F. (2019). Factors Influencing Recombinant Protein Secretion Efficiency in Gram-Positive Bacteria: Signal Peptide and Beyond. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 139. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00139>
- Peterson, D. S., Gao, Y., Asokan, K., & Gaertig, J. (2002). The circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* is expressed and localized to the cell surface in the free-living ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 122(2), 119-126. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00079-8](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00079-8)
- Pomerantsev, A. P., Pomerantseva, O. M., Moayeri, M., Fattah, R., Tallant, C., & Leppla, S. H. (2011). A *Bacillus anthracis* strain deleted for six proteases serves as an effective host for production of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, 80(1), 80-90. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.05.016>
- Quax, W. J. (1997). Merits of secretion of heterologous proteins from industrial microorganisms. *Folia Microbiologica*, 42(2), 99-103. <https://doi.org/10.1007/BF02898715>
- Rasmussen, L., Florin-Christensen, M., Florin-Christensen, J., Kiy, T., & Tiedtke, A. (1992). Differential increase in activity of acid phosphatase induced by phosphate starvation in *Tetrahymena*. *Experimental Cell Research*, 201(2), 522-525. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(92\)90304-Q](https://doi.org/10.1016/0014-4827(92)90304-Q)

- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2012). MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D343-D350. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr987>
- Sachse, C. (2006). *Tetrahymena thermophila: An expression platform for the production of viral antigens* [PhD]. Bergische Universität Wuppertal.
- Sander, P., Grunewald, S., Bach, M., Haase, W., Reilander, H., & Michel, H. (1994). Heterologous Expression of the Human D2S Dopamine Receptor in Protease-Deficient *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *European Journal of Biochemistry*, 226(2), 697-705. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb20098.x>
- Sanford, Y. M., & Orias, E. (1981). Phenylketonuric *Tetrahymena*: Phenylalanine hydroxylase mutants and other tyrosine auxotrophs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(12), 7614-7618. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7614>
- Shang, Y., Song, X., Bowen, J., Corstanje, R., Gao, Y., Gaertig, J., & Gorovsky, M. A. (2002). A robust inducible-repressible promoter greatly facilitates gene knockouts, conditional expression, and overexpression of homologous and heterologous genes in *Tetrahymena thermophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), 3734-3739. <https://doi.org/10.1073/pnas.052016199>
- Sinha, J., Plantz, B. A., Inan, M., & Meagher, M. M. (2005). Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: Case study with recombinant ovine interferon- γ . *Biotechnology and Bioengineering*, 89(1), 102-112. <https://doi.org/10.1002/bit.20318>
- Stover, N. A. (2006). *Tetrahymena* Genome Database (TGD): A new genomic resource for *Tetrahymena thermophila* research. *Nucleic Acids Research*, 34(90001), D500-D503. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj054>
- Straus, J. W., Migaki, G., & Finch, M. T. (1992). An Assessment of Proteolytic Enzymes in *Tetrahymena thermophila*. *The Journal of Protozoology*, 39(6), 655-662. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1992.tb04445.x>
- Suhren, J. H., Noto, T., Kataoka, K., Gao, S., Liu, Y., & Mochizuki, K. (2017). Negative Regulators of an RNAi-Heterochromatin Positive Feedback Loop Safeguard Somatic Genome Integrity in *Tetrahymena*. *Cell Reports*, 18(10), 2494-2507. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.024>
- Suzuki, K.-M., Hayashi, N., Hosoya, N., Takahashi, T., Kosaka, T., & Hosoya, H. (1998). Secretion of tetra, a *Tetrahymena* cysteine protease, as a mature enzyme and its identification as a member of the cathepsin L subfamily. *European Journal of Biochemistry*, 254(1), 6-13. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2540006.x>
- Suzuki, K.-M., Hosoya, N., Takahashi, T., Kosaka, T., & Hosoya, H. (1997). Release of a Newly-Identified Cysteine Protease, Tetra, from *Tetrahymena* into Culture Medium during the Cell Growth. *Journal of Biochemistry*, 121(4), 642-647. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021634>

- Sweeney, R., & Yao, M. C. (1989). Identifying functional regions of rRNA by insertion mutagenesis and complete gene replacement in *Tetrahymena thermophila*. *The EMBO Journal*, 8(3), 933-938.
- Tsabar, M., Eapen, V. V., Mason, J. M., Memisoglu, G., Waterman, D. P., Long, M. J., Bishop, D. K., & Haber, J. E. (2015). Caffeine impairs resection during DNA break repair by reducing the levels of nucleases Sae2 and Dna2. *Nucleic Acids Research*, 43(14), 6889-6901. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv520>
- Üstüntanır Dede, A. F., & Arslanyolu, M. (2020). Construction and dynamic characterization of a *Tetrahymena thermophila* macronuclear artificial chromosome. *Gene*, 748, 144697. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144697>
- Vizovišek, M., Vidmar, R., Drag, M., Fonović, M., Salvesen, G. S., & Turk, B. (2018). Protease Specificity: Towards In Vivo Imaging Applications and Biomarker Discovery. *Trends in Biochemical Sciences*, 43(10), 829-844. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.07.003>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296-W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Weide, T., Bockau, U., Rave, A., Herrmann, L., & Hartmann, M. W. (2007). A recombinase system facilitates cloning of expression cassettes in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *BMC Microbiology*, 7(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-12>
- Weide, T., Herrmann, L., Bockau, U., Niebur, N., Aldag, I., Laroy, W., Contreras, R., Tiedtke, A., & Hartmann, M. W. (2006). Secretion of functional human enzymes by *Tetrahymena thermophila*. *BMC Biotechnology*, 6(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-6-19>
- Xu, J.-B., Jing, T.-S., Pauli, W., & Berger, S. (2002). Quantitative structure-activity relationships for the toxicity of nitrobenzenes to *Tetrahymena thermophila*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 37(4), 563-571. <https://doi.org/10.1081/ESE-120003237>
- Yang, Z., Wang, S., Halim, A., Schulz, M. A., Frodin, M., Rahman, S. H., Vester-Christensen, M. B., Behrens, C., Kristensen, C., Vakhrushev, S. Y., Bennett, E. P., Wandall, H. H., & Clausen, H. (2015). Engineered CHO cells for production of diverse, homogeneous glycoproteins. *Nature Biotechnology*, 33(8), 842-844. <https://doi.org/10.1038/nbt.3280>
- Yao, M. C., & Yao, C. H. (1991). Transformation of *Tetrahymena* to cycloheximide resistance with a ribosomal protein gene through sequence replacement. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(21), 9493-9497. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.21.9493>
- Yilmaz, G., & Arslanyolu, M. (2015). Efficient expression of codon-adapted affinity tagged super folder green fluorescent protein for synchronous protein localization and affinity

- purification studies in *Tetrahymena thermophila*. *BMC Biotechnology*, 15(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0137-9>
- Yoon, J., Kimura, S., Maruyama, J., & Kitamoto, K. (2009). Construction of quintuple protease gene disruptant for heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(4), 691-701. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1815-5>
- Yoon, J., Maruyama, J., & Kitamoto, K. (2011). Disruption of ten protease genes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* highly improves production of heterologous proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(3), 747-759. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2937-0>
- Yu, T., Barchetta, S., Pucciarelli, S., La Terza, A., & Miceli, C. (2012). A Novel Robust Heat-inducible Promoter for Heterologous Gene Expression in *Tetrahymena thermophila*. *Protist*, 163(2), 284-295. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2011.07.003>
- Zhu, C., Liu, X., Chi, H., Chen, C., Chen, Z., Fu, G., Gong, H., & Huang, Y. (2018). System for the heterologous expression of NS1 protein of H9N2 avian influenza virus in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(10), 1610-1618. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0291>

EKLER

EK-1. Literatürde Belirtilen *Tetrahymena* Sekretom Proteaz Genlerinin İfade Seviyesine Göre Sıralanması

Ekte verilen tablo literatür kaynak alınarak oluşturulmuş ve genlere ait ifade seviyelerine TGD’den ulaşılmıştır (TTHERM_00102779 numaralı gen hariç). TGD’de ifade seviyesi bulunmayan proteaz genleri listenin sonlarına yerleştirilmiştir. “MATERYAL ve YÖNTEM” bölümünde değinilen literatür çalışmalarına göre CU428, sekretomunda SB210 ve SB281 suşlarına kıyasla yaklaşık iki kat daha fazla sekretom proteazı ifade etmektedir. CU438 suşuyla ilgili “+” ile işaretlenen proteazlar harici bilgi verilmemiştir.

