

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

***Pichia pastoris* MAYALARINDAN REKOMBİNANT EKSPANZİN
ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU**

Asliye KARAASLAN

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2017**

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1. Proteinler, Protein Sentezi, Proteinlerin Sınıflandırılması.....	4
2.2. Rekombinant Proteinler ve Rekombinant Proteinlerin Endüstriyel Kullanımı	9
2.3. Mikrobiyal Rekombinant Protein Üretimi.....	12
2.3.1. Bakterilerin rekombinant protein üretiminde kullanımı.....	13
2.3.2. Küflerin rekombinant protein üretiminde kullanımı	14
2.3.3. Mayaların recombinant protein üretiminde kullanımı.....	15
2.4. Ekspanzin Proteinleri	26
3. MATERYAL ve YÖNTEM	29
3.1. Materyal	29
3.2. Domates Bitkisinden Hedef Gen Bölgesi (LeExp1) İzolasyonu.....	29
3.3. Çalışmada Kullanılan Suşlar, Sinyal Sekansları ve Vektörlerin Dizayını	30
3.4. RNA İzolasyonu	32
3.5. Ekspanzin Geninin Yarı Kantitatif Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT- PZR) Vasıtasıyla Çoğaltılması.....	33
3.6. LeExp1 geninin pPIC9K ve pHIL-S1 Vektörlerine Klonlanması.....	34
3.7. pPIC9K ve pHIL-S1 Vektörlerinin Çoğaltılması.....	34
3.8. pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 Vektörlerinin <i>Pichia pastoris</i> Hücrelerine Elektroporasyonu	36
3.9. Mut ⁺ (Methanol utilization-plus) Fenotipinin Belirlenmesi	38
3.10. Rekombinant Mayaların PZR Reaksiyonu ve Antibiyotikli Besiyerinde Seçilimi.....	39
3.11. Transgenik <i>Pichia pastoris</i> Suşlarının Ekspresyonu	40
3.12. <i>Pichia pastoris</i> 'te Rekombinant Ekspanzin Enzimi Üretme Yeteneğinin Belirlenmesi ve Saflaştırılması	41
3.13. Toplam Protein Konsantrasyonu.....	41
3.14. Kuru Hücre Ağırlıkları.....	42
3.15. SDS- PAGE (Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) Analizi	42
3.16. Western Blot Analizi.....	42
3.17. Ekspanzin Proteininin Selülozik Aktivitesinin HPLC Yöntemiyle Tayini	42
3.18. İstatistiksel Analizler	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	44
4.1. <i>Solanum lycopersicum</i> Genomundan LeExp1 Komplementer DNA'sının (cDNA) İzolasyonu	44
4.2. LeExp1 Hedef Genlerini Taşıyan pPIC9K ve pHIL-S1 Vektörlerinin İnşa Edilmesi	48
4.3. pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 Vektörlerinin <i>E. coli</i> Hücrelerine Transforme Edilmesi	52
4.4. <i>Pichia pastoris</i> Mayalarının pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 Vektörleri ile Transformasyonu (dönüştürülmesi).....	56
4.5. Transgenik Mayaların PZR Reaksiyonu Vasıtasıyla Genom Analizi ve Antibiyotikli Besiyerinde Seçimleri.....	60
4.6. Mut ⁺ (Methanol utilization-plus) Fenotipinin Belirlenmesi	68
4.7. Rekombinant <i>Pichia pastoris</i> Hücrelerinin Seçilimi.....	72
4.8. Rekombinant <i>Pichia pastoris</i> Hücrelerinin Fermentasyon Ortamında LeExp1 Genlerini Transkribe Etme Yeteneklerinin Araştırılması	75
4.8.1. pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 vektörlerini içeren SMD1168 <i>Pichia pastoris</i> suşunun LeExp1 gen transkripsiyonu.....	76
4.8.2. pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 vektörlerini içeren GS115 <i>Pichia pastoris</i> suşunun	

LeExp1 gen transkripsiyonu	79
4.9. Rekombinant Ekspanzin Proteinlerinin SDS-PAGE Yöntemiyle Ayrıştırılması	80
4.10. <i>Pichia pastoris</i> 'te Üretilen Rekombinant Ekspanzin İfadesinin Enziminin Saflaştırılması....	85
4.11. Rekombinant Ekspanzin Proteinlerinin Western Blot Yöntemiyle İmmunolojik Tanımlanması.....	87
4.12. Rekombinant <i>Pichia pastoris</i> 'in Fermentasyon Ortamında Protein Salgılama Yeteneğinin Araştırılması	88
4.12.1. Transgenik <i>Pichia pastoris</i> mayalarının ekspresyon süresi boyunca kuru hücre ağırlıkları.....	88
4.12.2. Transgenik <i>Pichia pastoris</i> mayaları tarafından üretilen toplam protein miktarları (mg/L).....	94
4.13. Elde Edilen Rekombinant Ekspanzin Enzimlerinin Enzimatik Aktivitesinin Belirlenmesi ...	99
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	106
KAYNAKLAR.....	109
ÖZGEÇMİŞ	118
EKLER	120



ÖZET

Doktora Tezi

Pichia pastoris MAYALARINDAN REKOMBİNANT EKSPANZİN ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU

Asliye KARAASLAN

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Hasan VARDİN
Yıl: 2017, Sayfa:123

Bu çalışmada *Solanum lycopersicum* (domates) bitkisinden ekspanzin üretiminden sorumlu gen bölgesi (LeExp1) izole edilerek metilotropik bir maya olan *Pichia pastoris* mayalarında rekombinant olarak ekspanzin proteinlerinin üretilmesi sağlanmıştır. LeExp1 gen dizilimi sırasıyla alfa mating faktör (AMF) ve *Pichia pastoris* asit fosfataz (*PHO1*) sekresyon sinyal sekanslarına sahip pPIC9K ve pHIL-S1 vektörlerine uygun enzimler vasıtasıyla aktarılmıştır. Hedef gen ile klonlanmış vektörler ısı şoku yolu ile *E. coli* JM109 hücelerine transforme edilmiş ve burada çoğaltılmıştır. Klonlanan vektörler elektroporasyon vasıtasıyla *Pichia pastoris* GS115 ve SMD1168 suşlarına transfer edilmiştir. PZR yöntemiyle transfer işlemi doğrulanmıştır ve elde edilen dört adet transgenik suştan ekstraselüler rekombinant protein üretimi AOX1 promotörü kontrolünde, pH 6.0'da, 200 rpm'de, 30°C'de 96 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Eksprese edilen toplam protein miktarı Bradford assay analizleri ile hesaplanmış ve elde edilen proteinler SDS-PAGE yöntemi ile poliakrilamid jel üzerinde görüntülenmiştir. Western-Blot yöntemi ile poliklonal ekspanzin antitadileri kullanılarak ekspanzin proteinleri tanımlanmıştır. Elde edilen ekspanzin proteinlerinin meyve suyu endüstrisinde kullanılan selülozik enzimlere olan sinerjistik etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonunda pPIC9K vektörünü taşıyan, proteaz enzimleri inhibe edilmiş SMD1168 transgenik suşundan 283 mg/L düzeyinde, GS115 suşuna göre yaklaşık olarak 1.4 kat daha fazla rekombinant ekspanzin proteini elde edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: *Pichia pastoris*, LeExp1, pPIC9K, pHIL-S1, GS115, SMD1168

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

OPTIMIZATION OF RECOMBINANT EXPANSIN PRODUCTION from *Pichia pastoris* YEAST

Asliye KARAASLAN

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Food Engineering Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hasan VARDİN
Year: 2017, Page: 123

In this study LeExp1 gene from *Solanum lycopersicum* (tomato) genome was isolated and recombinantly expressed in methylotropic *Pichia pastoris* in order to produce expansin proteins. Open reading frame of LeExp1 gene transferred to pPIC9K and pHIL-S1 vectors containing alpha mating factor and acid phosphatase secretion signals, respectively. The vectors harboring target gene subcloned to *E. coli* JM109 competent cells via heat-shock method. The cloned vectors were transformed to *Pichia pastoris* GS115 and *Pichia pastoris* SMD1168 strains by electroporation. The presence of the transgene in *Pichia pastoris* genome was verified by Polymerase Chain Reaction (PCR) and recombinant expansin protein expression was carried under the control of AOX1 promoter, at pH 6.0, 30°C, 200 rpm for 96 hours from four different transgenic strains (GS115-pPIC9K-Exp1, GS115-pHIL-S1-Exp1, SMD1168-pPIC9K-Exp1, SMD1168-pHIL-S1-Exp1). The amount of expressed of total proteins were determined by using Bradford Assay and recombinant proteins separated and visualized on polyacrylamide gels (SDS-PAGE). Immunodetection of recombinant expansin proteins were conducted by using polyclonal tomato expansin antibodies. The synergistic activity of recombinant expansin proteins on cellulolytic enzymes were investigated. The higher amount of proteins were obtained from SMD1168-pPIC9K-Exp1 and SMD1168-pHIL-S1-Exp1 cell lines compared to those of GS115 lines. The proteins obtained from SMD1168 cells displayed higher synergistic activity with cellulolytic enzymes compared to recombinant proteins obtained from GS115 cells.

KEY WORDS: *Pichia pastoris*, LeExp1, pPIC9K, pHIL-S1, GS115, SMD1168

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimime başladığım ilk günden itibaren tüm çalışmam boyunca maddi manevi hiçbir desteğini benden esirgemeyen, laboratuvar çalışmalarım ve deneyler süresince bütün konularda bana yardımcı olan, ilgi alakasını eksik etmeyen ve fikirleriyle ışık tutarak yolumu aydınlatan danışman hocam sayın Doç Dr. Hasan VARDİN'e en içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım. Tez dönemi boyunca yaptığım çalışmaları değerlendirerek çalışmama yön veren tez izleme komitesi üyeleri sayın Prof. Dr. Mutlu AKIN'a ve Doç. Dr. Coşkun DALGIÇ'a yardımlarından ötürü çok teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarım boyunca yaptığım bütün işlerde her zaman yanımda olan ve bana vakit ayırarak yardımcı olan arkadaşım Arş. Gör. Selin ALİHANOĞLU'na, deneylerim süresince benden yardımlarını esirgemeyen Gıda Mühendisliği Bölümü Yüksek Lisans öğrencileri Demet EKTİREN, Merve AKBABA, Serap GÜNEŞ ve Meral ATLI'ya çok teşekkür ederim.

Hayatımın her anında olduğu gibi eğitim çalışmalarım boyunca yanımda olan, bütün zor anlarımda yardıma koşan ve desteklerini her daim hissettiğim anneme, babama ve kardeşlerime ayrı ayrı teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmam süresince gerek okulda gerekse evde bana her türlü konuda yardımcı olan, yaptığım çalışma boyunca karşıma çıkan tüm zorlukları benimle paylaşarak yükümü hafifleten, tecrübelerini benimle paylaşarak işlerimi kolaylaştıran, maddi manevi her türlü desteği sağlayarak yanımda olduğunu her zaman hissettiren sevgili eşim Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN'a ve biricik oğlum Ferzan'ıma en derin ve samimi duygularıyla minnetlerimi sunarım.

Ayrıca bu çalışmaya 113O392 numaralı proje kapsamında mali destek sağlayan TÜBİTAK'a desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. İki aminoasit arasında oluşan peptid bağı	6
Şekil 2.2. Proteinlerde görülen yapılar.....	7
Şekil 2.3. Proteinlerin yapılarına göre sınıflandırılması.....	8
Şekil 3.1. Hedef geni, vektörleri ve suşları gösteren deneme dizaynı.....	31
Şekil 4.1. <i>Solanum lycopersicum</i> ekspansin geninin (LeExp1) spesifik primerler kullanılarak PZR yöntemiyle çoğaltılması sonucu elde edilen %1.2 agaroz jel görüntüsü.....	45
Şekil 4.2. <i>Solanum lycopersicum</i> genomundan izole edilmesi hedeflenen LeExp1 gen bölgesine ait nükleik asit dizilimi.....	46
Şekil 4.3. LeF1 ve LeR1 spesifik primerleri kullanılarak <i>Solanum lycopersicum</i> genomundan çoğaltılan gen bölgesi ve bu bölgenin NCBI bilgi bankasından elde edilen AF548376 giriş numaralı LeExp1 mRNA'sına ait dizilimle karşılaştırılması.....	47
Şekil 4.4. LeExp1 genini taşıyan pPIC9K vektörünün şematik gösterimi.....	50
Şekil 4.5. LeExp1 genini taşıyan pHIL-S1 vektörünün şematik gösterimi.....	51
Şekil 4.6. 100 µg/ml ampisilin içeren Luria Bertani katı besiyerinde geliştirilen pPIC9K-Exp1 vektörünü içeren JM109 kompetent <i>E. coli</i> hücreleri.....	52
Şekil 4.7. pPIC9K-LeExp1 vektörü ile transforme edilmiş JM109 kompetent hücrelerinin katı LB besiyerinde oluşturdukları kolonilerin antibiyotikli sıvı besiyerine inoküle edilmesi ve gece boyunca 37°C-200 rpm'de inkübe edilmesi sonucunda elde edilen hücre kültürü....	53
Şekil 4.8. pPIC9K-LeExp1 vektörüyle transforme edilen JM109 kompetent <i>E. coli</i> hücre kültüründen izole edilen plazmidlerin DNA kaynağı olarak kullanıldığı PZR ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	55
Şekil 4.9. pPIC9K-LeExp1 ve pHIL-S1-LeExp1 vektörleri ile transforme edilmesi amacıyla kullanılan kompetent <i>P. pastoris</i> GS115 hücreleri.....	56
Şekil 4.10. pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1 vektörleri ile transforme edilmiş GS115 hücreleri.....	58
Şekil 4.11. pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1 vektörleri ile transforme edilmiş SMD1168 hücrelerinin elektroporasyon sonrasında histidin bulunmayan minimal dextrose (MD) katı besiyerinde karakteristik gelişimlerini gösteren şekil.....	59
Şekil 4.12. His ⁺ GS115-pPIC9K-Exp1 kolonilerin katı MD besiyerinden seçimi ve MD sıvı besiyerine inokülasyonu.....	61
Şekil 4.13. Transgenik <i>P. pastoris</i> GS115 ve SMD1168 maya hücrelerinden spesifik LeExp1 primerleri kullanımıyla elde edilen reaksiyon ürünlerinin %1.2 agaroz jel üzerinde gösterimi.....	62
Şekil 4.14. 0.5 mg/ml düzeyinde antibiyotik içeren YPD besiyerinde gelişim gösteren GS115-pPIC9K-Exp1 hücreleri.....	65
Şekil 4.15. 1 mg/ml antibiyotikli besiyerinde gelişen GS115-pPIC9K-Exp1 maya kolonileri.....	66
Şekil 4.16. Farklı konsantrasyonlarda genetsin 418 antibiyotiği içeren YPD besiyerlerinde geliştirilen GS115 pPIC9K-LeExp1 rekombinant <i>Pichia pastoris</i> hücreleri.....	67
Şekil 4.17. Rekombinant protein ekspresyonunda kullanılmak üzere 4.0 mg/ml genetsin 418 antibiyotik içeren ortamda gelişebilen maya kültürleri	68
Şekil 4.18. Sırasıyla MM ve MD'de gelişim gösteren transgenik GS115-pPIC9K-Exp1 ve GS115-pHIL-S1 maya hücreleri.....	70
Şekil 4.19. MM ve MD besiyerlerinde gelişim gösteren transgenik SMD1168-pPIC9K-Exp1 ve SMD1168-pHIL-S1-Exp1 maya hücreleri.....	71
Şekil 4.20. His ⁺ Mut ⁺ karakteristik fenotipine sahip <i>P. pastoris</i> GS115 β-Galaktosidaz suşları.....	72
Şekil 4.21. LeExp1 geninin pPIC9K-Exp1 vektörünü taşıyan SMD1168 <i>Pichia pastoris</i> hücrelerinde fermentasyon esnasında transkripsiyonunun %1.2 agaroz jel üzerindeki gösterimi.....	77
Şekil 4.22. LeExp1 geninin pHIL-S1-Exp1 vektörünü taşıyan SMD1168 <i>Pichia pastoris</i> hücrelerinde fermentasyon esnasında transkripsiyonunun %1.2 agaroz jel üzerindeki gösterimi.....	78
Şekil 4.23. LeExp1 geninin pPIC9K-Exp1 vektörünü taşıyan GS115 <i>Pichia pastoris</i> hücrelerinde fermentasyon esnasında transkripsiyonunun %1.2 agaroz jel üzerindeki gösterimi.....	80
Şekil 4.24. LeExp1 geninin pHIL-S1-Exp1 vektörünü taşıyan GS115 <i>Pichia pastoris</i> hücrelerinde fermentasyon esnasında transkripsiyonunun %1.2 agaroz jel üzerindeki gösterimi.....	81
Şekil 4.25. pPIC9K-Exp1 vektörünü taşıyan SMD1168 hücrelerinin fermentasyon ortamından alınan	