Tablo EK-1.1: *T. thermophila* besiyeri ortamında sekretomda tesbit edilen ve gen ifade seviyelerine göre listelenen proteazlar. Tabloda TTHERM numarası verilen genlerin ifade ettiği proteinlere ait yaklaşık büyüklük (kDa), sinyal dizisi bulundurma durumu (V: var, Y: yok), proteaz grubu ve tesbit edildikleri suşlar (+: sekretomda tesbit edildi, -: sekretomda tesbit edilmedi) gösterilmiştir. Boş kuyular ilgili suş sekretomunda karşılık gelen proteazlara dair bilgi olmadığını belirtmektedir. TTHERM numarası koyulaştırılan proteaz genleri Herrmann vd., 2006 yayınında sekretomda tesbit edilen proteaz genlerini ifade etmektedir.

Eksp. seviyesi sırası	TTHERM	Sinyal dizisi	kDa	Açıklama	SB210	SB281	CU428	CU438
1	00628610	V	34	Papain ailesi sistein proteaz	+		+	
2	00760310	V	36	Papain ailesi sistein proteaz	+	+	+	+
3	00641150	V	37	Papain ailesi sistein proteaz	+	+	-	
4	00083480	Y	38	Papain ailesi sistein proteaz	-	-	+	
5	00683010	V	37	Fosfolipaz A1	+	+	+	+
6	00161130	V	36	Papain ailesi sistein proteaz	+	+	+	
7	00683060	V	36	Papain ailesi sistein proteaz	+	+	+	+
8	00823810	V	66	Papain ailesi sistein proteaz	-	-	+	
9	00066890	V	48	C13 ailesi sistein proteaz	+	+	+	
10	00079650	V	37	Papain ailesi sistein proteaz	+	+	+	
11	00755950	V	36	Papain ailesi sistein proteaz	+	+	+	+
12	00530660	V	35	Papain ailesi sistein proteaz	+	+	+	+
13	00079600	V	37	Papain ailesi sistein proteaz	-	-	+	

14	00079610	V	37	Papain ailesi sistein proteaz	-	-	+	
15	00102770	V	137	Papain ailesi sistein proteaz	-	-	+	
16	00079640	V	37	Papain ailesi sistein proteaz	-	+	+	
17	00268060	V	35	Papain ailesi sistein proteaz	+	+	+	+
18	01256490	V	35	Papain ailesi sistein proteaz	+	-	-	
19	00881450	V	38	Papain ailesi sistein proteaz	-	+	+	
20	00155260	V	355	Convertase subtilisin serin proteaz	-	-	+	
21	00289550	V	57	Leishmanolysin çinko metallopeptidaz	-	-	+	
22	00879300	V	38	Papain ailesi sistein proteaz	-	-	+	
23	00881410	V	38	Papain ailesi sistein proteaz	-	-	+	
24	00881420	V	38	Papain ailesi sistein proteaz	-	-	+	
25	00881440	V	38	Papain ailesi sistein proteaz	+	+	+	
26	00802340	V	36	Papain ailesi sistein proteaz	-	+	+	
27	00881330	V	38	Papain ailesi sistein proteaz	-	-	+	
28	00660360	V	37	Papain ailesi sistein proteaz	-	-	+	
29	00660390	V	38	Papain ailesi sistein proteaz	+	-	+	
30	00660380	V	38	Papain ailesi sistein proteaz	-	-	+	
31	00660410	V	37	Papain ailesi sistein proteaz	+	-	+	
32	00102779	V	137	Papain ailesi sistein proteaz	+	+	+	
	TOPLAM				16	16	30	6

EK-2. *T. thermophila* Genomik DNA İzolasyonu

Tetrahymena gDNA izolasyonu, DNA izolasyon kiti (Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit, REF: A1120) yardımıyla kit protokolü uyarlanarak yapılmaktadır. Protokol adımları aşağıdaki gibidir:

- 1- KO hat hücreleri ve SB210 2 ml NEFF içeren 12-kuyulu tabağa ekilmiş ve 2-3 gün büyütülür.

- 2- Eppendorf tüplere alınan hücre kültürleri 14.000 g'de 5 dk santrifüjlenir. Süpernatant atıldıktan sonra temiz açlık tamponu eklenerek santrifüj tekrarlanır.
- 3- Pelete 300 µl Nucleilysis solüsyonu eklenip 1-3 sn vortekslenir ve pipetlenir. 65 °C'de 15 dk inkübasyona bırakılır.
- 4- İnkübasyonun ardından tüpler oda sıcaklığına gelene kadar (~5 dk) beklenir. Soğuyan tüplere 3 µl RNase eklendikten sonra 3-4 defa ters-düz edilir ve 37 °C'de 30 dk inkübasyona bırakılır.
- 5- Yine tüpler oda sıcaklığına gelene kadar beklendikten sonra 100 µl protein precipitation solüsyonu eklenir ve 20 sn vortekslenir.
- 6- 16.000 g'de 3 dk santrifüjlenir. Santrifüj sonrası proteinler çöker, süpernatant ise 1000 µl'lik pipetör ile yeni tüplere aktarılır.
- 7- DNA içeren yeni tüplere 300 µl izopropanol eklenip yavaşça 6-7 kez ters-düz edilir.
- 8- 16.000 g'de 1 dk santrifüjlenip süpernatant atılır ve 300 µl %70 etanol eklenir.
- 9- Tekrar 16.000 g'de 1 dk santrifüjlenip süpernatant pelete dikkat edilerek dökülür. Kalan etanolün de uçması için tüpler kapakları açık şekilde kurutma kağıdı üstüne ters çevrilip oda sıcaklığında bırakılır.
- 10- Alkol tamamen buharlaştıktan sonra 50 µl rehydration solüsyonu eklenir. İzole edilen gDNA'lar hemen kullanılacaksa 65 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılır. Aksi durumda +4 °C'de gece boyu bırakılıp ertesi gün nanodrop ile konsantrasyon tayini yapılır. Solüsyonlar kit ile temin edilmektedir.

EK-3. Tez Kapsamında Uygulanan Rutin PZR Protokolleri

PZR sonuçları, aksi belirtilmedikçe %1'lik hazırlanan agaroz jelde görüntülenmiş, büyük jel (7x12 cm) 120 V'ta 50 dk, küçük jel (4x7 cm) 85 V'ta 45 dk koşturulmuştur.