süpernatantın SDS-PAGE görüntüsü	83
Şekil 4.26. pHIL-S1-Exp1 vektörünü taşıyan SMD1168 hücrelerinin fermentasyon ortamından alınan süpernatantın SDS-PAGE görüntüsü	83
Şekil 4.27. pPIC9K-Exp1 vektörünü taşıyan GS115 hücrelerinin fermentasyon ortamından alınan süpernatantın SDS-PAGE görüntüsü	84
Şekil 4.28. pHIL-S1-Exp1 vektörünü taşıyan GS115 hücrelerinin fermentasyon ortamından alınan süpernatantın SDS-PAGE görüntüsü	84
Şekil 4.29. Saflaştırılmış ve ultrafiltre edilmiş ham özütün protein profilinin SDS – PAGE yöntemi ile gözlemlenmesi.....	85
Şekil 4.30. Fermentasyon ortamından izole edilen ekstraselüler <i>P. pastoris</i> proteinlerinin poliklonal ekspanzin antibadisi kullanılarak elde edilen Western blot verisi.....	87
Şekil 4.31. SMD1168-pPIC9K-Exp1, SMD1168-pHIL-S1-Exp1, GS115-pPIC9K-Exp1 ve GS115-pHIL-S1-Exp1 transgenik suşlarına ait maksimum kuru hücre ağırlık değerlerinin zamana bağlı değişimi.....	94
Şekil 4.32. SMD1168-pPIC9K-Exp1, SMD1168-pHIL-S1-Exp1, GS115-pPIC9K-Exp1 ve GS115-pHIL-S1-Exp1 transgenik suşlarından elde edilen toplam protein miktarlarının zamana bağlı değişim grafiği	98
Şekil 4.33. Artan oranlarda SMD1168-pPIC9K-Exp1 ekspanzin (µg Ekspanzin/g filter kağıdı) yanında sabit miktarda ticari vegazim enzimi eklenerek filtre kağıdından ekstrakte edilen glukoz ve sellobioz miktarları	100
Şekil 4.34. Artan oranlarda SMD1168-pHIL-S1-Exp1 ekspanzin (µg Ekspanzin/g filter kağıdı) yanında sabit miktarda ticari vegazim enzimi eklenerek filtre kağıdından ekstrakte edilen glukoz ve sellobioz miktarları	101
Şekil 4.35. Artan oranlarda GS115-pPIC9K-Exp1 ekspanzin (µg Ekspanzin/g filtre kağıdı) yanında sabit miktarda ticari vegazim enzimi eklenerek filtre kağıdından ekstrakte edilen glukoz ve sellobioz miktarları.....	103
Şekil 4.36. Artan oranlarda GS115-pHIL-S1-Exp1 ekspanzin (µg Ekspanzin/g filtre kağıdı) yanında sabit miktarda ticari vegazim enzimi eklenerek filtre kağıdından ekstrakte edilen glukoz ve sellobioz miktarları.....	104

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. <i>Pichia pastoris</i> ekspresyon sisteminde kullanılan bazı vektörler ve özellikleri.....	20
Çizelge 2.2. <i>Pichia pastoris</i> mayalarının rekombinant protein üretiminde en fazla kullanılan suşları.	22
Çizelge 2.3. <i>Pichia pastoris</i> ekspresyon sistemi ile üretilen bazı proteinler.....	24
Çizelge 3.1. <i>Solanum lycopersicum</i> genomundan LeExp1 açık okuma bölgesinin çoğaltılması için kullanılan primerler.....	36
Çizelge 4.1. Her bir transgenik suşa ait 4 mg/ml antibiyotikli besiyerinde gelişim gösteren ve rekombinant protein ekspresyonunda kullanılan koloni sayısı	75
Çizelge 4.2. Transgenik suşlara ait 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki kuru hücre ağırlıkları (g/L).....	92
Çizelge 4.3. Dört adet transgenik suşa ait 24, 48, 72 ve 96. saatlerde maksimum kuru hücre ağırlık değerleri (g/L).....	93
Çizelge 4.4. Transgenik suşlardan elde edilen toplam protein miktarları.....	96
Çizelge 4.5. Dört adet transgenik suştan 24, 48, 72 ve 96. saatlerde üretilen toplam protein miktarları (mg/L)	97
Çizelge 4.6. Sabit oranda vegazim (5 FPU) ile artan miktarda eklenen rekombinant ekspanzinin (SMD1168-pPIC9K-Exp1) filtre kağıdı üzerine hidrolizinin etkisi.	99
Çizelge 4.7. Sabit oranda vegazim (5 FPU) ile artan miktarda eklenen rekombinant ekspanzinin (SMD168-pHIL-S1-Exp1) filtre kağıdı üzerine hidrolizinin etkisi.....	101
Çizelge 4.8. Sabit oranda vegazim (5 FPU) ile artan miktarda eklenen rekombinant ekspanzinin (GS115-pPIC9K-Exp1) filtre kağıdı üzerine hidrolizinin etkisi.	102
Çizelge 4.9. Sabit oranda vegazim (5 FPU) ile artan miktarda eklenen rekombinant ekspanzinin (GS115-pHIL-S1-Exp1) filtre kağıdı üzerine hidrolizinin etkisi.	104

1. GİRİŞ

Metilotropik bir maya olan *Pichia pastoris* mayası uzun yıllardır rekombinant protein üretiminde kullanılan bir mikroorganizmadır. *P. pastoris* mayası sahip olduğu ökaryotik yapısı sayesinde doğada az miktarda bulunan veya endüstriyel öneme sahip proteinlerin üretiminde bir biyofabrika olarak kullanılabilir. *P. pastoris* mayası translasyon sonrası proteinlerde meydana gelen modifikasyonları doğru şekilde yapması, proteinlerin aktif formlarına uygun şekilde katlanmalarına olanak sağlaması, g/L düzeylerinde protein üretme yeteneğine sahip olması, başarılı transformasyonlarına olanak sağlayan metotların geliştirilmiş olması, hücre dışına çok az natif protein salgılaması ve dolayısıyla ekstraselüler proteinlerin üretim ve saflaştırılmasını kolaylaştırması nedenlerinden dolayı son yıllarda yaygın olarak heterolog protein üretiminde kullanılmaktadırlar.

Rekombinant protein üretiminde ve hedef proteini üretmek için yapılan dizaynda belirlenmesi gereken temel basamaklar dört gruba ayrılmaktadır. Bu basamaklar eksprese edilmesi hedeflenen genin belirlenmesi ve izole edilmesi, hedef geni konakçıya taşıyacak vektörün seçimi ve hedef genin vektöre aktarılması, protein ekspresyonu yapılacak olan konakçının tespit edilmesi ve vektörün konakçı hücreye aktarılması, konakçıda rekombinant proteinin ifade edilmesi ve saflaştırılması olarak sayılabilir.

Literatür incelendiğinde, *P. pastoris* mayasının farklı proteinlerin rekombinant olarak üretiminde kullanıldığı görülmektedir. Çeşitli küfler, bakteriler ve memeliler gibi basit veya kompleks yapıli organizmalara ait proteinler *P. pastoris* ekspresyon sistemi kullanılarak başarılı bir şekilde ve önemli düzeylerde üretilmiştir. Rekombinant protein üretim çalışmalarında hücre içi veya hücre dışı protein ekspresyonu, farklı vektör kullanımı, farklı *P. pastoris* suşlarının kullanımı, farklı karbon kaynaklarının kullanımı gibi farklı faktörler denenmiştir. Yapılan çalışmaların sonucunda kolay manipüle edilebilmesi, uygun genetik tekniklerin varlığı, aktif formda protein üretimine olanak vermesi ve düşük maliyetinden dolayı

P. pastoris ekspresyon sistemi heterolog protein ekspresyonunda uygun bir seçim haline gelmiştir (Cereghino ve ark., 2002).

Bu tez çalışmasının amacı son yıllarda rekombinant protein üretiminde yaygın ve başarılı bir şekilde kullanılan metilotropik *P. pastoris* mayaları kullanılarak domates bitkisinden izole edilen ve meyve sebzelerin hücre duvarı bileşenlerini parçalama yeteneğine sahip, olgunlaşma aşamalarında bitki tarafından yüksek düzeyde eksprese edilerek dokuların yumuşamasını sağlayan ekspanzin enzimlerinin üretilmesidir.

Çalışmanın birinci aşaması, hedef gen diziliminin belirlenmesi ve *P. pastoris* mayalarına transfer etmek amacıyla saflaştırılmasından oluşmaktadır. Bu amaçla rekombinant olarak üretilmesi hedeflenen ekspanzin enziminin domates bitkisinde (*Solanum lycopersicum*) üretiminden sorumlu gen bölgesi (*Lycopersicum esculentum* - LeExp1) dizilimi belirlenmiş ve hedef gen dizilimi uygun metodlar kullanılarak bitkiden izole edilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında, hedef gen bölgesi (LeExp1), pPIC9K ve pHIL-S1 plazmidlerine competent *Escherichia coli* hücreleri vasıtasıyla aktararak elektroporasyon yöntemiyle *P. pastoris* GS115 ve SMD1168 suşlarına klonlanmıştır. Böylece rekombinant protein üretimine hazır hale getirilmiş transgenik maya hücreleri üretilmiştir. pPIC9K ve pHIL-S1 vektörleri genomlarında sırasıyla α -mating factor ve *PHO1* sinyal sekans bölgelerine sahiptir ve bu sekresyon bölgeleri sayesinde fermentasyon esnasında GS115 ve SMD1168 suşları tarafından üretilen proteinlerin kültür ortamına salgılanmaları sağlanmıştır.

Çalışmanın üçüncü aşamasında, transgenik GS115 ve SMD1168 suşları rekombinant ekspanzin üretiminde kullanılmıştır ve ekspresyon boyunca kültür ortamından belirli saatler sonunda -analizlerde kullanmak üzere- örnek alımı yapılmıştır. Ekspresyon denemeleri sonucunda üretilen toplam protein miktarı belirlenerek belirli bir düzeyde protein üretimi sağlanana kadar ekspresyon çalışmaları devam ettirilmiştir.

Çalışmanın son aşamasında, farklı suş - vektör - sekresyon dizilimi kullanımının *P. pastoris* mayalarında rekombinant protein üretimi üzerindeki etkileri belirlenerek ekspresyon çalışmaları sonucunda elde edilen rekombinant ekspanzinlerin miktarının belirlenmesi, tanımlanması, karakterizasyonu ve saflaştırılması için gerekli analizler yapılmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Proteinler, Protein Sentezi, Proteinlerin Sınıflandırılması

Protein kelimesi Latince proteis kelimesinden türetilmiş ve birincil öneme sahip veya yaşam için bulunması zorunlu olan madde anlamına gelmektedir. Proteinler hücrelerde ve hücrenin tüm bölümlerinde en yaygın olarak bulunan makromoleküllerdir ve isminden anlaşılacağı gibi hem canlı organizmaların yapıtaşını hem de metabolik faaliyetlerin yerine gelmesinde görevi olan biyoajanların yapısını oluşturmaktadır. Kuru hücre ağırlığının %50'sinden fazlasını oluşturan proteinlerin yapısında Karbon (C), Azot (N), Oksijen (O), Hidrojen (H) gibi yüksek miktarlarda bulunan atomların yanı sıra Sülfür (S) gibi diğer bazı atomlar da düşük miktarlarda bulunmaktadır.

Proteinler genetik bilginin ifade edildiği moleküler enstrümanlardır. Görece olarak basit yapıdaki monomerik alt üniteler binlerce farklı proteinin sahip olduğu yapıların önemli parçalarıdır. En ilkel bakterilerden yaşamın en kompleks canlı yapılarına kadar organizmalarda bulunan proteinlerin tamamı yaygın olarak bulunan ve farklı kimyasal özelliklere sahip yan zincirler taşıyan 20 adet amino asidin karakteristik kovalent bağlarla birbirine bağlanması sonucu oluşmaktadırlar. Dolayısıyla bu 20 öncül molekül protein yapısını oluşturan alfabe olarak tanımlanır. Hücresel proteinlerin en ilgi çekici özelliklerinin başında 20 amino asidin farklı kombinasyon ve sekanslarda katılımıyla farklı özellik ve aktivitelere sahip proteinlerin sentezlenmesi gelmektedir. Bu çeşitlilik sayesinde farklı organizmalar enzimler, hormonlar, antikorlar, taşıyıcılar, kas lifleri, gözlerdeki lens proteinleri, tüyler, örümcek ağı, boynuzlar, süt proteinleri, antibiyotikler, mantar zehirleri ve birçok farklı biyolojik aktiviteye sahip moleküller oluşturabilmektedirler. Bazı proteinler örneğin enzimler metabolik reaksiyonları hızlandırıcı biyokatalizör görevi yapmaktadırlar (Jez, 2016).

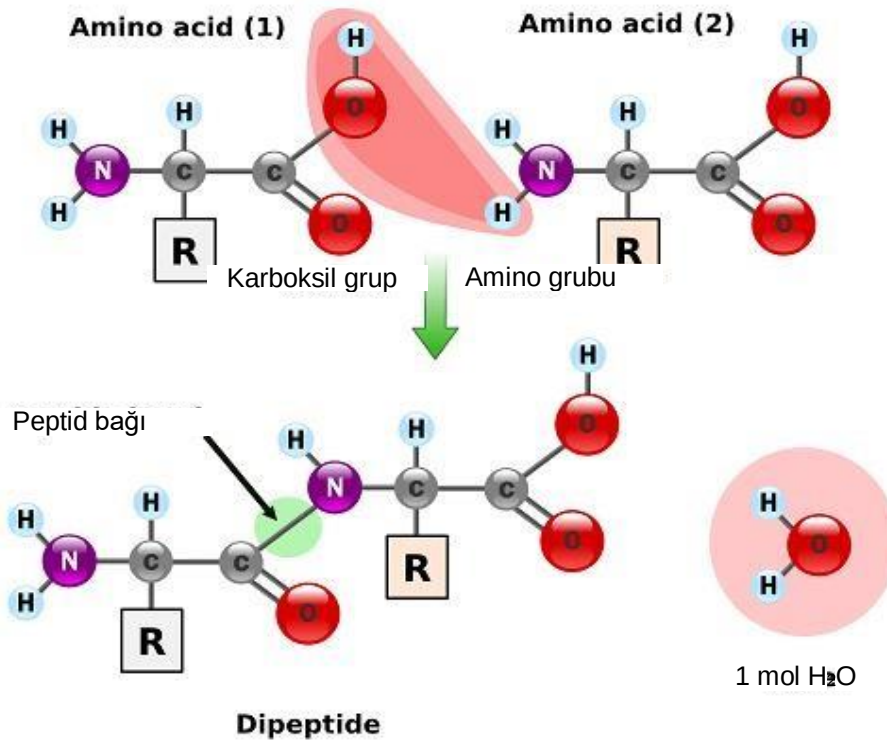
Proteinler doğada önemli düzeyde çeşitlilik göstermekte ve tek bir hücrenin

içerisinde dahi küçük boyuttaki peptidlerden büyük boyuttaki makromoleküllere kadar milyonlarla ifade edilebilecek sayılarda bulunmaktadır. Bunun ötesinde proteinler çok sayıda farklı biyolojik fonksiyona sahip makrobileşenlerdir ve hücre içerisinde saklanan genetik bilginin nihai ürünüdür. Proteinler; vücut dokularının oluşumu, yaraların iyileşmesi, bağışıklık sisteminin güçlenmesi gibi metabolik ve yapısal olayların düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Çeşitli tiplerde protein üretimi bir hücrede gerçekleşen en önemli olaylardan bir tanesidir. Çünkü proteinler hücrelerin yalnızca yapısal bileşenlerinden biri olmayıp ayrıca yaşamın devamı için gerekli olan biyomolekülleri katalizleyen enzimlerin yapısını oluşturmaktadır (Jez, 2016).