EK-3.1. Somatik KO vektörüne klonlanmak üzere *CTH34* geni 3' ve 5' homoloji kollarının amplifikasyonu

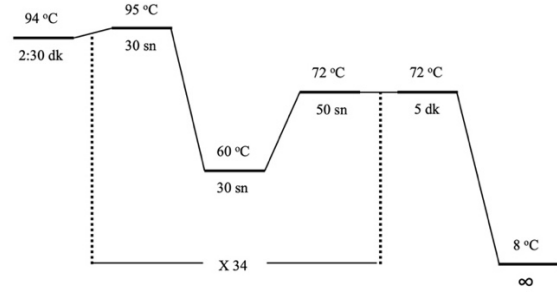
pCHXR vektörüne yerleştirilmek üzere *CTH34*'ün sırasıyla upstream ve downstream bölgelerinden 5'HK ve 3'HK dizileri Taq polimeraz (Thermo Scientific, #EP0401) kullanılarak aşağıdaki PZR protokolüyle üretilmiştir. SB210 hücrelerinden elde edilen gDNA (280 ng/µl) kalıp olarak kullanılmıştır.

CTH34 5'HK'nın PZR ile üretimi;

PZR içeriği

Bileşen	Miktar	Son kons.
Kalıp	2 µl	
10X Tag Pol. Tamponu	2 µl	1X
25 mM MgCl ₂	2 µl	2,5 mM
2,5 µM F-primer	2 µl	0,25 µM
2,5 µM R-primer	2 µl	0,25 µM
5 u/µl Taq DNA pol.	0,2 µl	1,0 u
2,5 mM dNTPmix	1,6 µl	0,2 mM
dH ₂ O	8,2 µl	-
Son hacim	20 µl	

PZR döngüsü

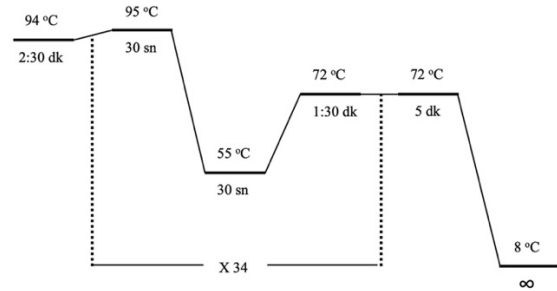


CTH34 3'HK'nın PZR ile üretimi;

PZR içeriği

Bileşen	Miktar	Son kons.
Kalıp	2 µl	
10X Tag Pol. Tamponu	2 µl	1X
25 mM MgCl ₂	2 µl	2,5 mM
2,5 µM F-primer	2 µl	0,25 µM
2,5 µM R-primer	2 µl	0,25 µM
5 u/µl Taq DNA pol.	0,2 µl	1,0 u
2,5 mM dNTPmix	1,6 µl	0,2 mM
dH ₂ O	8,2 µl	-
Son hacim	20 µl	

PZR döngüsü



Elde edilen PZR ürünlerinin 2 µl'si, 3 µl dH₂O ve 1 µl 6X DNA jel yükleme boyasıyla (Thermo Scientific, #R0611) karıştırılıp agaroz jelde görüntülenmiş kalanı ise PZR pürifikasyon kiti (Thermo Scientific, #K0702) protokolüne göre saflaştırılmıştır.

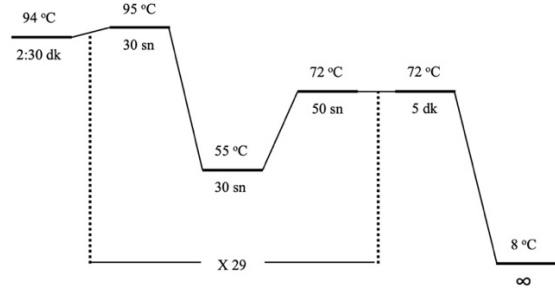
EK-3.2. 3-primerli PZR ile *CTH34*-KO hatların genom kontrolü

CTH34 geninin MAK kopya sayısının belirlenmesi için ileri primerin 5'HK'ya oturduğu, geri primerlerin ise birinin *CHXR* diğerinin *CTH34* gen içi bölgeye oturduğu PZR tasarlanmıştır. Kalıp olarak pCHXR-CTH34KO vektörü (10 ng/µl), SB210 gDNA'sı (100 ng/µl), KO hatların gDNA'ları (100 ng/µl) kullanılmış, aşağıdaki Taq polimeraz (Thermo Scientific, #EP0401) PZR uygulanmıştır.

PZR içeriği

Bileşen	Miktar	Son kons.
Kalıp	2 µl	-
10X Taq Pol. Tamponu	1 µl	1X
25 mM MgCl ₂	1 µl	2,5 mM
2,5 µM F-primer	2 µl	0,5 µM
2,5 µM R-primer1	1 µl	0,25 µM
2,5 µM R-primer2	1 µl	0,25 µM
5 u/µl Taq DNA pol.	0,1 µl	0,5 u
2,5 mM dNTPmix	0,8 µl	0,2 mM
dH ₂ O	1,1 µl	-

Son hacim 10 µl

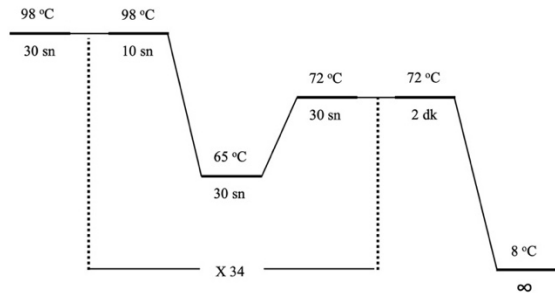
PZR döngüsü**EK-3.3. coDel KO vektörüne klonlanacak hedef sekansların PZR amplifikasyonu**

Aşağıda verilen protokol 4 proteaz hedef bölgesi için aynı zamanda uygulanmıştır. Hedef dizinin PZR'sinde kalıp olarak SB210 gDNA'sı ve hata oranı daha düşük olan Q5-High Fidelity DNA polimeraz enzimi (NEB, #M0491S) kullanılmıştır.

PZR içeriği

Bileşen	Miktar	Son kons.
Kalıp (100 ng/µl)	2 µl	-
5X Q5 React. Tamponu	2 µl	1X
2,5 µM F-primer	2 µl	0,5 µM
2,5 µM R-primer	2 µl	0,5 µM
2 u/µl Q5 DNA pol.	0,1 µl	0,2 u
2,5 mM dNTPmix	0,8 µl	0,2 mM
dH ₂ O	1,1 µl	-

Son hacim 10 µl

PZR döngüsü

Elde edilen PZR ürünün tamamı 2 µl 6X DNA jel yükleme boyasıyla (Thermo Scientific, #R0611) karıştırılıp agaroz jele yüklenmiş, jel koşturulduktan sonra jel ekstraksiyon kiti (Thermo Scientific, #0692) protokolüne göre jelden kesilip saflaştırılmıştır.