Proteinler, hücre içerisinde ribozom adı verilen organellerde sentezlenmektedir. Hem ökaryotik hem de prokaryotik hücrelerde protein sentezi ribozomlarda meydana gelmektedir. Protein sentezi deoksiribo nükleik asit (DNA) üzerinde bulunan genetik bilginin mesajcı RNA'lar vasıtasıyla ribozomlara taşınması ve burada genetik bilginin okunarak protein adı verilen makromoleküller şeklinde ifade edilmesine dayanmaktadır. Bir gen bölgesinden başlayarak protein oluşumuna kadar geçen protein üretim aşaması her hücrede oldukça kompleks ve düzenli bir şekilde kontrol edilen bir süreçtir. Protein üretim prosesi transkripsiyon ve translasyon olmak üzere iki temel basamaktan oluşmaktadır (Jez, 2016).

Transkripsiyon; hücre çekirdeğinde meydana gelen ve hücre DNA'sında protein üretimi ile ilgili bilginin mesajcı RNA'ya transfer edildiği işlem basamağıdır. Transkripsiyon işlemi esnasında ilk olarak transkripsiyon makinesi adı verilen protein kompleksi transkripti sentezlenecek olan geninin bulunduğu DNA bölgesine kromozom üzerinde bağlanmaktadır. Bu bağlanma esnasında ökaryotik hücrelerde çoğu zaman TATA-kutusu yer işaretleyici olarak görev almaktadır. Transkripsiyon makinesi içerisinde bulunan proteinler vasıtasıyla ilk olarak DNA çift zincirindeki hidrojen bağları kırılarak zincirlerin birbirlerinden ayrışması sağlanmakta ve daha sonra RNA polimeraz enziminin çalışmasıyla hedef genin mesajcı RNA'sı sentezlenmektedir. Sentezlenen mesajcı RNA protein sentezi amacıyla ribozomlara gönderilmeden önce çeşitli işlem basamaklarından geçerek olgun hale gelmektedir.

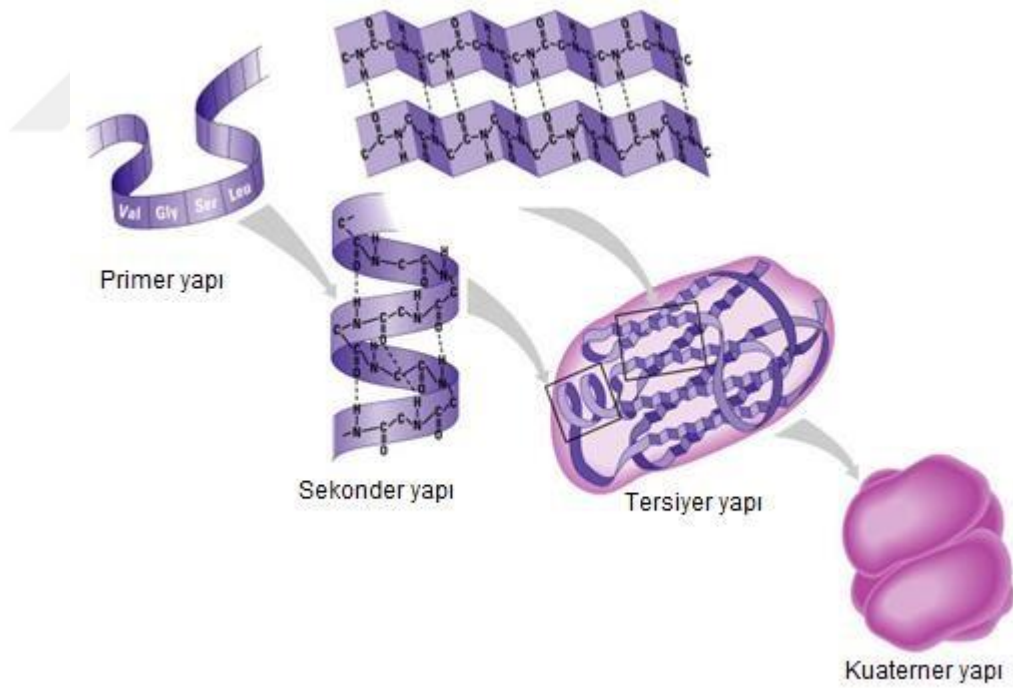
Bunlar arasında RNA splicing adı verilen intron bölgelerinin enzimatik olarak kesilmesi ve uzaklaştırılması, mRNA'nın 5' ucuna protein kapsülün takılması, mRNA'nın 3' ucuna poliA kuyruğunun takılması gibi işlemler sayılabilmektedir. Sözü edilen basamaklardan geçen mRNA molekülü daha sonra protein sentezinde kullanılacak olan genetik bilgiyi taşımak amacıyla elçi olarak hareket ederek ribozomlara ulaşmaktadır. Ribozomlara ulaşan mRNA molekülü ribozomun geniş ve küçük alt bölgeleri arasında okunmaktadır. mRNA yapısında bulunan her üç nükleik asit tarafından kodon adı verilen şifreler oluşturulur. Kodonlarda belirlenen şifreler taşıyıcı RNA'lardaki antikodonlar tarafından çözümlenerek ilgili amino asitin okunan nükleik asitler ve kodonlara bağlı olarak ribozomlara taşınmasını sağlamaktadır. Dolayısıyla ribozomlara mRNA yapısında bulunan nükleik asitler ve bunların oluşturduğu kodonlara bağlı olarak spesifik olarak ilgili amino asitler taşınır ve bu şekilde proteinler amino asit zincirindeki dizilim korunacak ve normal şartlar altında değişmeyecek şekilde sentezlenmektedirler. Protein sentezi sırasında ilk olarak amino asitler arasında peptid bağı kurulmaktadır. İki aminoasit arasında kurulan peptid bağı Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. İki amino asit arasında oluşan peptid bağı

Bütün amino asitler 1 karboksil grup (COOH) ve 1 amino grubu (NH₂) olmak üzere 2 önemli kimyasal bölgeye sahiptir. Karboksil grup; C atomuna çift bağla bağlı bir O atomu ve OH molekülünden oluşur. Amino grubu bir azot molekülüne tek bağlarla bağlanmış iki H atomundan oluşmaktadır. Peptid bağı ribozomlarda protein sentezi oluşurken, iki amino asit arasında, birinci amino asidin karboksil grubuyla ikinci amino asidin amin grubunun bir H₂O molekülü açığa çıkararak oluşturduğu kimyasal bağ türüdür (Jez, 2016).

Ribozomlarda sentezlenen proteinler yapısal olarak dört alt gruba ayrılmaktadır. Bu yapılar birincil yapı, ikincil yapı, üçüncül yapı ve dördüncül yapı olmak üzere isimlendirilmektedir (Şekil 2.2.).

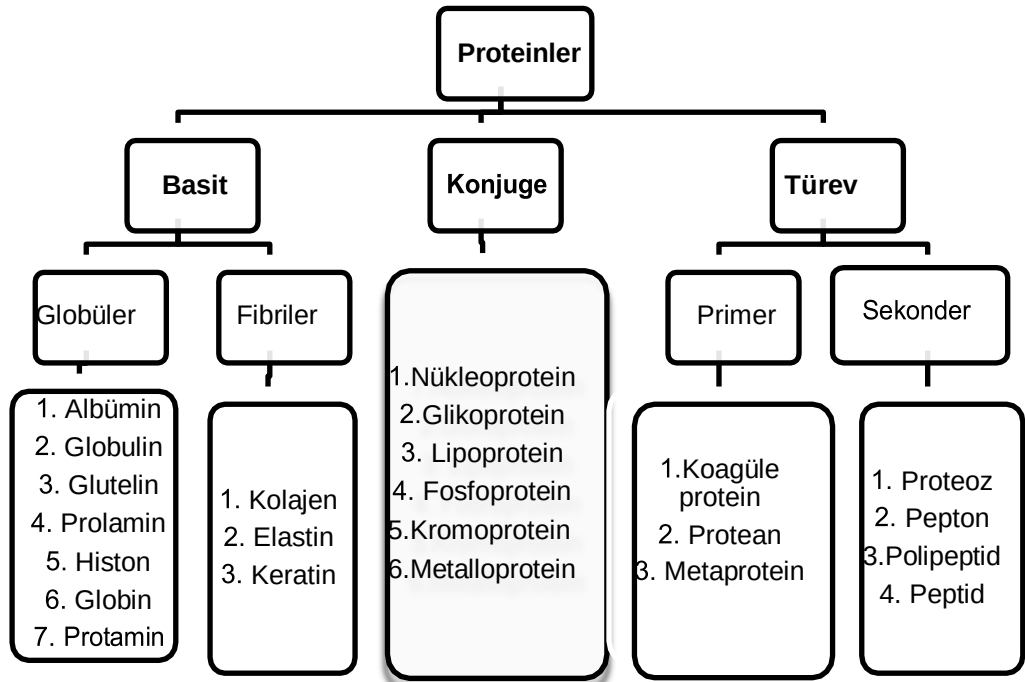


Şekil 2.2. Proteinlerde görülen yapılar

Birincil yapı: aminoasitlerin birbirlerine peptid bağlarıyla bağlanmasıyla oluşan yapıyı ifade eder. İkincil yapı: polipeptidlerin alfa-heliks, beta-sarmal veya rasgele kıvrılması ile oluşan yapı olarak tanımlanır. Üçüncül yapı: non-kovalent

bağların ve bir aktif merkezin olduğu, polipeptidlerin ikincil yapılarının bir araya gelerek oluşturduğu ve proteinin uzaydaki konformasyonunun olduğu üç boyutlu yapı olarak tanımlanır. Dördüncül yapı sadece bazı proteinlerde bulunan bir özellik olup bu yapı birden fazla polipeptid zincirinin çeşitli bağlar vasıtasıyla bir araya gelerek oluşturduğu alt ünitelerden oluşmaktadır (Jez, 2016).

Proteinlerin sınıflandırılması farklı kaynaklarda çok farklı şekillerde yapılmıştır. Temel olarak proteinler basit, konjüge ve türev proteinler olmak üzere üç ana grupta incelenmektedir. Basit proteinler kendi içerisinde globüler proteinler ve fibriler proteinler olarak; türev proteinler ise primer türev proteinler ve sekonder türev proteinler şeklinde alt gruplara ayrılarak incelenmektedir. Ayrıca proteinler bulundukları organizmalarda sahip oldukları biyolojik rollere göre de yedi alt gruba ayrılmaktadır. Bunlar; katalitik proteinler, taşıyıcı proteinler, besleyici ve depo proteinleri, kontraktıl proteinler, yapısal proteinler, savunma proteinleri ve düzenleyici proteinler olarak sıralanabilmektedir. Yapılarına göre proteinlerin sınıflandırılması Şekil 2.3.'de gösterilmektedir (Jez, 2016).



Şekil 2.3. Proteinlerin yapılarına göre sınıflandırılması (Jez, 2016)

2.2. Rekombinant Proteinler ve Rekombinant Proteinlerin Endüstriyel Kullanımı

Proteinler sahip oldukları olumlu özelliklerinden dolayı çok uzun yıllardan beri bilim insanlarının ilgisini çekmiş ve bilimsel alandaki özgün uzmanlaşmaya bağlı olarak biyologlar, kimyagerler, biyokimyagerler ve son yıllarda moleküler biyologların önemli çalışma alanlarından birini oluşturmuştur. Bu alanda çalışan bilim insanları proteinleri elde etmek ve fonksiyonlarını anlayabilmek için uzun yıllar boyunca protein kaynakları aramışlar ve bunları doğal ortamlarında yapılarını bozmadan izole edip saflaştırmak için çalışmalar yürütmüşlerdir. Ancak proteinler gerek az miktarda bulunmaları gerekse kolay bozulabilir kimyasal yapılarından dolayı kolaylıkla elde edilemeyen makrobileşenlerdir. Dolayısıyla genetik mühendisliği ve biyoteknoloji gibi alanlarda kullanılmak üzere gelişen bilimsel faaliyetler ışığında yeni protein elde etme, izole etme, saflaştırma ve üretme teknikleri ortaya çıkmıştır. Rekombinant protein üretme metodu bu teknikler arasında son yıllarda en dikkat çekenlerin başında gelmektedir (Firidin, 2010).

Moleküler genetik çalışmaları alanında son yıllarda artan gelişmeler sayesinde araştırmacılar farklı organizmalardan elde ettikleri DNA moleküllerini *in vitro* ortamda birleştirme imkânı elde etmiştir. Farklı biyolojik türlerden herhangi bir metod ile izole edilen DNA molekülünün genetik mühendislik teknolojisiyle kesilmesi sonucu elde edilen farklı DNA parçalarının birleştirilmesi, işlemlerinin bütününe rekombinant DNA teknolojisi adı verilmektedir. Bu işlemler sonucunda elde edilen yeni DNA moleküllerine Rekombinant DNA adı verilmekte ve kısaca r-DNA olarak yazılabilmektedir (Firidin, 2010).

Rekombinant DNA teknolojisi alanında yapılan çalışmalar temelde hedef genlerin belli organizmalardan izole edilmesi, konakçı hücreye uygun plazmidler veya yöntemler vasıtasıyla aktarılması ve son olarak konakçı hücrede hedef gen bölgesinin çoğaltılması aşamalarından oluşmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisinin bilimsel temeli olan çeşitlenme (rekombinasyon) doğada canlılar arasında görülen ve doğal olarak oluşan çeşitliliğin en önemli nedenlerinden birini

oluşturmaktadır. Rekombinasyon; farklı genotipe sahip bireyler arasında eşleşmeler oluşması durumunda ebeveyn hücreye ait genetik özelliklerin, oluşan dölde değişik gruplanmalar halinde bir araya gelmesine yol açan olaylar zinciridir. Bu olay, moleküler boyutta farklı nükleotid dizilimine sahip iki DNA molekülünün homoloji gösteren bölgeleri arasındaki parça alışverişi sonucunda meydana gelen yeni gruplamalardır. Bunun için kullanılan DNA molekülleri arasında kırılmalar meydana gelir ve kırılma bölgelerinde DNA molekülleri arasında parça alışverişi gerçekleşir.

Rekombinant DNA üretimi transformasyon, bakteriyel olmayan transformasyon ve faj yöntemi olmak üzere üç farklı metodla yapılabilmektedir. Transformasyon yönteminde; hedef gen ve taşıyıcı vektör aynı restriksiyon enzimiyle kesilerek ve DNA ligaz enzimleri vasıtasıyla yapıştırılarak hedef geni taşıyan plazmidler oluşturulur. Hedef DNA parçasının taşıyan plazmidler rekombinant üretimin sağlanması amacıyla konakçı bir hücrenin genomuna aktarılır ve konakçı hücre geliştirilerek rekombinant DNA'nın da hücre ile birlikte çoğaltılması amaçlanır. Kullanılan vektör çoğaltılması hedeflenen DNA parçasının varlığının belirlenmesi amacıyla selektif markörler taşımaktadır ve bu genellikle bir antibiyotik seçim markörü olmaktadır. Antibiyotik seçilimi sayesinde hedef geni taşıyan plazmidlerin içinde bulunduğu konakçı hücre antibiyotik içeren besiyerinde gelişim gösterecektir ve böylece transformasyon işleminin ilk basamakta doğrulanması yapılabilmektedir. Bakteriyel olmayan transformasyon yönteminde, temel prensip transformasyon yöntemiyle benzerlik göstermektedir ve her iki metodun arasındaki tek fark bu yöntemde konakçı hücre olarak bakterilerin kullanılmamasıdır. Mikroenjeksiyon, bakteriyel olmayan transformasyon yöntemine örnek olarak gösterilmektedir. Mikroenjeksiyon yöntemiyle hedef DNA bölgesi direkt olarak konakçı hücre genomuna aktarılmaktadır. Gen tabancası kullanılarak inert materyaller üzerindeki hedef DNA'ların doğrudan hücre içerisine aktarıldığı biolistik yöntemi de bu kapsamda değerlendirilmektedir. Faj kullanılarak gerçekleştirilen rekombinant DNA üretimi ise; fajların yapısına eklenen hedef genlerin konakçı hücreye transenfeksiyonunu içermektedir (Falch, 1991).

Rekombinant DNA teknolojisi sağlamış olduğu şu yararlar ile enzim endüstrisinde önemli ölçüde rahatlık sağlamıştır (Falch, 1991):

- Bitki ve hayvan enzimleri mikrobiyal fermentasyon ile elde edilebilmektedir. Ör; kimozin.
- Enzim üretimi amacıyla kullanılan çeşitli mikroorganizma cins ve türleri mevcuttur. Ör; *Aspergillus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*.
- Etkili sinyal sekans bölgelerinin, güçlü promotörlerin kullanımı ve çoklu sayıda kopyalama ile enzim üretilebilirliği arttırılabilmektedir.
- Patojenik veya toksin üreten organizmalardan elde edilen yararlı enzimler güvenli konakçılarda üretilebilmektedir.
- Protein mühendisliği enzimlerin stabilitesini, aktivitesini ve spesifikliğini arttırmak amacıyla çalışmaktadır.

Hodgson (1994)'a göre 1990'larda birçok enzim rekombinant olarak üretilmekte idi ve 1993'de endüstriyel enzimlerin yarısından fazlası recombinant üretilen enzimlerden oluşmaktaydı. Günümüzde rekombinant DNA teknolojisi ve protein mühendisliği sayesinde kullanıcıların veya kullanılan proseslerin ihtiyacına yönelik 'kişiye özel' enzim üretimi yapılabilmektedir.

Rekombinant proteinler; enzim endüstrisi, ziraat, biyofarmatik gibi önemli alanlarda; ilaç, gıda, beslenme, deterjan, tekstil, deri, kağıt, polimer, plastik vb. birçok ürünün üretiminde büyük katkılar sağlamaktadır (Demain ve Vaishnav, 2009). İlk protein aşısı 1796'da Jenner tarafından; ilk farmasötik protein üretimi ise 1922'de Banting ve Best tarafından gerçekleştirilmiştir (insülin). Modern biyoteknoloji temelleri ilk olarak 1971'de atılmıştır ve bu tarihten 1-2 yıl sonra ise rekombinant DNA teknolojisi keşfedilmiştir. Enzim endüstrisi 1980-1990'larda mikrobiyal enzimlerin kullanılması ile gelişmeye başlamıştır. Yüksek maliyet ve düşük verime

rağmen 1970'lerde enzimlerin önemli bölümü bitki ve hayvanlardan geleneksel olarak elde edilmekte idi. Mikroorganizmaların bitki ve hayvanlardan daha hızlı, daha ucuz çoğaltılması ve ayrıca mikroorganizmalarda istenen kalite ve miktarda enzim üretiminin yapılabilmesi mikrobiyal enzim üretim çalışmalarını arttırmıştır. Dolayısıyla 2000'li yıllarda endüstriyel enzimlerin toplam pazarı iki milyar dolara ulaşmıştır ve bu rakam 2010'da ise yaklaşık olarak iki buçuk milyar dolar olarak tespit edilmiştir (Demain ve Vaishnav, 2009). Proteaz grubu enzimler bu pazarın %57'sini oluşturmaktadır. Geriye kalan kısımda ise amilaz, glukoamilaz, ksiloz izomeraz, laktaz, lipaz, selüloz, pullulanaz ve ksilanaz yer almaktadır. Gıda ve yem sanayii endüstriyel enzimlerin en fazla kullanıldığı alanlardır. Endüstriyel enzimlerin yarısından fazlası maya ve küflerden; %30'u bakterilerden; %8'i hayvanlardan ve %4'ü bitkilerden elde edilmektedir. Yüksek miktarlarda protein elde etmek için uzun yıllar boyunca uygun mikroorganizma araştırılmış ve mutasyondan faydalanılmıştır (Falch, 1991).

Rekombinant protein üretiminin ilk adımı üretilmek istenen enzimi kodlayan DNA bölgesini elde etmek ve çoğaltmaktır. Hedef genin elde edilmesinin ardından hedef geni taşıyacak uygun bir vektörün bulunması, hedef geni ifade edecek şekilde dizayn edilmiş olan vektörün uygun bir metotla konakçı hücreye aktarılması ve konakçı hücreyi uygun koşullar altında geliştirerek rekombinant proteinin üretilmesi yer almaktadır.

2.3. Mikrobiyal Rekombinant Protein Üretimi

Bilimsel gelişmeler sürecinde bakteriler, mayalar, küfler, memeli hücreleri, bitkiler, böcekler veya transgenik bitki ve hayvanlar olmak üzere çok sayıda protein ekspresyon sistemi geliştirilmiştir. Bu sistemler içerisinde endüstriyel olarak en fazla kullanılanları mikrobiyal rekombinant protein üretim sistemleridir. Rekombinant mikrobiyal protein üretiminde temelde bakteriler, küfler ve mayalar kullanılmaktadır. Ekspresyon sistemi seçilirken; protein kalitesi, fonksiyonelliği, üretim hızı ve verimi dikkat edilecek hususlardan birkaçıdır. Glikolize olmamış proteinler genellikle *E.coli* ve mayalarda üretilmektedir. Mayalar, küfler ve böcek hücreleri genellikle

memelilerdeki glikolizasyonu gerçekleştirememektedir (Demain ve Vaishnav, 2009).

2.3.1. Bakterilerin rekombinant protein üretiminde kullanımı

Escherichia coli, heterolog protein üretiminde ilk kez ve en fazla kullanılan konakçı hücre olarak tanımlanmaktadır (Terpe, 2006) ve çok sayıda ticari proteinin yüksek miktarlarda üretilmesinde kullanılmaktadır. *E.coli* ekspresyon sistemi glikolizasyona uğramamış proteinlerin fonksiyonel ekspresyonunda mükemmel bir üretim sağlamaktadır. *E. coli* ekspresyon sistemi kendine özgü birtakım avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Bir konakçı hücre olarak *E. coli* kullanımının başlıca avantajları; hızlı ekspresyon sağlama, yüksek miktarda ve verimde protein üretimi, hücrelerin kültüre alınmasının ve genom modifikasyonlarının kolay gerçekleşmesi ve düşük maliyetli oluşu şeklinde sayılabilmektedir. Ayrıca *E. coli* konakçı hücrelerinde bakteri genomu hızlıca amaca yönelik olarak modifiye edilebilmekte, promotör kontrolü ve plazmid kopya sayısının artırılması kolaylıkla yapılabilmektedir. *E. coli* konakçı hücrelerinin dezavantajları; proteinlerin inaktif olarak üretilmesi, disülfid bağına sahip proteinlerin ekspresyonunun güç olması, proteinlerin endotoksinleri ile birlikte sentezlenmesi, glikolizasyonun gerçekleştirilememesi ve ekspresyon esnasında oluşan asetatın hücreler üzerinde toksik etki göstermesi olarak sıralanabilmektedir (Swartz, 1996). *E. coli* hücrelerinde rekombinant protein üretim prosesinin düzenlenmesi ve üretim veriminin artırılması amacıyla farklı promotör ve suş kullanımı, natif protein üretim veriminin düşürülmesi, kültür ortamının farklı bileşenlerden oluşturulması, sıcaklığı azaltma ve benzeri uygulamaları gerçekleştirmek mümkündür (Swartz, 2001; Choi ve Lee, 2004; Mergulhao ve ark., 2005; Shiloach ve Fass, 2005; Maldonado, 2007; Chou, 2007; Wong ve ark., 2008).

Bakteriyel sistemler arasında *E. coli*'den sonra en kullanışlı olan ekspresyon sistemi Gram (+) basillerdir. *Bacillus* ekspresyon sistemi özellikle proteaz (deterjan sanayii) ve amilaz (nişasta ve fırın sanayii) üretiminde kullanılmaktadır. *Bacillus* ekspresyon sisteminin avantajlarını; kolay manipüle edilebilmesi, genetik olarak iyi tanımlanmış bir sistem olması, düşük maliyetli oluşu, yüksek düzeyde gelişmiş transformasyon teknolojisine sahip olması, büyüme ve gelişme karakteristiklerinin

mükemmel oluşu şeklinde saymak mümkündür. Ekspresyonda kullanılan *Bacillus* türleri genellikle; *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. brevis* olmak üzere dört türden oluşmaktadır. *B. subtilis* ve *B. licheniformis* bakterilerinin genomları sekanslanmıştır ve ekspresyon esnasında ekzotoksin/ endotoksin oluşturmaları belirlenmiştir. Dolayısıyla bu bakteri sistemleri kullanılarak rekombinant olarak üretilen proteinin ekspresyon ortamına sekresyonu oldukça kolaydır ve doğal şekilde gerçekleşmektedir. Sekresyon amacıyla herhangi bir teknoloji kullanımına gerek duyulmamaktadır. *B. brevis* çok düşük miktarda proteolitik aktiviteye sahip olduğundan ve ayrıca proteinaz inhibitörü ürettiğinden ekspresyon sistemi olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Udaka ve Yamagata, 1994).

2.3.2. Küflerin rekombinant protein üretiminde kullanımı

Konakçı olarak kullanılan küf hücrelerinin sahip olduğu en önemli özellikler yüksek sayıda kopyanın transforme edilmesi ve post translasyonel modifikasyonları gerçekleştirebilmeleridir. Yabancı genler plazmidler vasıtasıyla yüz kopyaya kadar ve uzun süreli genetik stabilite sağlayacak şekilde küf genomlarına aktarılabilmektedir. Ekspresyon sistemi olarak kullanılan küfler genellikle post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirebilmektedir. Rekombinant protein üretiminde birçok küf türü kullanılmaktadır. Bunların içerisinde en fazla kullanılan küfler *Aspergillus* türleridir. Bunun yanı sıra rekombinant protein üretimi başarılı bir şekilde gerçekleştirilen küf türlerinden de bahsetmek mümkündür. *Trichoderma reesei*'nin memeli hücrelerindeki benzer bir glikolizasyon sağladığı yapılan çalışmalar neticesinde tespit edilmiştir (Salovouri ve ark., 1987). *Aspergillus awamori* hücreleri kullanılarak 2 g/L düzeyinde insan laktoferrin proteinleri ekstraselüler olarak üretilmiştir (Ward ve ark., 1995). *A. niger* glukoamilaz proteini *A. awamori*'de 4.6 g/L düzeyinde üretilmiştir. *A. niger* glikolizasyon gibi post-translasyonel prosesleri başarılı bir şekilde gerçekleştirme yeteneğine sahiptir. Böylece de rekombinant DNA teknolojisinde cazip şekilde kullanılmaktadır. Ward ve ark. (2006)'a göre *A. niger*'de 25 g/L düzeyinde glukoamilaz proteini ekstraselüler olarak üretilmiştir. *Acremonium chrysogenum*'da *Fusarium* alkalın

proteaz enzimleri 4 g/L düzeyinde üretilmiştir (Durand ve Clanet, 1988). Küflerden elde edilen olumlu sonuçlara rağmen bazen ekstraselüler protein üretim miktarı daha düşük olabilmektedir. Bu tür problemler genellikle güçlü promotör kullanımı, gen kopya sayısının arttırımı, proteaz enzimleri inhibe edilmiş suş kullanımı gibi stratejiler ile giderilebilmektedir.

2.3.3. Mayaların rekombinant protein üretiminde kullanımı

Mayalar, *Escherichia coli* hücrelerinde katlanma ile ilgili problemlerden ötürü çok iyi şekilde üretilmeyen proteinlerin üretiminde yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bir ekspresyon sistemi olarak maya hücrelerinin sahip olduğu başlıca avantajlar; üretim veriminin yüksek olması, hücrelerin uzun süre aktif şekilde kalabilmesi, stabil suşların mevcut oluşu, izotopik olarak işaretlenmiş proteinlerin üretim imkanı, düşük maliyetli oluşu, gelişme besiyerinin belli oluşu ve bu besiyerlerinde hızlı ve yoğun gelişim göstermeleri, üretilen proteinleri glikolize edebilmeleri ve uygun şekilde katlanmalarını sağlayabilmeleri gibi memeli hücrelerinde görülen modifikasyonları sağlayabilmeleri şeklinde sayılabilir. Maya hücreleri genetik olarak çok iyi karakterize edilmiştir ve post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirebildikleri bilinmektedir. Mayalar, böcek ve memeli hücrelerine göre kullanımı daha kolay ve düşük maliyetli yapılardır. Ayrıca fermentasyon ortamına kolaylıkla adapte olabilmek yeteneğine sahiptirler (Gellison ve ark., 1992).

Rekombinant ökaryotik proteinlerin ekspresyonu ve analizlerinde çeşitli maya türleri son derece kullanışlı olmaktadır. Örneğin; *Aspergillus niger* glukoz oksidaz proteini *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak 9 g/L düzeyinde üretilmektedir. *S. cerevisiae* bakterilere göre birçok avantaja sahiptir. Bunlar; endüstriyel fermentasyonda uzun zamandır kullanılmaları, uygun sekans dizilimleri yardımıyla proteinleri besiyeri ortamına salgılama yeteneğine sahip olmaları ve protein glikolizasyonunu gerçekleştirebilmeleri olarak sayılabilir (Gellison ve ark., 1992).

Metanolü karbon kaynağı olarak kullanan ve metilotropik olarak tanımlanan mayalar güçlü ve kontrol edilebilir promotörlara sahiptir. Bu sayede de rekombinant protein üretiminde oldukça ilgi gören konakçı hücrelerdir. Maya hücreleri kolay bir şekilde gelişebilmekte ve besiyerindeki çok küçük değişikliklerle protein üretimi düzenlenebilmekte/arttırılabilmektedirler. Gellison ve ark. (1992) tarafından yapılan bir çalışmada metilotropik mayaların 130 g/L düzeyine kadar gelişim gösterdikleri belirlenmiştir. En çok bilinen metilotropik mayalar; *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* ve *Torulopsis* şeklinde listelenmektedir. Bu mayalar metanolü karbon kaynağı olarak kullanan ortak bir metabolik pathwaya sahiptir. Metilotropik mayaların *S. cerevisiae*'ye göre üstün yönlerinden bazıları; yüksek protein üretim imkanı, hiperglikolizasyonun önlenmesi, yüksek metanol konsantrasyonunda gelişim gösterebilmeleri sayesinde ortamdaki diğer mikroorganizmaların öldürülmesi, kurulumunun ve sürdürülebilirliğinin düşük maliyetli olması, çok sayıda kopya transformasyonu sağlaması şeklinde sayılabilir (Gellison ve ark., 1992). Rekombinant protein üretiminde en fazla kullanılan maya türleri *Saccharomyces cerevisiae* ve *P. pastoris*'dir.