EK-3.4. MAK'ta coDel ile oluşturulan knock-out'un "coDel_check" primerleriyle teyit edilmesi

Yeni oluşan MAK'tan co-delesyon yoluyla silinen hedef sekansların tüm MAK kopyalarında silinip silinmediğini teyit etmek için Taq DNA polimerazla (Thermo Scientific, #EP0401) aşağıdaki PZR protokolü uygulanmıştır. Uzama süresi (extension time)

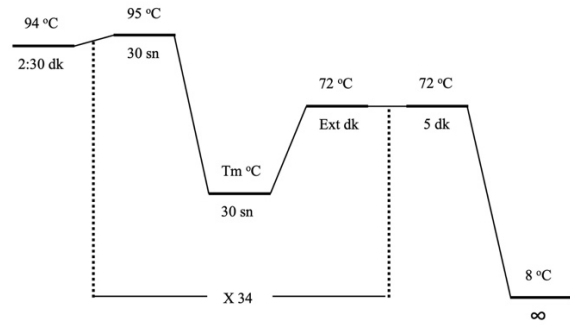
coDelCYP6check primer çifti için 72 °C’de 3:30 dk, diğer “check” primer çiftleri için ise bu süre 3 dk olarak girilmiştir. Primer çiftlerinin Tm sıcaklıkları tablo olarak verilmiştir

Primer çifti	Tm	Primer çifti	Tm
coDelCYP6check	55 °C	coDelCTH90check	50 °C
coDelCTH40check	56 °C	coDelCTH115check	58 °C

PZR içeriği

Bileşen	Miktar	Son kons.
Kalıp (100 ng/μl)	2 μl	-
10X Taq Pol. Tamponu	1 μl	1X
25 mM MgCl ₂	1 μl	2,5 mM
2,5 μM F-primer	1 μl	0,25 μM
2,5 μM R-primer	1 μl	0,25 μM
5 u/μl Taq DNA pol.	0,1 μl	0,5 u
2,5 mM dNTPmix	0,8 μl	0,2 mM
dH ₂ O	3,1 μl	-
Son hacim	10 μl	

PZR döngüsü



EK-3.5. Transforme edilen *E. coli* hücrelerinde koloni PZR ile pozitif transformant kolonilerin belirlenmesi

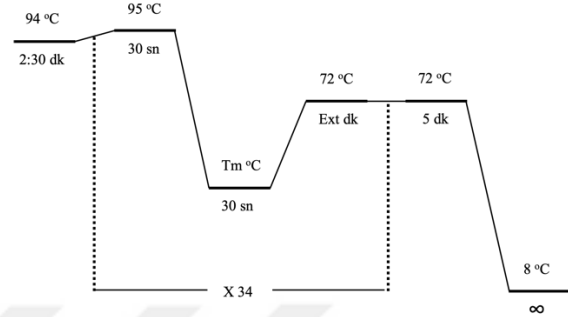
Isı şokuyla vektör konstraktının transforme edildiği kompetent *E. coli* DH5a hücreleri antibiyotikli LB agar içeren tabağa ekilip inkübatörde koloni büyümesi beklendikten sonra pozitif koloniler aşağıdaki koloni PZR protokolüne göre belirlenmiştir.

- 1- Kaç adet koloni seçilecekse o kadar PZR tüpü uygun şekilde isimlendirilip her birine 30 μl distile su eklenir.
- 2- Bek alevi yanında bir tarafı geniş steril kürdan yardımıyla ilgili kolonilerden hücre toplanır (agarı kazımamaya dikkat edilir) ve PZR tüpleri içindeki suda çözülür. Yeterince hücre toplanmışsa su rakı beyazına dönmektedir.
- 3- Tüpler 10 dk boyunca 95 °C’de termal döngüleyicide (thermal cycler) kaynatılıp ardından 5 dk buzda bekletilir.
- 4- Sonrasında *E. coli* lizatları mini PZR santrifüjüyle 5 dk santrifüjlenir.
- 5- Santrifüj sonrası lizatın süpernatant kısmı, Taq DNA polimeraz (Thermo Scientific, #EP0401) ile kurulan aşağıdaki reaksiyonda kalıp olarak kullanılır.
- 6- Koloni PZR ürünleri agaroz jele yüklenip görüntülenmiştir.

PZR içeriği

Bileşen	Miktar	Son kons.
Kalıp (100 ng/μl)	4 μl	-
10X Taq Pol. Tamponu	1 μl	1X
25 mM MgCl ₂	1 μl	2,5 mM
2,5 μM F-primer	1 μl	0,25 μM
2,5 μM R-primer	1 μl	0,25 μM
5 u/μl Taq DNA pol.	0,1 μl	0,5 u
2,5 mM dNTPmix	0,8 μl	0,2 mM
dH ₂ O	1,1 μl	-
Son hacim	10 μl	

PZR döngüsü



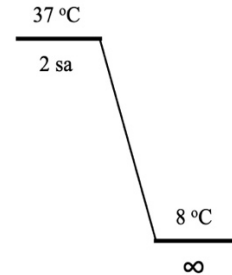
Primer çiftleri *E. coli*'de çoğaltılmak istenen vektöre bağlı olarak seçilip Tm ve uzama (extension) süresi seçilen primer çiftine göre belirlenmiştir. Koloni PZR sonucunda elde edilmek istenen vektörü içeren kolonilerden biri 10 ml LB broth besiyerine ekilip, plazmit izolasyon kiti (Macherey-Nagel, REF:740588.50) ile kit protokolüne uygun plazmit izolasyonu yapılmıştır.

EK-4. KO Vektör Konstraktlarının Moleküler Klonlama Yöntemleriyle Hazırlanması

EK-4.1. Restriksiyon ve ligasyon reaksiyonlarıyla 5' ve 3' homoloji kollarının pCHXR vektörüne yerleştirilmesi

Homoloji kollarına spesifik primerler tasarlanırken 5' HK'yı üreten primer çiftinin 5' uçlarında NotI (Thermo Scientific, #ER0591) ve SalI (Thermo Scientific, #ER0641), 3' HK'yı üreten primer çiftinin 5' uçlarında ise SmaI ve KpnI restriksiyon enzimi (RE) tanıma dizileri eklenmiştir. Öncelikle pCHXR ve 5' HK ayrı deney tüplerinde NotI ve SalI ile çift kesime (double digestion) maruz bırakılmıştır. Restriksiyon reaksiyon koşulları ve bileşenler aşağıda gösterilmiştir.

INSERT		VEKTÖR	
Bileşen	Miktar	Bileşen	Miktar
5' HA dizisi (28 ng/μl)	28 μl	Vektör (200 ng/μl)	12 μl
10X O tamponu	3,5 μl	10X O tamponu	2 μl
10 u/μl NotI	0,75 μl	10 u/μl NotI	0,5 μl
10 u/μl SalI	0,75 μl	10 u/μl SalI	0,5 μl
dH ₂ O	2 μl	dH ₂ O	5 μl
Son hacim	35 μl		20 μl

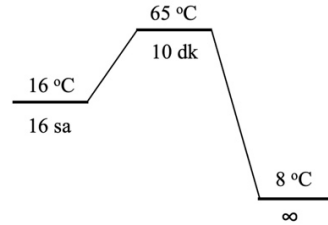


Reaksiyon sonrası vektörün tamamı agaroz jele yüklenmiş, boş lineer vektör jelden kesilerek ekstraksiyon kiti (Thermo Scientific, #0692) protokolüne göre saflaştırılmıştır. Bu sırada inser (vektöre yerleştirilen dizi) de jele yüklenmeden aynı kit ve protokol ile temizlenmiştir.

İnsert ve boş vektörde RE kesimi sonrası oluşturulan birbirine komplementer yapışkan uçlar T4 DNA ligaz (NEB, #M0202) kullanılarak birleştirilmiştir. Ligasyon reaksiyonuna alınacak insert hacmi aşağıdaki formüle göre hesaplanmış ve vektör miktarı 50 ng, insert/vektör molar oranı 6/1 olarak alınmıştır. Ligasyon reaksiyon koşulları ve bileşenler tabloda gösterilmiştir.

$$\frac{\text{vektör (ng)} \times \text{insert (bç)}}{\text{vektör (bç)}} \times \text{molar oran} \frac{\text{insert}}{\text{vektör}} = \text{insert (ng)}$$

Bileşenler	Miktar
İnsert (50 ng/μl)	0,5 μl
Vektör (40 ng/μl)	1 μl
10X T4 tamponu	1 μl
T4 DNA ligaz	0,5 μl
dH ₂ O	7 μl
Son hacim	10 μl



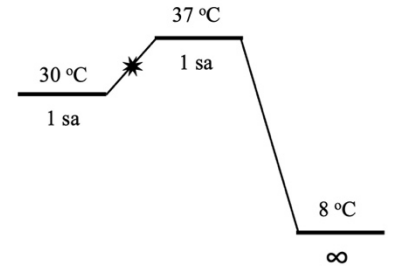
Ligasyon ürünü kompetent *E. coli* DH5α hücrelerine aşağıdaki protokole göre transforme edilmiştir:

- 1- 1 tüp (50 μl) kompetent *E. coli* hücresi -80 °C'den çıkarılıp buz üzerinde çözülür.
- 2- Ligasyon ürününün en fazla 5 μl'si (10 pg-100ng) hücrelerin üzerine ilave edilir ve 25 dk boyunca buzda inkübasyona bırakılır.
- 3- Hücreler tam 90 sn boyunca 42 °C su banyosunda tutularak hücrelere ısı şoku uygulanır.
- 4- Ardından 3 dk daha buzda tutulur.
- 5- 600 μl oda sıcaklığında LB besiyeri eklenip 37 °C 200 rpm çalkalamalı etüvde 1 saat büyümeye bırakılır.

- 6- Etüvden alınan hücreler 1:10 dilüe edilerek amfisilin içeren ve oda sıcaklığına getirilmiş LB agar tabaklarına yayılır. 12-16 saat boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakılır.
- 7- koloni PZR kontrolü için, oluşan kolonilerin 10-15 tanesinden amfisilin içeren başka bir LB agar tabağa çizgi ekim yapılır ve yine gece boyu inkübasyona bırakılır. Çoğalan kolonilerden alınan hücreler koloni PZR için kullanılır. Pozitif kolonilerden biri plazmit izolasyonu için LB besiyerine inoküle edilir.

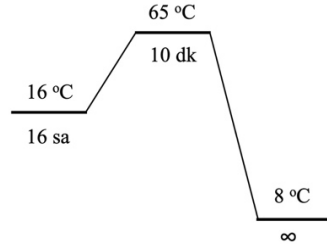
5’ HK’nın pCHXR vektörüne yerleştirilmesinden sonra 3’ HK da vektördeki CHXR genini çerçeveleyecek şekilde vektöre entegre edilmiştir. SmaI (Thermo Scientific, #ER0661) ve KpnI (Thermo Scientific, #ER0521) enzimlerinin optimum çalıştıkları sıcaklıklar farklı olduğu için aşağıdaki tabloda gösterilen bileşenlere enzim olarak önce SmaI eklenmiş ve 1 saat 30 °C’de inkübe edilmiştir (tabloda yıldız işaretiyle belirtilmiştir). Ardından KpnI eklenmiş ve 1 saat daha 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Kesilen vektör agaroz jelde yürütülmüş, jel ekstraksiyon kiti protokolüne göre 3’ HK inserti ile beraber saflaştırılmıştır.

İNSERT		VEKTÖR	
Bileşen	Miktar	Bileşen	Miktar
3’ HA dizisi (28 ng/μl)	28 μl	Vektör (110 ng/μl)	20 μl
10X KpnI tamponu	3,5 μl	10X KpnI tamponu	3 μl
10 u/μl SmaI*	0,75 μl	10 u/μl SmaI*	0,75 μl
10 u/Ml KpnI	0,75 μl	10 u/Ml KpnI	0,75 μl
dH ₂ O	2 μl	dH ₂ O	5,5 μl
Son hacim	35 μl		30 μl



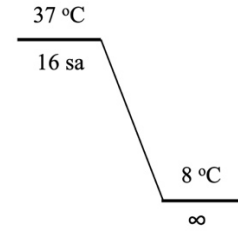
Ligasyon reaksiyonu daha önce 5’ HK için yapıldığı gibi gerçekleştirilmiş, vektör miktarı 50 ng, insert/vektör molar oranı 3/1 olarak alınmıştır. Ligasyon ürününün *E. coli* hücrelerine transformasyonu yukarıda açıklandığı gibi yapılmıştır.

Bileşenler	Miktar
İnsert (23 ng/μl)	1,5 μl
Vektör (9 ng/μl)	5 μl
10X T4 tamponu	1 μl
T4 DNA ligaz	0,5 μl
dH ₂ O	2 μl
Son hacim	10 μl



3' HK'nın vektöre yerleştirilmesiyle konstraksiyonu tamamlanan pCHXR-CTH34KO vektörü Tetrahymena hücrelerine transforme edilmeden önce KpnI enzimiyle (Thermo Scientific, #ER0521) aşağıda gösterilen bileşenlerle ve reaksiyon koşullarında lineer hale getirilmiştir.

Bileşenler	Miktar
Vektör (500 ng/μl)	20 μl
10X KpnI tamponu	5 μl
10 u/μl KpnI	1,25 μl
dH ₂ O	23,75 μl
Son hacim	50 μl

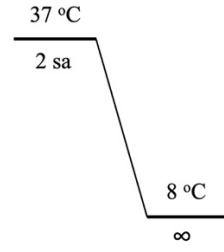


EK-4.2. Restriksiyon ve ligasyon reaksiyonlarıyla hedef proteaz sekanslarının pMcoDel vektörüne yerleştirilmesi

CYP6, CTH40, CTH90 ve CTH115 proteaz hedef dizilerinin PZR amplifikasyonundan sonra her bir hedef sekans NEBuilder DNA Assembly karışımı (NEB, #E2621L) kullanılarak NotI FD (Thermo Scientific, #FD0593) ile kesilen pMcoDel vektöründe IES dizisi arasına yerleştirilmiştir. Bileşenler ve reaksiyon koşulları aşağıda gösterilmiştir.

pMcoDel vektörünün NotI FD ile kesimi;

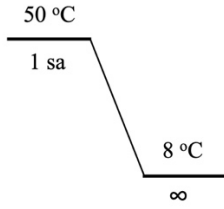
Bileşenler	Miktar
Vektör (50 ng/μl)	68 μl
10X FD tamponu	8 μl
NotI FD	2 μl
dH ₂ O	2 μl
Son hacim	10 μl



Kesim sonrasında vektörün 2 μl'si agaroz jele yüklenip vektörün tam kesildiği teyit edilmiştir. Kalan 77 μl kesilmiş plazmit ise PZR temizleme kiti (Thermo Scientific, #K0702) protokolüne göre saflaştırılmıştır.

Hedef sekansların Gibson assembly yöntemiyle pMcoDel vektörüne entegrasyonu;

Bileşenler	Miktar
Vektör (32 ng/μl)	2 μl
İnsert (730-900 ng/μl)	1 μl
NEBuilder mix	3 μl
Son hacim	10 μl



Reaksiyon bittikten sonra 4 proteaz hedef sekans için de oluşturulan vektörler daha önce bahsedilen protokol ile *E. coli* DH5α hücrelerine transforme edilmiş, büyüyen kolonilerden çizgi ekim yapılmış ve koloni PZR ile doğru vektörleri taşıyan koloniler belirlenmiştir. Sonrasında bu kolonilerden vektör izolasyonu yapılmıştır.

EK-5. *T. thermophila*'nın Biyolistik Parçacık Dağıtım Sistemiyle Transformasyonu

0,6 μm boyutlarında 30 mg altın partikülü (Bio-Rad 165-2262) tartılarak 1 ml steril suda çözülmüş ve 5-10 sn vortekslenerek homojen hale getirilmiştir. Suda çözülen altın partikülleri kısa bir spin ile çöktürülmüş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Sonraki adımda sırayla %70'lik ve %100'lük etanol ile yıkanan partiküller son olarak 1 ml su ile yıkanmış ve 500 μL %50' lik steril gliserol ile çözülmüştür. Hazırlanan altın partikülleri eşit hacimlerde tüplere bölünerek -20 °C'de saklanmıştır. Ayrıca 0,1 M spermidin, ve 2,5 M CaCl₂ hazırlanıp 0,2 μm'lik filtre ile steril edilmiştir.