P. pastoris mayaları Fungi alemi, Ascomycota şubesi, Saccharomycetes sınıfı, Saccharomycetales takımı, Saccharomycetaceae familyası, Komagataella cinsinin bir türüdür. *P. pastoris* metanolü karbon kaynağı olarak kullanan bir maya türüdür. Bazı maya türlerinin metanolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanımının keşfi Koichi Ogata tarafından 40 yıldan daha kısa bir süre önce gerçekleştirilmiştir. 1970'li yıllarda Philips Petroleum Company *P. pastoris*'in yoğun kültür ortamında metanol varlığında gelişimi için besiyeri ve yöntemler geliştirmiştir ve 1980'lerin başlarında Philips Petroleum Company ile Salk Institute Biotechnology/Industrial Associate Inc. (SIBIA) *P. pastoris* heterolog protein ekspresyon sistemini geliştirmiştir (Higgins ve Cregg, 1998).

P. pastoris ekspresyon sistemi son yıllarda gerek araştırma amaçlı gerekse de endüstriyel olarak çok sayıda rekombinant protein üretiminde başarılı şekilde kullanılmaktadır (Higgins ve Cregg, 1998). Beş binden fazla proteinin başarılı bir şekilde ekspresyonu *P. pastoris* mayalarını en iyi bilinen heterolog protein

sistemlerinden biri olduğunun göstergesi olmuştur (Kurtzman, 2009; Ahmad ve ark., 2014; Spohner ve ark., 2015). *P. pastoris* ekspresyon sistemi kolay kullanımı, düşük maliyetli oluşu ve hızlı ekspresyon yeteneği gibi özelliklerinden dolayı oldukça popüler bir sistem haline gelmiştir. Ayrıca *P. pastoris* ekspresyon sistemi en güçlü ve en yüksek verimli promotörlerden biri olan alkol oksidaz 1 promotörüne sahiptir (Cereghino ve Cregg, 2000). Yapılan çalışmalar *P. pastoris*'in 20-30 g/L düzeyinde rekombinant protein üretebileceğini göstermektedir (Morrow, 2007).

P. pastoris üç önemli nedenden dolayı farklı türlere ait proteinlerin ekspresyonuna uygundur: genetik düzeyde kolaylıkla manipüle edilebilir, proteinleri intraselüler veya ekstraselüler olarak yüksek miktarlarda eksprese edebilir, glikozilasyon, disülfid bağlarının oluşumu ve proteolitik işlemler gibi yüksek ökaryotik hücrelerde görülen protein modifikasyonlarını gerçekleştirebilir (Cereghino ve ark., 2002). Bu karakteristik özelliklerinden dolayı bakteriler, *S. cerevisiae* veya baculovirüslerde fonksiyonel olarak aktif halde eksprese edilemeyen bazı proteinler *P. pastoris*'de başarılı bir şekilde üretilmiştir. *P. pastoris* ekspresyon sistemi birçok nedenden dolayı yaygın olarak kullanılan bir protein ekspresyon sistemidir. Fakat bu nedenlerden iki tanesi daha fazla öne çıkmaktadır: bunlardan birincisi *P. pastoris*'in ileri derecede verimli ve kontrollü olarak transgenlerin ekspresyonunu sağlayan alkol oksidaz I (AOXI) promotörüne sahip olmasıdır. AOXI promotörü glukoz veya benzeri karbon kaynaklarının bulunduğu besiyerlerinde hemen hemen hiçbir aktivite gösteremezken besiyerine karbon kaynağı olarak metanol eklenmesi durumunda aktivitesi bin kattan daha fazla artmaktadır. İkincisi ise; *P. pastoris*'in büyüme esnasında fermentatif gelişim yerine ağırlıklı olarak respirasyonu tercih etmesidir. Fermentatif büyüme esnasında ortamda biriken etanol ve asetik asit kısa sürede yüksek seviyelere ulaşmakta ve hücreler için toksik hale gelebilmektedir. Bu nedenlerden dolayı çok sayıda araştırmacı son yıllarda bu metilotropik özellikteki mikroorganizmaları heterolog protein üretiminde kullanmıştır (Cereghino ve ark., 2001).

P. pastoris mayaları en fazla kullanılan bakteriyel rekombinant üretim sistemi

olan *E. coli* hücrelerine göre birçok avantaja sahiptir. Bunlardan en önemlisi *Pichia*'da disülfid bağları oluşumunun ve glikolizasyonun gerçekleştirilmesidir. Disülfid bağlarına sahip proteinlerin üretiminde *E. coli* hücreleri bu bağları kurma yeteneğinde olmadığından dolayı üretilen proteinlerde yanlış bir katlanma ve dolayısıyla inaktif protein elde edilmektedir. Ayrıca üretilen protein çözünmez formda olmaktadır. *P. pastoris* tek karbon kaynağı ve azot kaynağında gelişim gösterebilmesi sayesinde proteinlerin izotopik olarak etiketlenmesine uygun bir yapı haline gelmiştir. *P. pastoris*'in diğer maya hücrelerine göre en önemli avantajlarından bir tanesi proteinleri besiyeri ortamına salgılama yeteneklerinin çok kuvvetli olmasıdır. *P. pastoris* mayaları kullanılarak ekstraselüler protein üretiminde ciddi bir başarı sağlanmıştır (Gerngross, 2004; Hamilton ve ark., 2006).

Daha önce değinildiği gibi *P. pastoris* mayaları karbon kaynağı olarak metanolü kullanmaktadır ve bu kullanım durumuna göre *P. pastoris* suşları Mut (+) (Methanol utilization plus) ve Mut (s) (Methanol utilization slow) olmak üzere iki farklı fenotip oluşturmaktadır. Ticari olarak üretilen herhangi bir *P. pastoris* suşu metanolü etkin veya düşük miktarda kullanımına göre bu fenotiplerden biri ile tanımlanır. Fenotiplerdeki farklılık *P. pastoris*'de bulunan AOX1 ve AOX2 olarak adlandırılan iki farklı promotörün etkisinden doğmaktadır. AOX1 ve AOX2 *P. pastoris*'de alkol oksidaz proteinlerini kodlayan genlerdir. AOX1 geninin ekspresyonu metanol varlığında çok yüksek seviyelere çıkmaktadır. Metanol varlığında ortamda bulunan toplam proteinin %30'unu AOX1 proteinleri oluşturmaktadır. AOX2 geni %97 oranında AOX1 ile homolog olmasına rağmen metanol varlığında AOX1'e göre çok daha yavaş gelişme gösterir. AOX1 geninin yokluğu/azlığı alkol oksidaz aktivitesini yavaşlatacağından dolayı suşların metanolde düşük oranda gelişme göstermesine neden olur ve böylece Mut^S fenotipinde suşlar oluşur. Mut^S suşlar AOX1 genlerinde mutasyona sahip iken; AOX2 genleri doğal tip halindedir. AOX1 genlerindeki mutasyon sonucunda suşların metanolü metabolize etme yetenekleri azalır. Mut⁺ fenotipi suşların doğal tipde olduğunu ve metanolü karbon kaynağı olarak kullandığını ifade eder (Gerngross, 2004).

P. pastoris ekspresyon sistemi ile heterolog proteinler intraselüler veya

ekstraselüler olarak üretilmektedir ve bu sistemin öne çıkan özelliklerinden bir tanesi üretilmesi hedeflenen proteinin hücre dışına salgılanmasını sağlayan sekresyon sinyal sekans bölgelerini kullanılabilmesidir. Rekombinant protein üretimi esnasında proteinlerin hücre ortamına salgılanması amacıyla kullanılan sekresyon sinyal bölgeleri genellikle vektörler vasıtasıyla konakçı hücreye aktarılır. Heterolog protein üretimi amacıyla *P. pastoris* ekspresyon sisteminde kullanılan birçok vektör doğal tip *HIS4* geni ve bakteriyel ampisilin geni taşımaktadır (Romanos, 1995). *HIS4* geni histidin içermeyen ortamda gelişime göre seleksiyon sağlar. *HIS4* geni yaklaşık olarak 3 kb boyutundadır ve *HIS4* geni taşıyan vektörler genellikle 7-10 kb arasındadır. *P. pastoris* ekspresyon sisteminde sekresyon amacıyla kullanılan -sekresyon sinyal geni taşıyan- vektörler; pHIL-S1, pPIC9, pPIC9K ve pPICZa (A,B,C) şeklindedir. pPIC9K'da *HIS4* genine ek olarak *Kanr* geni de mevcuttur. *Kanr* veya *G418* geni Genetycin 418'e direnç gösterir ve çok sayıda kopyalama yapmak amacıyla kullanılır. Vektörler başlıca *E. coli* hücrelerinde seçim geni, *P. pastoris* hücrelerinde seçim geni ve sekresyon sinyal sekans bölgelerini taşımaktadır. Intraselüler protein üretimi sağlayan vektörlerde sekresyon amacıyla herhangi bir sinyal sekans geni bulunmamaktadır. *P. pastoris* ekspresyon sisteminde sıklıkla kullanılan vektör sistemlerine ait bazı özellikler Çizelge 2.1.'de verilmiştir (Ahmad ve ark., 2014).

Çizelge 2.1. *P. pastoris* ekspresyon sisteminde kullanılan bazı vektörler ve özellikleri (Ahmad ve ark., 2014)

Vektör	<i>E. coli</i> 'de seçilim	<i>P. pastoris</i> 'de seçilim geni	Intraselüler/ Ekstraselüler özellik
pHIL-S1	Amp	<i>HIS4</i> , G418	Ekstraselüler: <i>PHO1</i>
pPIC9	Amp	<i>HIS4</i>	Ekstraselüler: AMF
pPIC9K	Amp	<i>HIS4</i> , G418	Ekstraselüler: AMF
pPICZa(A,B,C)	Zeo	Zeo	Ekstraselüler:AMF
pHIL-D2	Amp	<i>HIS4</i>	Intraselüler
paO815	Amp	<i>HIS4</i>	Intraselüler
pPIC3.5	Amp	<i>HIS4</i>	Intraselüler
pPIC3.5K	Amp	<i>HIS4</i> , G418	Intraselüler
pPICZ (A,B,C)	Zeo	Zeo	Intraselüler

Amp: Amfisilin; Zeo: Zeosin; HIS: Histidin; G418: Genetisin 418; *PHO1*: asit fosfataz; AMF: alfa mating faktör

P. pastoris mayalarının çok az sayıda endojen protein ürettiği olması ekstraselüler protein üretimi açısından oldukça avantaj sağlamaktadır (Chahal ve ark., 2017). Aynı zamanda kültür besiyeri protein içermediğinden dolayı besiyerinde bulunan proteinlerin önemli bir kısmı heterolog proteinlerden oluşmaktadır. Böylece sekresyon olayı proteinlerin saflaştırılmasındaki ilk adım olarak düşünülmekte ve hücrel proteinler ile rekombinant proteinlerin birbirlerine karışması engellenmektedir. Buna rağmen sekresyon opsiyonu genellikle konakçı hücreler tarafından kendilerine ait endojen proteinlerin salgılanmasında kullanılır. Sekresyon proteinlerin ön bölgesinde var olan bir sinyal sekansı olması durumunda meydana gelir ve salgılama yolu aktive olur. Bir çok sinyal sekans bölgesi farklı başarı düzeylerinde *P. pastoris* ekspresyon sisteminde kullanılmaktadır ancak 85 amino asitten oluşan *S. cerevisiae* alfa mating prepro sinyal sekansı *P. pastoris* ekspresyon sisteminde en başarılı kullanılan sinyal sekans bölgesi olmuştur (Cereghino ve Cregg, 2000). Alfa mating prepro sinyal sekans bölgesi iki ayrı gen bölgesinden oluşmaktadır. Bunlar; 19 aminoasitlik pre-peptid ve 67 aminoasitlik pro-peptid bölgesidir (Brake ve ark., 1984; Oka ve ark., 1999; Cregg ve ark., 2000). Maya hücrelerinde alfa faktör sinyal sekans bölgesine ek olarak genellikle *P. pastoris* asit fosfataz (*PHO1*) sinyal sekans bölgesi de sıklıkla kullanılmakta olan sinyal sekans

genidir (Higgins ve Cregg, 1998).

Hızla gelişen rekombinant protein üretim teknolojisi sayesinde yabancı genin birden fazla kopyasını içeren suşların çoğatılması için güçlü antibiyotik direncine sahip vektörler geliştirilmiştir. Örneğin pPIC3K ve pPIC9K vektör seti bakteriyel kanamisin dirençlilik geni içerir ve birden fazla kopya içeren suşların yüksek miktarda Genetisin 418 antibiyotiğine dirençli olmasını sağlarlar. pPICZ serisi vektörler *Streptoalloteichus hindustanus*'a ait 'Sh ble' genini içerirler. Sh ble geni 375 baz çiftinden oluşur ve *E. coli*, mayalar (*P. pastoris* dahil) ve diğer ökaryotların Zeosin antibiyotiğine dirençli olmasını sağlar. 'ble' geni *E. coli* ve *P. pastoris* için seçilimi sağlayan genidir ve zeoR vektörleri yaklaşık 3 kb boyutunda olup diğer *P. pastoris* ekspresyon vektörlerinden daha kolay manipüle edilmektedir. Bu vektörler ayrıca içerisinde özgün restriksiyon bölgeleri bulunan çoklu klonlama bölgesi (Multiple Cloning Site-MCS) içerirler ve aynı zamanda his6 ve myc epitopları enkodlayan sekansların ve yabancı genlerin eklenmesini kolaylaştıran özgün restriksiyon bölgelerine sahip MCS'ye sahiptir. Böylece yabancı proteinlerin karboksil bitiş uçlarında epitoplar gerektiğinde etiketlenebilir. pAO815 ve pPICZ vektör serileri ekspresyon vektörlerinin çoklu ekspresyon kaset kopyası ile dizayn edilmesini kolaylaştıran özelliğe sahiptir (Cregg ve ark., 2000).

S. cerevisiae ve *E. coli* ile karşılaştırıldığında *P. pastoris* ekspresyon suşları daha az sayıdadır ve tüm *P. pastoris* ekspresyon suşları NRRL-Y 11430 (Northern Regional Research Laboratories, Peoria, III.) suşunun türevleridir. Bu suşların bazıları bir veya daha fazla aoksotropik (auxotrophic) genlerde mutasyona sahiptirler (örneğin GS115 (*HIS4*)) ve bu sayede transformasyon sonrasında ekspresyon vektörlerini içeren hücrelerin seçilimini biyosentetik genin (*HIS4*) varlığına bağlı olarak mümkün kılmaktadır. Rekombinant protein üretiminde kullanılan bütün suşlar metanol kullanan fenotiptedir. Bütün bu suşlar kompleks besiyerinde gelişebilirler ancak minimal besiyerinde gelişim için ek olarak histidine ihtiyaç duyarlar. Çizelge 2.2.'de *P. pastoris* mayalarının ticari olarak kullanılan bazı suşları verilmiştir (Ahmad ve ark., 2014).