EK-5.1. *Tetrahymena*'da biyolistik silah ile somatik transformasyon

Tetrahymena'nın biyolistik silah ile transformasyonu Cassidy-Hanley ve arkadaşları tarafından başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş rutin bir uygulamadır ve aşağıdaki adımları içermektedir:

- 1- Öncesinde somatik transformasyon için hücreler önceden 50 ml besiyerinde büyütülür ve ~250.000 hücre/ml konsantrasyona geldiklerinde santrifüjlenir (swing rotorlu santrifüjde 1000 g'de 3 dk) ve ideali gece boyu olmak üzere en az 6 saat açlık tamponunda (10 mM Tris, pH 7,4) inkübe edilir.
- 2- Transformasyon günü vektör DNA'larının transformasyona hazır hale getirilmesi için öncelikle vektör 1 µl'de 3 µg olacak şekilde 55 °C'de yaklaşık 1 saat konsantre edilir.
- 3- 3 µg DNA üzerine sırasıyla 10 µL altın partikülü, 10 µl 2,5 M CaCl₂, 4 µl 0,1 M spermidin her ekleme öncesi 3 sn. vorteksleme yapılarak eklenir. Verilen tüm hacim ve ölçüler 1 atış için gereken miktarlardır.
- 4- Tüm bileşenler eklendikten sonra DNA-altın karışımı 4 °C'de 10 dk çalkalamalı olarak karıştırılır.
- 5- Ardından 4 °C'de 10.000 g'de 15 sn santrifüjlenerek DNA kaplı altın partiküllerinin çökmesi sağlanır ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırılır.
- 6- Altın partikülleri önce %70'lik 100 µl, sonra ise %100'lük 100 µl etanol ile spin atırılarak yıkanır.
- 7- Yıkama adımından sonra 10 µl %100'lük etanolde çözülür ve steril kabinde makrotaşıyıcı üzerine boşaltılarak kuruması beklenir.
- 8- Kuruduktan sonra DNA kaplı makrotaşıyıcı, makrotaşıyıcı ateşleme birimi üstüne önce durdurma perdesi olacak şekilde yerleştirilir ve cihaza yerleştirilir.
- 9- Her bir atış için 5 milyon aç hücre 50 ml falkon tüp dibinde santrifüjlenerek toplanır. Süpernatant boşaltılarak 500 µl açlık tamponu eklenir.
- 10- Önceden otoklavlanmış içinde dairesel wattman kağıdı olan cam petri tabağındaki kağıt nemlendirilir ve çöktürülen hücreler filtre kağıdının ortasından ¾'lük kısmına kadar dairesel olarak yayılır.
- 11- Cihazı çalıştırmadan önce 1 adet 900 psi'lik rupture disk izopropanolle ıslatılır ve rupture disk tutma kapağına yerleştirilerek sıkıştırılır.

- 12- Biyolistik silah çalıştırıldıktan sonra vac düğmesi en st kademeye getirilip vac vanası açılarak sisteme gaz basıncı dolması sağlanır. Basıncı 26,5-27,0 Hg'ye ulaştığında vac düğmesi hold'a getirilir. Herşey hazır olduğunda "fire" tuşuna basılır. DNA kaplı partiküller cam pepti tabağına saıldıktan sonra vac düğmesi vent kademesine getirilir ve vent vanası da açılarak basınç dengelenir. Cihazdan ıkarılan tabağa ~25 ml NEFF besiyerini eklenip gece boyu kendilerini toparlamaya bırakılır.

EK-5.2. *Tetrahymena*'da biyolistik silah ile coDel vektörünün transformasyonu

coDel vektör transformasyonu somatik KO vektörü transformasyonundan farklı olarak konjugasyondaki hücrelere uygulanmaktadır. Bunun için star hat çaprazlamasıyla elde edilen SB210/2dR1 ve SB210/2dR10 hatları konjugasyona alınmış ve izlenen adımlar listelenmiştir:

- 1- SB210/2dR1 ve SB210/2dR10 50 ml NEFF içeren flasklara ekilmiş ve 2 gün 30  C'de büyütülür. Büyütülen kültürler santrifüjlenip açlık tamponuna alınır ve en az 6 saat açlıkta bırakılır.
- 2- Transformasyon günü her bir atış için toplam 10 milyon hücre (5 milyon SB210/2dR1, 5 milyon SB210/2dR10) kültürlerden gelen hücre sayısı eşit olacak şekilde steril bir flaskta (konjugasyona alınan kültürün hacim/yüzey alanı= 1/10 oranını sağlayacak bir flask) karıştırılır ve çalkalama olmaksızın 30  C'de inkübasyona bırakılır.
- 3- Yaklaşık 4 saat sonra konjugasyona giren hücrelerin girmeyenlere oranı gözlenir. BU oran %80 ve üstü olmalıdır.
- 4- Ateşleme konjugasyonun 7. saatinde yapılır. Bu saate gelinmeden 1 saat önce yukarıda bahsedildiği gibi vektör hazırlığına (altınla kaplanması, alkolden geçirilmesi vb.) başlanır. 7. saate gelindiğinde konjugasyondaki hücreler steril 50 ml'lik falkonda toplanır ve swing rotorlu santrifüjde 900 g'de 3 dk santrifüjlenir.
- 5- Yukarıda bahsedilen biyolistik atış adımları uygulanarak hücrelerin transformasyonu tamamlandıktan sonra cam petriye 20 ml açlık tamponu eklenir ve konjugasyonu tamamlamaları için gece boyu inkübasyona bırakılır. Ertesi gün antibiyotik seçilimi için hücreler 100  g/ml paramomisinli besiyeri eklenerek 96-kuyulu tabaklara pasajlanmıştır.

EK-6. RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve PZR Uygulaması

MAK genomundan silinen ilgili proteaz genlerinin KO hatlardaki mRNA ifadesini incelemek için aşağıda verilen protokol ve kitler kullanılmıştır:

- 1- KO hatlar ve SB210, 1 ml NEFF içeren 24-kuyulu tabakta 2 gün büyütülür.
- 2- RNA izolasyonu öncesi gerekli benç ve araçları nükleazlardan temizlemek için %0,01'lik dietilpirokarbonatlı (DEPC) su hazırlanır ve kullanımda olan her şey bu su ile temizlenir.
- 3- Büyüyen *Tetrahymena* kolonileri eppendorf tüplere alınarak 10.000 g'de 5 dk santrifüjlenir. Bu işlem süpernatant döküldükten sonra 1 ml temiz açlık tamponu eklenerek tekrar edilir.
- 4- RNA izolasyon kitinde (Macherey-Nagel NucleoSpin RNA, 740955.50 ya da Monarch Total RNA Miniprep Kit, T2010S) belirtilen protokole uygun olarak hücre pelletlerinden total RNA izolasyonu yapılır ve nanodrop ile RNA konsantrasyonları ölçülür.
- 5- Total RNA'dan cDNAsentezi için, her bir RNA örneğinden 4 µg alınıp toplam 20 µl'lik ekstra DNaz I (Thermo Scientific, EN0525) enzimiyle 37 °C'de 1 saat (gDNA kontaminasyonunun görüldüğü durumda 2 saat) muamele edilir. Bu reaksiyonun 10 µl'si (2 µg RNA) cDNA sentez kiti (Abm EasyScript Plus cDNA Synthesis Kit, #G236) protokolünde belirtilen reaksiyon kurulur. Protokole göre 2µg RNA içeren PZR tüplerine 1 µl oligodT (10 µM) ve 1 µl dNTPmix (10 µM) eklenip nükleaz-free su ile 14,5 µl'ye tamamlanır. Kısa bir santrifüjlemeden sonra termal döngüleyicide 65 °C'de 5 dk, 4 °C'de en az 1 dk inkübasyona bırakılır. Ardından her tüpe 5X RT tamponundan 4 µl, ribonükleaz inhibitöründen (40 u/µl) 0,5 µl ve RTazdan (200 u/µl) 1 µl eklenir. Spin atırılan tüpler termal döngüleyiciye yerleştirilip 50 °C'de 50 dk, ardından 85 °C'de 5 dk inkübasyona bırakılır. Kullanılan bileşenler kit ile temin edilmektedir.
- 6- Elde edilen cDNA'ların 1µl'si, ifadesi incelenen genlere spesifik primer çiftleriyle beraber Taq polimerazla (Thermo Scientific, #EP0401) kurulan PZR için kalıp olarak kullanılır.