Çizelge 2.2. *Pichia pastoris* mayalarının rekombinant protein üretiminde en fazla kullanılan suşları (Ahmad ve ark., 2014)

<i>Pichia pastoris</i> konakçı suşları			
Doğal tip	Auksotropik	Proteaz inhibe	Diğerleri
CBS7435	GS115	SMD1163	GS241
CBS704	<i>PichiaPink1</i>	SMD1165	MS105
X-33	KM71	SMD1168	MC100-3
	KM71H	SMD1168H	CBS7435
			<i>ku70 his4</i>
	BG09	SMD1168	
	GS190	kex::SUC2 <i>PichiaPink2-4</i>	
	JC220	BG21	
	YJN165	CBS7435	

Ticari olarak üretilen ve AOX genlerindeki bir veya daha fazla silinmelerden dolayı methanol kullanım yetenekleri değişkenlik gösteren üç farklı konakçı suş mevcuttur. AOX genleri silinmiş suşlar yabancı proteinlerin üretiminde bazen doğal tip suşlardan daha iyi çalışabilmektedir. Bu suşlar ayrıca ekspresyonu arttırmak için daha az miktarda metanole ihtiyaç duymaktadır. En fazla kullanılan ekspresyon konakçı suşu AOX1 ve AOX2 genlerine bağlı olarak doğal tip suş veya GS115 (*HIS4*) suşudur. KM71 suşu kromozomdaki AOX1 geni büyük oranda silinmiş ve *S. cerevisiae*'ye ait *ARG4* geni yerleştirilmiş suştur. Sonuç olarak; bu suş AOX2 geninin azlığına/ zayıflığına bağlı olarak metanolde düşük oranda gelişim gösterir ve Mut^S (Methanol utilization slow) fenotipi özelliği gösterir. Birçok *P. pastoris* ekspresyon vektörü ile Mut⁺ suşu elde etmek için bir ekspresyon kaseti yerleştirmek ve aynı anda AOX1 genini silmek mümkündür. Bir diğer konakçı suş, MC100-3 (*his4 arg4 aox1* Δ ::*SARG4 aox2* Δ ::*Phis4*), her iki AOX geni silinmiş ve metanolde gelişim gösterememe özelliğine sahiptir (Byrne, 2015).

Yapısal olarak bazı proteinler ve gen bölgeleri proteaz degradasyonuna karşı hassas olduğundan *P. pastoris* veya benzeri herhangi bir rekombinant protein üretim

sisteminde ortama salgılanan bu proteinler fermentasyon ortamında stabil olamayabilmekte ve proteazlar tarafından degradasyona uğrayabilmektedirler. Bu nedenle de heterolog protein üretiminde proteoliz problemi ile karşı karşıya kalınmaktadır. Bu aşamada temel vakuol proteazları önemli bir degradasyon faktörü olarak öne çıkmaktadır. Proteoliz; protein ekspresyonu sırasında veya saflaştırmanın ilk aşamalarında meydana gelebilmektedir (Gleeson ve ark., 1998). Rekombinant protein üretiminin önemli problemlerinden biri olan degradasyon sorununu çözmek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar besiyerine aminoasit veya peptid eklemek, ortamın pH değerini degradasyonu önleyecek şekilde ayarlamak ve proteaz içermeyen suş kullanmak şeklinde sayılabilir (Cregg ve ark., 1993). *P. pastoris* mayaları geniş bir pH aralığında gelişim gösterebilme yeteneğine sahip mayalardır. Dolayısıyla ortam pH değerinin degradasyonu önleyecek şekilde ayarlanması genellikle *P. pastoris* hücrelerinin büyümesi üzerinde herhangi bir olumsuz etki yaratmamaktadır. Bir diğer yöntem olan proteaz genleri inhibe edilmiş suş kullanımı son yıllarda tercih edilen ve başarılı sonuçlar veren bir yöntem olarak kabul görmüştür.

SMD1163 (*his4 pep4 prb1*), SMD1165 (*his4 prb1*) veya SMD1168 (*prb1 pep4*) suşları proteaz içermeyen *P. pastoris* suş serisi olup bazı heterolog proteinlerin üretiminde çok rahat olarak kullanılmaktadır. *pep4* geni karboksi peptidaz Y ve proteinaz B gibi diğer vakuol proteazlarının aktivasyonu için gerekli aspartil proteazını enkodlar. Proteinaz B proteinaz A tarafından işlenme ve aktive edilmesinden önce enzim aktivitesinin yarısına sahiptir. *prb1* geni proteinaz B'yi enkodlar böylece *pep4* mutasyonu proteinaz A ve karboksi peptidaz Y aktivitesini azaltır/durdurur ve proteinaz B aktivitesinde kısmi azalma sağlar. *prb1* mutasyonu sadece proteinaz B aktivitesini durdururken *prb1 pep4* çift mutasyonu ise her üç proteinaz aktivitesini durdurur (Cregg ve ark., 1993).

P. pastoris ekspresyon sistemi kullanılarak memeli, hayvan, bitki, bakteri, küf vb. birçok organizmaya ait proteinler başarılı bir şekilde üretilmiştir. *P. pastoris* ekspresyon sistemiyle üretilen bazı proteinler ve miktarları Çizelge 2.3.'de verilmiştir (Spohner ve ark., 2015).

Çizelge 2.3. *P. pastoris* rekombinant ekspresyon sistemi ile üretilen bazı proteinler (Spohner ve ark., 2015)

Protein Adı	Protein Kaynağı	Miktar	Kaynak
Glukoz oksidaz	<i>Aspergillus niger</i>	0.8 g/L	Meng ve ark., 2014
Serum albumin	<i>Homo sapiens</i>	4 g/L	Cregg ve ark., 1993
Tümör nekroz faktör	<i>Homo sapiens</i>	6 g/L	Dale ve ark., 1999
İnsülin öncü maddesi	<i>Homo sapiens</i>	1.5 g/L	Wang ve ark. 2001
Sellobioz dehidrogenaz	<i>Pycnopus cinnabarinus</i>	0.35 g/L	Bey ve ark., 2011
Lakkaz	<i>Trametes versicolor</i>	0.495 g/L	Kittl ve ark., 2012
Katalaz	<i>Homo sapiens</i>	0.55 g/L	Shi ve ark., 2007
Peroksidaz	<i>Armoracia rusticana</i>	0.4 g/L	Spadiut ve ark., 2012
Protein-glutamin	<i>Zea mays</i>	4.4 mg/L	Li ve ark., 2013 (A)
Dekstransükraz	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	14 U/mL	Kang ve ark., 2011
1,4- α -glukan	<i>Aspergillus oryzae</i>	0.23 g/L	Wu ve ark., 2010
Karboksilesteraz	<i>Rhizomucor miehei</i>	0.08 g/L	Delroisse ve ark., 2005
Siklomaltodekstrin	<i>Paenibacillus macerans</i>	4.5 U/mL	Zhang ve ark., 2009
Triasigliserol lipaz	<i>Aspergillus tamarii</i>	20 U/mL	Shi ve ark., 2010
Lizofosfolipaz	<i>Aspergillus niger</i>	0.026 g/L	Zhu, 2008
Pektinesteraz	<i>Aspergillus niger</i>	0.144 g/L	Jiang ve ark., 2013
Tannaz	<i>Aspergillus oryzae</i>	0.074 g/L	Zhong ve ark., 2004
Acylglycerol lipaz	<i>Rhizopus oryzae</i>	7.97 g/L	Minning ve ark., 1998
Fosfolipaz A1	<i>Vespula vulgaris</i>	1.7 mg/L	Borodina ve ark., 2011
Fitaz (3-, 4-)	<i>Aspergillus niger</i>	6.1 g/L	Xiong ve ark., 2005
Ribonükleaz	<i>Bos taurus</i>	5 mg/L	Chatani ve ark., 2000
Fosfodiesteraz	<i>Triticum aestivum</i>	0.059 g/L	Joye ve ark., 2010
Amilaz	<i>Hordeum vulgare</i>	0.125 mg/L	Liu ve ark., 2012
Glukan 1,4- α -glukozidaz	<i>Aspergillus awamori</i>	0.8 g/L	Fierobe ve ark., 1997
Endo-1,3(4)- β -glukanaz	<i>Penicillium sp.</i>	2.61 g/L	Chen ve ark., 2012
İnülinaz	<i>Aspergillus niger</i>	2.21 g/L	He ve ark., 2014
Selülaz	<i>Trichoderma reesei</i>	6.55 g/L	Mellitzer ve ark., 2012

Çizelge 2.3. (devam)

Dekstranaz	<i>Lipomyces starkey</i>	0.46 g/L	Chen ve ark., 2008
Kitinaz	<i>Homo sapiens</i>	0.3 g/L	Goodrick ve ark., 2001
Poligalakturonaz	<i>Aspergillus niger</i>	0.098 g/	Liu ve ark., 2014
Lizozim	<i>Gallus domesticus</i>	0.0123 g/L	Xu ve ark., 2014
α -glukozidaz	<i>Apis cerana indica</i>	4.2 mg/L	Kaewmuangmoon ve ark., 2013
β -glukozidaz	<i>Trichoderma reesei</i>	0.55 g/L	Chen ve ark., 2011
α -galaktozidaz	<i>Coffea</i>	0.4 g/L	Zhu ve ark., 1995
B-galaktozidaz (laktaz)	<i>Paecilomyces aeruginus</i>	22 g/L	Katrolia ve ark., 2011
İnvertaz	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.5 g/L	Tschopp ve ark., 1987
α -L-ramnosidaz	<i>Aspergillus tereus</i>	0.3 g/L	Gerstorferová ve ark., 2012
Pullulanaz	<i>Bacillus naganoensis</i>	350 U/mL	Xu ve ark., 2006 (A)
Tripsin	<i>Streptomyces griseus</i>	14.4 U/mL	Ling ve ark., 2012
Subtilisin	<i>Pichia pastoris</i>	3 mg/L	Salamin ve ark., 2010
Orizin	<i>Aspergillus oryzae</i>	0.513 g/L	Guo ve Ma., 2008
Aqualizin 1	<i>Thermus aquaticus</i>	0.11 g/L	Oledzka ve ark., 2003
Papain	<i>Carica papaya</i>	5 mg/L	Dufour ve ark., 1998
Bromelain	<i>Ananas comosus</i>	12.5 mg/L	Mueller ve ark., 2009
Pepsin	<i>Porcus</i>	14.7 g/L	Yoshimasu ve ark., 2002
İzoamilaz	<i>Bacillus lentus</i>	10.4 g/L	Li ve ark., 2013 (B)
Arabinan endo-1,5- α - L-arabinaz	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	8 mg/L	Huy ve ark., 2013
Pektat liyaz	<i>Bacillus subtilis</i>	0.041 g/L	Zhang ve ark., 2013
Asparaginaz	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	85.6 U/mL	Ferrara ve ark., 2006
Aljinat liyaz	<i>Rhizopus oryzae</i>	0.2 g/L	Mertens ve Browman, 2011
Pektin liyaz	<i>Penicillium purpurogenum</i>	0.245 g/L	Pérez-Fuentes ve ark., 2014
B-L-N asetil hekzoaminidaz	<i>Talaromyces flavus</i>	0.022 g/L	Slámová ve ark., 2012

2.4. Ekspanzin Proteinleri

Ekspanzinler ilk defa 1992 yılında hızlı şekilde büyüyen salatalık koleoptillerinden izole edilmiş proteinlerdir (McQueen-Mason ve ark., 1992). Bitkilerde bulunan ekspanzin proteinleri α -Ekspanzin, β -Ekspanzin, Ekspanzin Benzeri A, Ekspanzin Benzeri B olarak dört ana gruba ayrılırlar. Ekspanzinler selüloz mikrofibrilleri ve pektin matriks üzerine etki ederek hücre duvarının modifikasyonunu ve parçalanmasını sağlamaktadır. Bunun yanı sıra ekspanzin proteinlerinin diğer pektolitik ve selülotik enzimler ile sinerjistik etki göstererek bu enzimlerin etkinliğini artırarak hücre duvarı parçalanmasını teşvik ettiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Ekspanzin proteinleri *in vitro* ortamda hücre duvarının parçalanmasını sağlayan yegane protein olarak literatürdeki yerini almıştır. Dolayısıyla ekspanzin proteinleri endüstride kullanılmakta olan pektolitik - selülotik enzimlere ikame olarak kullanım potansiyeline sahiptirler.

Ekspanzinler hücre duvarına lokalize olmuş, küçük boyutlu, ve yaklaşık molekül ağırlığı 25 – 30 kDa arasında olan proteinlerdir (McQueen-Mason ve ark., 1992; Cosgrove, 2000). Literatürde bulunan bilgilere göre ekspanzin proteinleri selüloz mikrofibrilleri arasındaki hidrojen bağlarını parçalayarak veya karbonhidrat polimerlerini hücre duvarında lokalize olan enzimlerin daha kolay ulaşabileceği hale getirerek hücre duvarı modifikasyonlarında rol oynadığı hipotez olarak öne sürülmektedir (Cosgrove, 1998). Rose ve ark., (1997) yaptıkları çalışmada domateslerde meyve ve olgunlaşmaya özgü LeExp1 geninin eksprese olduğunu göstermiştir. Bu genin meyvenin yumuşamaya başladığı ve dolayısıyla hücre duvarı parçalanma ve modifikasyon aşamalarında maksimum seviyeye çıktığı durumlarda spesifik olarak ifade edilmesi ekspanzin proteinleri ile hücre duvarı bileşenlerinin parçalanması arasında pozitif anlamda bir korelasyon olduğuna işaret etmektedir. Bu verileri destekleyecek şekilde ekspanzin proteinlerinin transjenik yöntemlerle yüksek miktarda eksprese edildiği meyvelerin kontrol örneklerine göre daha yumuşak olduğu ve hatta yumuşama reaksiyonlarının olgunlaşma periyodundan önce harekete geçtiği tespit edilmiştir (Brummell ve ark., 1999). Ekspanzin transkriptlerinin benzer şekilde klimakterik olmayan üzüm, çilek gibi meyvelerde bulunduğu belirlenmiş ve

bu tür meyvelerde de yumuşama ve dolayısıyla karbonhidratların parçalanma reaksiyonlarına katıldıkları fikrine işaret etmiştir (Harrison ve ark., 2001; Gao ve ark., 2003). Dolayısıyla ekspanzin proteinlerinin hücre duvarını parçalama yetenekleri göz önüne alındığında son yıllarda bu proteinler üzerinde yapılan çalışmalar yoğun olarak devam etmiştir. Her ne kadar ekspanzin proteinleri ilk olarak bitkisel dokularda tespit ve izole edilmiş olsalar dahi ileriki yıllarda yapılan çalışmalar bu biyolojik ajanların aynı zamanda mikrobiyal kaynaklarda da bulunabildiğini göstermiştir. Dolayısıyla mikrobiyal kaynaklı ekspanzinlerin klonlanması ve ekspresyonu da araştırmacıların ilgi duyduğu konular arasında yer almıştır. LOOS (Quiroz-Castaneda ve ark., 2011), swollenin (Wang ve ark., 2011), AfSwo1 (Chen ve ark., 2010) ve maize β -ekspanzin gibi çok sayıda ekspanzin ya da ekspanzin benzeri proteinlerin bitkisel biyokütlenin sakkarifikasyonunda glikozid hidrolazların aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir. Quiroz-Castaneda ve ark., (2011) Meksika'nın çeşitli bölgelerine özgü olarak yetişen *Agave tequilana* lifinin ticari selüloz ve ksilanaz karışımlarına LOOS1 proteini varlığında önemli düzeyde hassasiyet gösterdiği ve parçalandığını rapor etmişlerdir. Chen ve ark., (2010) yaptıkları bir araştırmada *Aspergillus fumigatus*'dan izole edilen AfSwo1 ekspanzini ve selülozların beraber uygulandıkları bir çalışmada mikrokristalin yapısındaki avicel selülozunu parçalama yeteneklerinin çok yüksek olduğu ve tek başına selülozların kullanıldığı kontrol örneklerine oranla %13.2 miktarında daha yüksek serbest şeker elde edildiğini ortaya koymuşlardır.

Lignoselülozik atıklardan şekerlerin ayrıştırılması amacıyla EXLX1 proteini yüksek miktarda üretilmesi ve etkin bir şekilde saflaştırılabilmesi nedeniyle uygulama alanları için önemli ölçüde potansiyel taşıyan bir ekspanzin proteini olarak ele alınmaktadır. EXLX1, *Bacillus subtilis yoaJ* geni tarafından kodlanan ve *Escherichia coli* tarafından eksprese edilebilen bir ekspanzin proteini olarak tanımlanmaktadır (Kim ve ark., 2009; Suwannarangsee ve ark., 2012; Kerff ve ark., 2008). EXLX1 yapılan çalışmalar sonucunda bağlanma karakteristik özellikleri, hücre duvarı modifikasyonunda gösterdiği etkinlik ve yapı-fonksiyon çalışmaları sonucunda elde edilen pozitif veriler neticesinde bir çok araştırmaya konu olmuş durumdadır (Kim ve ark., 2009; Kim ve ark., 2013). Özellikle Lin ve ark., (2013)

yapmış oldukları çalışma biofuel üretiminde kullanılan bitki biyokütle atıklarında ticari selülozlarla EXLX1'in sinerjistik etki gösterdiği ortaya konulmuştur.

Ekspanzin proteinleri doğada az miktarda bulunmakta ve düşük miktarlardaki izolasyonu dahi zahmetli biyokimyasal metotlar gerektirmektedir. Literatürdeki çalışmalar gözönüne alındığında mikroorganizma kaynaklı ve bitkisel kaynaklı ekspanzin proteinlerinin hücre duvarı bileşenlerini parçalama yetenekleri veya selüloolitik, hemi-selüloolitik, pektolitik enzimlerle sinerjistik etki gösterme yeteneklerinin çeşitli çalışmalarda konu alındığı görülmektedir. Ancak günümüze kadar bitkisel kaynaklı ekspanzin proteinlerinin *P. pastoris* mayalarında üretimini ve bu proteinlerin fonksiyonel özelliklerini konu alan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada ilk defa *Saccharomyces cerevisiae* α -mating faktör ve *P. pastoris* asit fosfataz (*PHO1*) sinyal sekans dizilimlerine sahip pPIC9K ve pHIL-S1 vektörleri kullanılarak *Pichia pastoris* SMD1168 ve GS115 suşlarında *Solanum lycopersicum* (domates) kaynaklı ekspanzinlerin rekombinant üretimi, üretilen enzim miktarının arttırılması ve saflaştırılması hedeflenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada ekspanzin gen kaynağı olarak domates bitkisi kullanılmıştır. Domates (*Solanum lycopersicum*) bitki materyalleri steril koşullar altında doku kültürü ortamında geliştirilerek DNA ve RNA kaynağı olarak kullanılmışlardır. Araştırmada kullanılan kimyasal materyaller, özgün primerler Sigma Aldrich Co. (Taufkirchen, Almanya) ve Merck (Darmstadt, Germany) 'den temin edilmişlerdir ve analitik saflık düzeyindedirler. *P. pastoris* maya suşları (SMD1168 ve GS115), ekspresyon vektörleri (pPIC9K ve pHIL-S1), vegazim enzimi, besiyerleri Invitrogen (San Diego, CA) firmasından temin edilmişlerdir. Taq DNA polimeraz, DNA ligaz, DNA Restriksiyon Endonükleaz enzimleri New England Biolabs (İngiltere) firmasından temin edilmiştir. RT-PZR analizi için kullanılan Superscript One step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase kiti Invitrogen (San Diego, Kaliforniya) firmasından sağlanmıştır.

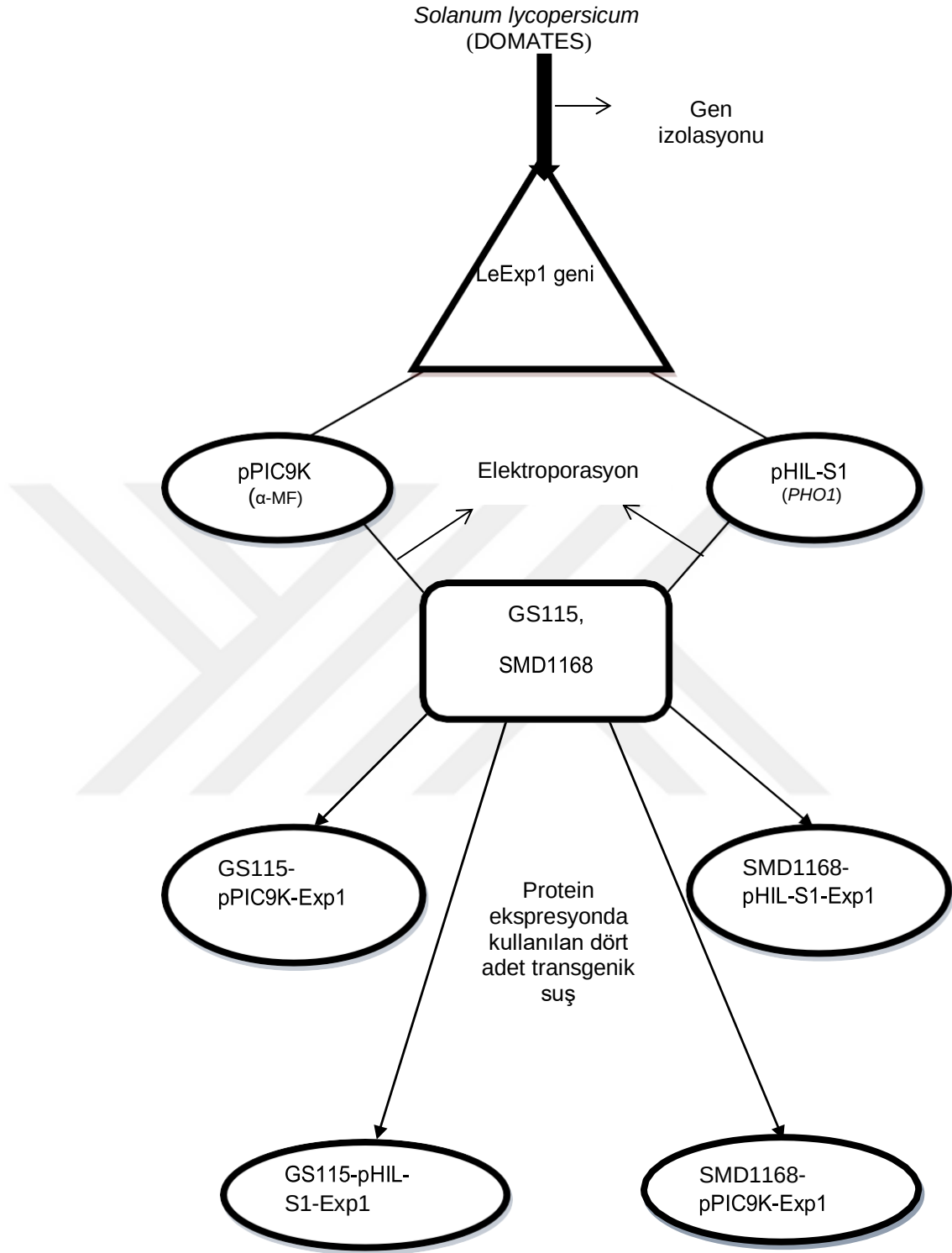
3.2. Domates Bitkisinden Hedef Gen Bölgesi (LeExp1) İzolasyonu

Domates bitkisinden DNA izolasyonu yapılırken Muhammed ve ark. (1994) tarafından yayınlanan metot uygulanmıştır. Bu metoda göre bitki dokuları sıvı azot içerisinde dondurulduktan sonra havan içerisinde parçalanarak her 0.5 g doku için 5 mL ekstraksiyon çözeltisi eklenmiştir. DNA ekstraksiyon çözeltisinin bileşimi şu şekildedir: 20 mM Na₂EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 M NaCl, %2.0 (w/v) CTAB. Çözeltiye DNA ekstraksiyonundan hemen önce % 0.2 β-merkaptoetanol eklenmiştir. Çözelti ve bitki materyali karıştırılarak santrifüj tüplerine aktarılmış ve 60°C sıcaklıkta 25 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığına gelinceye kadar laboratuvar ortamında bekletilmiştir. Daha sonra 6 mL kloroform:oktanol karışımı eklenerek emülsiyon oluşuncaya kadar tüpler çalkalanmış ve oda sıcaklığında 6.000 devirde 15 dakika santrifüj edilmiştir. Nükleik asitleri içeren sulu faz temiz bir santrifüj tüpüne aktarılarak ikinci defa kloroform:oktanol ekstraksiyonuna tabi

tutulduktan sonra hacminin yarısı kadar NaCl (5 M) ve hacminin iki katı -20°C'deki etil alkol (%95) ile karıştırılarak 4°C'de bir saat bekletilmiştir. Tüpler öncelikle 3.000 devirde 3 dakika ve daha sonra 5.000 devirde 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan düşük yoğunluklu sıvı pipet vasıtasıyla tüplerden alınarak DNA çöktürücü etil alkol (%76) ile yıkanmıştır. Tüpler ağızları açık vaziyette 37 °C'de etil alkol tamamen uçuncaya kadar bekletilmiştir ve DNA, TE (Tris-EDTA) tampon çözeltisi içerisinde çözündürülmüştür. DNA ile beraber çöken RNA moleküllerini parçalamak amacıyla her 100 µL DNA çözeltisi içerisine 1 µL RNaz A (10mg/mL) enzimi eklenerek 37 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. DNA kalitesi ve miktarı spektrofotometrik yöntemlerle tayin edilmiştir ve yüksek kaliteli DNA bir ileri aşamalarda kullanılmıştır.

3.3. Çalışmada Kullanılan Suşlar, Sinyal Sekansları ve Vektörlerin Dizaynı

Bu çalışma kapsamında rekombinant ekspanzin proteinlerinin üretimi amacıyla iki adet *P. pastoris* suşu ve iki farklı sekresyon sinyal sekansı içeren vektör kullanılmıştır. Konakçı suş olarak *P. pastoris* SMD1168 ve GS115 suşları seçilmiştir. Hedef geni mayalara taşımak ve sekresyonlarını sağlamak amacıyla sırasıyla α -MF ve *PHO1* sinyal sekans bölgelerine sahip pPIC9K ve pHIL-S1 vektörleri seçilmiştir. GS115 ve SMD1168 suşları hedef LeExp1 genini taşıyan her iki vektör ile dönüştürülmüş ve sonuçta dört farklı dönüştürülmüş maya hattı elde edilmiştir. Çalışmanın deneme dizaynı Şekil 3.1.'de gösterildiği haliyle tasarlanmıştır.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan hedef geni, vektörleri ve suşları gösteren deneme dizaynı

Yapılan dizayna göre hedef LeExp1 geni ve pPIC9K ile pHIL-S1 vektörleri uygun restriksiyon enzimleriyle kesilmiştir ve DNA ligaz enzim(ler)i vasıtasıyla plazmidlere klonlanmıştır. Hedef genin vektörlere klonlanması sonucu elde edilen yeni plazmidler pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Ekp1 şeklinde adlandırılmıştır ve plazmidler *Escherichia coli* hücrelerine aktarılmıştır. Vektör aktarımının doğru bir şekilde yapıldığı tespit edilmiştir ve plazmidler elektroporasyon yöntemiyle *P. pastoris*'in GS115 ve SMD1168 olmak üzere iki farklı suşuna aktarılmıştır. Bu aktarım sonucunda protein üretiminde kullanılmak üzere dört adet transgenik suş elde edilmiştir. Hedef geni taşıyan vektörler ile dönüştürülen suşlar SMD1168-pPIC9K-Exp1, SMD-pHIL-S1-Exp1, GS115-pPIC9K-Exp1 ve GS115-pHIL-S1-Exp1 şeklinde adlandırılmıştır.

3.4. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler DEPC (dietilenpirokarbonat) ile muamele edilmiş saf su ile hazırlanmıştır. Meyve dokularından RNA izolasyonu diğer dokulara oranla daha zordur ve çoğu zaman piyasada bulunan ticari kitler yüksek kaliteli RNA izolasyonuna imkan vermemektedir. Bu nedenle RNA izolasyonu için daha önce kullanılıp olumlu sonuçlar alınmış Lopez-Gomez ve Gomez-Lim (1992) tarafından yayınlanan metot modifiye edilerek uygulanmıştır. Bu metoda göre sıvı azot içerisinde dondurulmuş bitki dokuları havan içerisinde toz haline getirilmiş ve daha sonra içerisinde RNA izolasyon çözeltisi bulunan erlene aktararak 5 dakika süresince 65°C'de inkübe edilmiştir. RNA ekstraksiyon çözeltisi (pH 7.5) bileşimi şu şekildedir: 150 mM Tris, 50 mM EDTA, %2 SDS (w/v). Ekstraksiyondan hemen önce çözeltiliye %1 (v/v) oranında β -merkaptoetanol eklenmiştir. Erlene çözeltinin ¼ hacminde etil alkol (%100) eklenerek bir dakika karıştırılmış ve daha sonra 0.11 hacminde potasyum asetat ilave edilerek bir dakika daha karıştırılmıştır. Karışım santrifüj tüplerine aktararak eşit hacimdeki kloroform:izoamilalkol (49:1) ile ekstrakte edilmiş ve 13.000 devirde 15 dakika santrifüj edilmiştir. Sulu faz yeni bir tüpe aktararak ekstraksiyon işlemi bir defa fenol bir defa da kloroform:izoamilalkol ile tekrar edilmiştir. En son aşamada sulu faz yeni bir santrifüj tüpüne aktararak her bir mL'si için 0.6 mL LiCl eklenerek -

20 °C’de gece boyunca inkübe edilmiştir. Tüpler 4 °C’de, 13.000 devirde 90 dakika süresince santrifüj edilerek RNA'nın çöktürülmesi sağlanmıştır. RNA çökeltisi %70 etanol ile yıkanmış ve RNaz içermeyen su içerisinde çözündürülmüştür. Her bir mL su için 0.063 mL potasyum asetat (5M) ve 2.5 mL soğuk etil alkol (%100) eklenerek karıştırılan tüpler gece boyunca -20°C’de bekletilip ertesi sabah 15 dakika süresince 13.000 devirde 4°C’de santrifüj edilmiştir. RNA çökeltisi %75 etil alkol ile yıkanarak RNaz içermeyen su içerisinde çözündürüldükten sonra suyun hacminin yarısı kadar soğuk etil alkol (%100) ile karıştırılarak buz üzerinde 30 dakika bekletilmiştir. Tüpler 4°C’de 10 dakika süresince santrifüj edilerek, RNA içeren üstteki sulu faz yeni bir tüpe aktararak hacminin 1/10’u kadar sodyum asetat (3 M, pH 5.2) ve 2.5 katı kadar soğuk etil alkol (%100) ile karıştırılıp -80 °C’de 2 saat süresince inkübe edilmiştir. Tüpler 4°C’de 13.000 devirde 25 dakika süresince santrifüj edilerek RNA çöktürülmüştür. Tüplerin ağzı açık bırakılarak etil alkolün tamamı uçuncaya kadar oda sıcaklığında bırakılmış ve RNA DEPC ile muamele edilmiş RNaz içermeyen su içerisinde çözündürülmüştür. RNA ile beraber çöken genomik DNA molekülleri DNAaz I enzimi vasıtasıyla parçalanacak ve RNA örnekleri fenol-kloroform ile ekstrakte edildikten sonra etanol ile çöktürülerek saflaştırılmıştır.