EK-7. Tez Kapsamında Uygulanan Rutin SDS-PAGE Protokolleri

EK-7.1. 6X örnek yükleme tamponunun hazırlanması

Toplam 10 ml yükleme boyası hazırlanmak için 50 ml'lik temiz bir falkon tüpe 2,1 ml distile su, 1,2 ml tris (0,5 M pH 6,8) ve 1,2 g SDS eklenir. SDS tamamen çözünene kadar 50 °C su banyosunda ısıtılır ve ara ara köpürtmeden çalkalanır. Ardından 6 mg bromofenol mavisi ve 4,7 ml %100 gliserol eklenerek karıştıma işlemine devam edilir. Bu haliyle oda sıcaklığında saklanabilir. Eğer yüklenecek örnekler denatüre edilecek ise bu solüsyona %5 β -merkaptoetanol eklenir ve kullanımdan sonra kalan -20 °C'de saklanır. Eğer yükleme tamponu olması gereken pH'da ise bromofenol mavisi eklendikten sonra net bir mavi renk alır. Bu renk oluşmadığı gözlemlendiğinde tampon pH kontrolleri yapılarak tekrar hazırlanmıştır.

EK-7.2. Glisin SDS-PAGE hazırlığı, örneklerin koşturulması ve boyanması

Uygun görülen orandaki jel belirlenip gerekli kimyasallar aşağıdaki tabloda görülen miktarlarda ilave edilir. Amonyum persülfat (APS) hariç (her seferinde taze hazırlanır) diğer kimyasallar önceden hazırlanıp 4 °C'de muhafaza edilebilmektedir. Jel tamponu, ayırma jeli ve yükleme jeli konsantrasyon ve pH olarak farklılık gösterip ayırma jeli için 1,5 M Tris pH 8,8 hazırlanırken yükleme jeli için 0,5 M tris pH 6,8 hazırlanır. 6x SDS-PAGE boyası ile karıştırılan protein örnekleri maksimum 30 μ l olacak şekilde kuyulara yüklenir. Örnekler yükleme jelini geçene kadar 60 V (10-15 mA), sonrasında ise 85-120 V (30-35 mA)'da renkli protein belirteci takip edilerek koşturulur (yaklaşık 2-3 saat) ve ardından %30 asetik asit, %40 etanol, %0,05 coomassie brilliant blue G-250 (Thermo Scientific, #20279) içeren coomassie solüsyonuyla 1 saat çalkalamalı tabloda boyama yapılır. Boyaması biten jellerin gece boyu distile su ile arka plan boyası akıtılır (destaining) ve görüntülenir.

Kimyasallar	%5 Yükleme jeli	%12 Ayırma jeli	%15 Ayırma jeli	%18 Ayırma jeli
ddH ₂ O	5,7 ml	3,4 ml	2,4 ml	1,4 ml
Jel tamponu	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
%30 akrilamit/bisakrilamit	1,7 ml	4,0 ml	5,0 ml	6,0 ml
%10 SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
%10 APS	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l

TEMED	10 µl	5 µl	5 µl	5 µl
-------	-------	------	------	------

EK-8. *T. thermophila* Sıvı Azotta Hücre Dondurma ve Canlandırma Protokolü

EK-8.1. Sıvı azotta uzun süreli hücre saklama

Cam tüp stoklarındaki hücreler seçim antibiyotiklerini içeren (coDel transformant hatlar için gerekli değildir) 50 ml modifiye NEFF besiyerine ekilerek 30 °C’de 2-3 gün büyütülmüş ve ardından açlık tamponu olan Tris-HCl (pH 7.5)’ye alınmıştır. Hücreler açlık tamponunda 30 °C’de 3 gün bekletildikten sonra 10 milyon hücre olacak şekilde pelletlenmiş ve 500 µl steril açlık tamponu ile çözülerek üzerine 2 ml steril %10 DMSO ilave edilmiştir. Çözülen hücreler her birinde 300 µl olacak şekilde kriyo tüplere paylaştırılmış ve yarım saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra Mr. Frosty dondurma kabına alınarak -80 °C’de gece boyu bekletilmiştir. Ertesi gün tüpler sıvı azota aktarılmış ve yerleri sıvı azot defterine not edilmiştir.

EK-8.2. Sıvı azotta saklanan hücrelerin canlandırılması

Sıvı azottan çıkarılan tüpler doğrudan 42 °C’lik sıcak su banyosuna konulmuştur. Yaklaşık 1 dk içinde hücrelerin üzerine daha önceden 42 °C’ye getirilmiş NEFF besiyeri ilave edilmiş ve yavaşça pipetlenerek hücreler çözülmüştür. Çözülen hücreler daha önce 30 °C’ye getirilmiş 10 ml NEFF besiyeri içeren petri tabağına alınmış ve hareketlenene kadar 30 °C’de inkübe edilmiştir (1-2 gün). Canlanan hücre sayısı pasajlanma seviyesine geldiğinde hücrelerden cam tüp stoğu oluşturulmuştur.

EK-9. Tez Çalışmasında Tasarlanan ve Kullanılan Primerler

Tez kapsamında PZ reaksiyonlarında kullanılan primer dizileri aşağıda listelenmiştir:

Primer adı	Dizi (5’→3’)
CTH34-5’HA-F	ATTGCGGCCGCAATGACTTTCATGTCTGAGATG
CTH34-5’HA-R	ATTGTCTACCTAAACCACATATCCTAAGAATGTG
CTH34-3’HA-F	ATTCCCGGAAGACGAGAATACTAATTGTGTC
CTH34-3’HA-R	ATTGGTACCCATATCGTTTCATTATAGCCCGT
CTH34-F	GATAGAATAGCTAGTAAGAATCC
CTH34-R	CGAAGATTCTCTTTCTTTGGTTG
CHXR-R	GTATAAATCGTGAATCAGTAGC
CTH34cDNA-F	TGTTGATTGGAGAGACGCTGG

CTH34cDNA-R	CTTAGCGAAACCAACACAACCG
coDelCYP6-F	CTTTATTGTTATCATCTTATGACCGCACTTATTTCTTGTGGCTTAGC
coDelCYP6-R	CTCATCAAGTTGTAATGCTAAAATGCGTAAACAAAGATTGAATGAAGCGAG
coDelCTH40-F	CTTTATTGTTATCATCTTATGACCGCCTATCTTTATTGTCGCTGCCTTATTG
coDelCTH40-R	CTCATCAAGTTGTAATGCTAAAATGCAGTAACGACTTGAGCTTCAATACC
coDelCTH90-F	CTTTATTGTTATCATCTTATGACCGCAAGTACGGATTCAAGTTCGCTGAC
coDelCTH90-R	CTCATCAAGTTGTAATGCTAAAATGCGTTAGGAGTAACCTAAACGAAGCTC
coDelCTH115-F	CTTTATTGTTATCATCTTATGACCGCCAGATTGATAATTCATGCCATTTGTG
coDelCTH115-R	CTCATCAAGTTGTAATGCTAAAATGCATAATGTAGTCGAAAGCAGAGTCC
coDelCYP6check-F	AATTAAGTTGAGAAATGATAGCTGC
coDelCYP6check-R	GAATTTTGCTGAAGCTAAATAGTAATC
coDelCTH40check-F	CTACAAACAATTACGACGATATCCTTC
coDelCTH40check-R	GGTAGCCAAAATTGAAAATGATGAAG
coDelCTH90 check-F	ATGGAGTTCTATTTGTAAGTAGTC
coDelCTH90 check-R	ATATTTCTATAATTTATTCTGATATTTTTCTC
coDelCTH115check-F	GATGCATACATACATACAAGCAGC
coDelCTH115check-R	AGACAAAGAGCTAATGGTAAGATATGAG
CYP6cDNA-R	AAGTGTAGGCAACAGCATCAG
CTH115cDNA-F	TACTCTTGTTGCTATCGCTGC
DNZ22-F (F-XhoI)	ATAGGGCCCGTTTATGATGGATTCGTTTCAAAAATGC
DNZ22-R (R-ApaI)	ATGCTCGAGTATGAATAATCATGAACTTAATAGGGCAAGT

EK-10. *T. pyriformis* Tetraîn ve *T. thermophila* CYP6 Amino Asit Dizileri

>Tetraîn_T. pyriformis

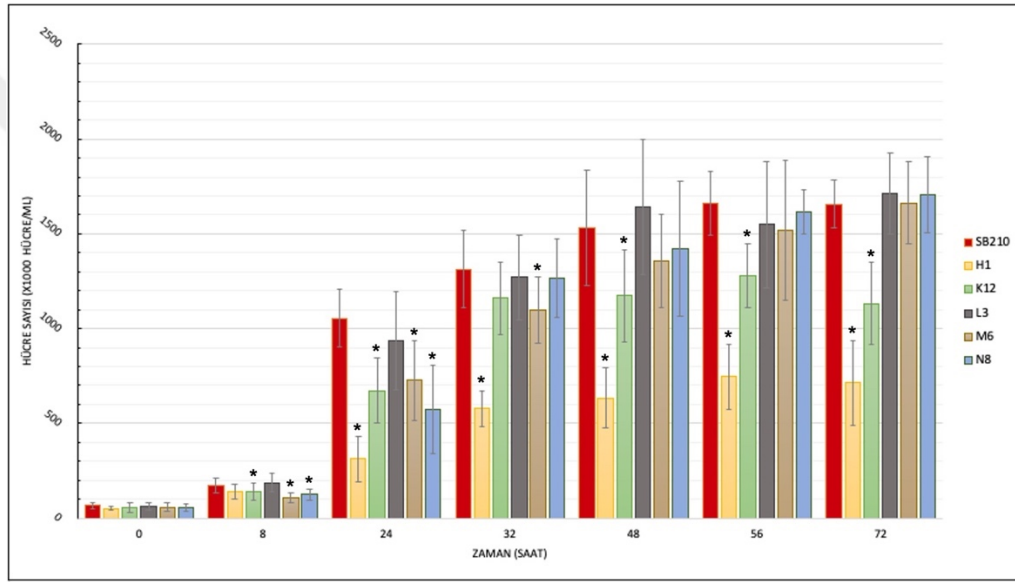
MNWAQLLIGLTLLGAATVYVITRNPADGHLEHYAFQKFKRNFGVITYKNQGEESYRLSVFL
ENLKSIEANNANPLSTHVEEVNSFTDLTEEEFAARYLMKDLPPQMNKDLPILEMETLAAPQ
VIDWTAKNVLPVKNQQQCGSCWAFSTAGMLEGVYNIHESPQTPISFSEQQLVDCCGAQGF
GCEGCNGAWPTDAVAYTQKFGIVQESQYAYTAKDGSCKTALQGTGYKPSAQFQVAATDAAL
QAALQVQPISICVDASKWSSYSKGIFSNCSAKPSAADHAVLLVGLNADNTWKVRNSWGTSW
GQSGYITLAAGNTCLENYAIYATY

>CYP6_T. thermophila

MKLTYFLVGLALIGAATVYLITRNPNGDGHLDMYSFLKFKRSFNVQYHNESEESYRLSVFL
ENLKMIEKHNDSTRTYDQEVNQFADLTIEEFESRYLMKSLPSQLNKNLAVNLNETASQP
IDWTTKNVLPGVKNQQQCGSCWAFSTAGLLESVYNIHNKPNTPIISFSEQQLVDCCGAEGFG

CEGCGGAWPTDAVAYTQKFGIVQESQYAYTAKDGKCNKTLEGVGYKPSQQFQVTASDAALQ
AALQNQPISICVDASQWSSYASGVFPQSKCSSDPNAADHAVLLVGYNANGTWKVRNSWGTS
WGVGGYITLAAGNTCGLENYAIYATY

EK-11. *Tetrahymena* SB210 Suşu Kültürü ve KO Hücre Kültürlerinin Flask Ortamında Büyüme Eğrisi Karşılaştırması



Şekil EK-11.1: Şekil 3.10'da çizgi grafiği olarak verilen SB210 ve KO hat flask kültürlerine ait büyüme eğrisi burada standart sapma barlarının daha rahat gösterilmesi amacıyla sütun grafiği olarak verilmiştir. $p \leq 0,05$ 'de SB210'a kıyasla anlamlı olan değerler * ile işaretlenmiştir. 0-8 saat: lag fazı; 8-32 saat: erken log fazı; 32-48 saat: geç log fazı; 48-72 saat durağan faz olarak belirlenmiştir. Büyüme eğrilerinde renklerin temsil ettiği hücre kültürleri grafik üzerinde verilmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Şeyma DURAN

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim:

- 2018-2022, Yüksek Lisans, Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji A.B.D., Moleküler Biyoloji Bilim Dalı, GNO: 3,78
- 2011-2016, Lisans, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, GNO: 2.98
- 2010-2011, İngilizce Hazırlık, İstanbul Teknik Üniversitesi, Yabancı Diller Yüksekokulu

Stajlar:

- 2014, University of Heidelberg, Center of Organismal Studies, Almanya (3 ay zorunlu staj)

Projeler:

- 2021-2023, Araştırmacı, TÜSEB 2020-Yİ-02 /Yenilikçi İlaç Stratejik Ar-Ge Çağrısı-4595 (Anti-kanser İlaç Rituksimab'ı Parçalayan Proteaz Enzimlerinin *T. thermophila* Sekretomunda Belirlenmesi, Kimliklendirilmesi ve Genomdan Silinerek mAb Üretim Verimliğinin Arttırılması)

Ödüller:

- 2019-2020, TÜBİTAK, BİDEB, 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Bursiyeri, Ankara

Kurs ve Sertifikalar:

- 2013, qPCR (real-time Polimerase Chain Reaction) Workshop, İstanbul Teknik Üniversitesi, Uluslararası Öğrenci Kongresi
- 2014, Data Analysis Using MS Excel, Çalışma Kampı, İstanbul Teknik Üniversitesi, İşletme Fakültesi