3.5. Ekspanzin Geninin Yarı Kantitatif Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) Vasıtasıyla Çoğaltılması

Yarı kantitatif RT-PZR reaksiyonu için SuperScript™ III One-Step RT-PCR system with Platinum® Taq DNA Polymerase kiti üretici firmanın talimatlarına uygun olarak kullanılmıştır (Invitrogen, Life technologies). Buna göre; hazırlanan RT-PZR reaksiyonları cDNA sentezi için 55°C’de 30 dakika boyunca bekletilmiş ve PZR amplifikasyonundan önce 94°C’de 2 dakika bekletilerek ters transkriptaz enzimi denatüre edilmiştir. PZR profili olarak 94°C’de 3 dakika, 34 döngü boyunca 94°C’de 15 sn, 56°C’de 30 sn, 68°C’de 1 dakika ve devamında tek bir döngü olarak 68°C’de 5 dakika olarak belirlenmiştir. PZR ürünleri %1.2 agaroz jel üzerinde ayrıştırılmıştır ve fotoğraflanmıştır. Genler klonlama işleminde kullanılmak üzere

Illustra™ GFX™ PCR Gel Band Purification Kit kullanılarak saflaştırılmıştır. Spesifik primer kullanımı, jel agarozu ayrıştırması sonucunda beklenen büyüklükte DNA parçacıklarının çoğaltılmış olması ve DNA dizi analizi sonucunda elde edilen sekans bilgilerine göre çoğaltılması planlanan gen bölgesi kesin olarak elde edilmiştir.

3.6. LeExp1 Geninin pPIC9K ve pHIL-S1 Vektörlerine Klonlanması

PZR reaksiyonu esnasında dizayn edilen primerler vasıtasıyla LeExp1 geninin cDNA'larının her iki uç bölgesine uygun DNA restriksiyon enzim tanıma bölgeleri eklenmiştir. Hem klonlanacak olan DNA parçacıkları hem de üzerine klonlama yapılacak olan pPIC9K (*EcoRI* - *NotI*) ve pHIL-S1 (*EcoRI*, *SmaI*) vektörleri uygun restriksiyon enzimleriyle kesilmiştir. DNA ligaz enzimleriyle hedef DNA parçacıklarının vektörlere yapıştırılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonucunda domateslerden izole edilen LeExp1 genini taşıyan ve rekombinant ekspansin proteinini üretebilir hale getirilmiş pPIC9K ve pHIL-S1 vektörleri elde edilmiştir. Elde edilen yeni vektörler 'pPIC9K-Exp1' ve 'pHIL-S1-Exp1' şeklinde adlandırılmıştır.

3.7. pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 Vektörlerinin Çoğaltılması

P. pastoris mayalarına aktarmak amacıyla hedef genleri taşıyan pPIC9K ve pHIL-S1 plazmidlerinin JM109 *Escherichia coli* hücrelerine transforme edilerek vektörlerin çoğaltılması işlemi yapılmıştır. Üretici firmanın maneline bağlı kalınarak Standart '*E. coli* JM109 Competent Cells Transformation' yöntemi vasıtasıyla *E. coli* hücreleri vektörlerle transforme edilmiştir. Çoğaltma işlemi her iki vektör için (pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1) paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Bu metoda göre; ilk olarak steril polipropilen tüpler buz üzerinde 5 dakika bekletilerek soğutulmuşlardır. Kompetent *E. coli* JM109 hücreleri -80°C'den çıkarılıp buz üzerinde çözündürülerek kullanıma hazır hale getirilmişlerdir. Kompetent hücreler çözündükten sonra 100'er µL alınarak steril soğutulmuş polipropilen tüplere aktarılıp üzerlerine hedef geni taşıyan 1 µL pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 vektörü

eklenmiştir. Polipropilen tüpler hafifçe karıştırılarak buz üzerinde 10 dakika inkübe edildikten hemen sonra 42⁰C'lik su banyosuna alınarak 50 saniye sabit tutularak inkübe edilmişlerdir. Hemen ardından vakit kaybetmeden buz üzerine alınarak iki dakika süresince inkübe edilmişlerdir. Bu esnada meydana gelen ani ısı değişikliği ile açılıp – kapanan bakteri hücre membranı porlarından vektörler hücre içerisine geçiş yapmaları sağlanmıştır. Bakteri hücrelerinin üzerine 900 µL SOC sıvı besiyeri eklenerek çalkalamalı inkübatörde 37⁰C'de 225 rpm'de 60 dakika süreyle bekletilmişlerdir. İnkübasyondan sonra 100 µL transforme edilmiş bakteri hücresi alınarak 100 µg/mL ampisilin içeren LB-Luria Bertani agar katı besi yerine ekim yapılmıştır ve bir gece 37⁰C'de inkübe edilmiştir. LB agar bileşimi şu şekildedir: %1 tryptone, %0.5 yeast extract, %1 NaCl, %1.5 agar, %0.1 ampisilin. İnkübasyon süresinin sonucunda ampisilinli ortamda gelişen hücrelerin vektörleri içerdikleri değerlendirilmiştir. 100 µg/mL ampisilin içeren LB agar'da gelişen *E. coli* hücrelerinin sahip oldukları antibiyotik dirençliliklerine bağlı olarak pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 vektörlerini içerdikleri düşünülmüştür. Ancak sadece antibiyotikli ortamda gelişmiş olmaları yani vektörün sağladığı antibiyotik dirençliliği vektör içeren *E. coli* hücrelerinin seçiminde yeterli görülmemiştir ve bu nedenle PZR yöntemi kullanılarak hücrelerin ikinci bir doğrulama metoduyla pPIC9K ve pHIL-S1 vektörlerini ve vektöre bağlı olarak plazmid yapı içerisinde hücre içine aktarılan LeExp1 genini içerip içermedikleri ikinci bir adımda analiz edilmiştir. Bu amaçla öncelikle vektörü içerdiği düşünülen antibiyotik dirençli JM109 bakteri hücre kolonilerinden bir tanesi seçilerek antibiyotik içeren (100 µg/mL) 5 mL sıvı LB (%1 tryptone, %0.5 yeast extract, %1 NaCl, %0.1 ampisilin) besiyerine aktarılmış ve bir gece boyunca 37⁰C'de bekletilerek hem bakteri gelişimi hem de bakterilerin içerisinde vektörlerin çoğaltılması işlemi yapılmıştır. Bakteri hücre kültüründen 'Plasmid DNA Preparation from *E. coli* by the Alkaline Lysis Procedure' yöntemine göre plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Plazmid DNA izolasyonu işlemi sonucunda elde edilen plazmid DNA PZR yönteminde DNA kaynağı olarak kullanılmıştır. PZR yöntemiyle transformasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiği ve *E.coli* hücrelerinin pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 plazmidlerini içerip içermediği test edilmiştir. Bu amaçla dizayn edilen PZR analizinde iki farklı

primer çifti kullanılarak kesin olarak vektörlerin hedef geni içerip içermedikleri anlaşılmasına çalışılmıştır. *E. coli* hücrelerinin ilgili vektörleri taşıyanları plazmidin kendilerine sağladığı antibiyotik dirençliliğine bağlı olarak ön seçilime uğratılmışlardır. Hem katı hem de sıvı antibiyotikli (100 µg/mL ampicilin) besi yerinde gelişme özelliği gösteren *E. coli* hücrelerinin başarılı bir şekilde pPIC9K-Exp ve pHIL-S1-Exp vektörleriyle dönüşüme uğratıldıkları kabul edilmiştir. İkinci seviyede ise bu *E. coli* hücrelerinden plazmid DNA'lar izole edilerek PZR reaksiyonunda DNA kaynağı olarak kullanılmıştır. PZR reaksiyonunda iki farklı bölgede transgeni hedefleyecek şekilde dizayn edilen özgün primer çiftleri (Çizelge 3.1.) kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. *Solanum lycopersicum* genomundan LeExp1 açık okuma bölgesinin çoğaltılması için kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Dizisi
LeExp1F1	GTTGAAGGAAGAATCCCTGG
LeExp1R1	TATCCTAGTTTTCCCACAAA
LeExp1F2	AGAGCAACACTTACCTCAAT
LeExp1R2	CTTATAAAGCTCTTTGATTT

3.8. pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 Vektörlerinin *Pichia pastoris* Hücrelerine Elektroporasyonu

pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 plazmidlerinin *P. pastoris* mayalarına elektroporasyonundan önce kompetent maya hücreleri hazırlanmıştır. Bu amaçla *P. pastoris* suşları (GS115 ve SMD1168) YPD (Yeast Peptone Dextrose) katı besiyerine çizim yöntemiyle ekilerek 1 gece 30 °C'de inkübe edilerek taze kolonilerin oluşumu sağlanmıştır. Oluşan mayalardan tek koloni seçilerek 50 mL'lik falkon tüp içerisindeki 5 mL YPD sıvı besiyerine aşılanmış ve bir gece 30°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda elde edilen kültürden 0.4 mL alınarak yeni hazırlanmış 500 mL YPD sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. Besiyeri ve kültür

karışımı 1 gece 30°C'de OD600 değeri 1.3-1.5'e ulaşana kadar geliştirilmiştir. Yeterli OD600 değerine ulaşıldığında karışım 1500g'de 4°C'de soğutmalı santrifüj kullanılarak 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonucunda süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet 250 mL steril soğuk su ile çözülmüştür. Tekrar 1500g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılarak pellet 2 mL 1 M soğuk sorbitol ile çözülmüştür ve yeniden 1500g'de 4°C'de 5 dakika süresince santrifüj edilmiştir. Süpernatant tekrar uzaklaştırılmış ve pellet 100 µL 1M soğuk sorbitol ile hacmi yaklaşık 1500 µL olacak şekilde çözülmüştür. Elde edilen maya kültürü eppendorf mikrosantrifüj tüplerinde 80 µL olacak şekilde bölüştürülerek -20°C'de saklamaya alınmıştır. Elde edilen kompetent maya hücreleri rekombinant proteinlerin üretiminde konak olarak kullanılmak amacıyla bekletilmişlerdir.

pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 plazmidleri hazırlanan kompetent maya hücrelerine aktarılmadan önce doğrusal hale getirilmiştir. LeExp1 genini taşıyan pPIC9K ve pHIL-S1 vektörleri SacI enzimi ile 37°C'de gece boyunca inkübe edilerek kesilmiş ve doğrusal hale getirilerek elektroporasyon yöntemiyle mayalara aktarılmışlardır. Elektroporasyon işlemi kısaca şu şekilde yapılmıştır: Doğrusal hale getirilen vektörlerden 10 µL alınarak 80 µL kompetent maya hücre kültürü üzerine aktarılmıştır. Karışım daha önceden soğutulmuş 0.2 cm'lik steril elektroporasyon küvetine transfer edilmiş ve buz üzerinde 5 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Bu esnada elektroporasyon cihazı üretici firmanın tavsiyelerine uygun olarak *S. cerevisiae*'ye göre ayarlanmıştır. Buz üzerindeki inkübasyon sonunda küvet cihaza yerleştirilmiş ve elektroporasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektroporasyon işlemi tamamlanınca elektropore olmuş hücreler üzerine soğutulmuş 1 mL 1 M sorbitol ilave edilmiş ve hücreler steril mikrosantrifüj eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Hücre kültürlerinden 200–250 µL alınarak yayma yöntemiyle MD (Minimal Dextrose) katı besiyerine ekim yapılmıştır ve koloni oluşumu gözlenene kadar 30°C'de inkübe edilmiştir. 3-5 gün süren 30°C'deki inkübasyon sonucunda rekombinant *P. pastoris* mayaları gelişmeye başlamışlardır. Elektroporasyon sonrası başarılı bir şekilde maya

genomuna rekombinasyon olayının gerçekleşip gerçekleşmediği ilk seviyede mayaların histidin bulunmayan (-) ortamda gelişebilme yeteneklerine bağlı olarak tayin edilmiştir. Normal koşullarda *P. pastoris* mayaları gelişebilmek için bulundukları besiyeri ortamında histidin amino asidi bulunmasına ihtiyaç duyarlar ya da histidin bulunmadığı durumlarda metabolik olarak bu amino asidi üretebilme yeteneğinde olmaları gerekir ancak bilindiği kadarıyla doğal *P. pastoris* mayaları histidin üretme yönünden negatiftirler. Yapılan dizayna göre *P. pastoris* mayalarının genomuna rekombine olma yeteneğinde bulunan pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 vektörleri yapılarında hedef genin yanı sıra histidin üretimini katalizleyen *HIS4* genini ve antibiyotik dirençlilik genlerini bulundurmaktadırlar. Dolayısıyla ancak genomuna pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 vektörünün yerleştiği *Pichia* mayalarının histidin bulunmayan selektif besiyerinde koloni oluşturma yeteneğine sahip olabilecekleri önkabülünden yola çıkılarak ilk adımda vektör içeren mayaların seçimi bu prensibe göre yapılmıştır. İçerdiği vektör sayesinde histidin bulunmayan selektif besiyerinde gelişme yeteneğini gösteren maya hücreleri ise His⁺ olarak adlandırılmışlardır.

3.9. Mut⁺ (Methanol utilization-plus) Fenotipinin Belirlenmesi

pPIC9K ve pHIL-S1 vektörleri ile *SacI* enzimi kullanıldığı takdirde oluşacak transgenik maya fenotipinin Mut⁺ (Methanol utilization-plus) olması beklenmektedir. Mut⁺ fenotipine sahip maya hücreleri hem MD hem de MM (Minimal methanol) besiyerinde gelişme özelliği göstermektedir. Rekombinant mayaların fenotiplerinin belirlenmesi amacıyla hücreler elektroporasyon sonrasında ekim yapılmış olan MD besiyerinden steril kürdan yardımıyla alınarak MD ve MM besiyerine -aynı kürdan ile- çizim yöntemiyle inoküle edilmişlerdir. 30°C’de 3-5 gün inkübasyon sonucunda maya hücreleri her iki besiyerinde de gelişim göstererek Mut⁺ fenotipine sahip oldukları belirlenmiştir. Yapılan işlemin doğruluğunu kontrol etmek amacıyla Invitrogen *P. pastoris* kit ile birlikte temin edilen *P. pastoris* GS115 β-Galactosidaz suşu kullanılmıştır. *P. pastoris* GS115 β-Galactosidaz suşu Mut⁺ karakteristik fenotipine sahiptir. *P. pastoris* GS115 β-Galactosidaz suşu da

rekombinant mayalara paralel olarak MM ve MD besiyerlerine çizim yöntemiyle ekilerek inkübe edilmiştir.

3.10. Rekombinant Mayaların PZR Reaksiyonu ve Antibiyotikli Besiyerinde Seçilimi

Elektroporasyon işlemi sonrasında elde edilen ve His⁺ olarak adlandırılan GS115 ve SMD1168 maya kolonilerden DNA izolasyonu yapılmış ve bu DNA'ya bağlı olarak hedef genlerin maya genomundaki varlıkları PZR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. DNA izolasyonunda mayalardan DNA ekstraksiyonu yapılmasına olanak sağlayan genel DNA saflaştırma yöntemi uygulanmıştır. Buna göre öncelikle 6-10 adet His⁺ rekombinant maya kolonileri seçilerek MD sıvı besiyerine aşılanmış OD600 değeri 5-10 aralığına ulaşana kadar 30°C'de inkübe edilmiştir. Santrifüjle çöktürülen maya peleti sırasıyla su ve SCED tampon çözeltisinde çözündürüldükten sonra Zimolaz enzimi vasıtasıyla hücre duvarları parçalanarak DNA molekülleri çıkışı kolaylaştırılmıştır. Daha sonra SDS ve Potasyum Asetat çözeltileri ile muamele edilerek hücre ve organel membranları parçalanarak DNA molekülleri çözelti içerisinde dağıtılarak fenol-kloroform-izoamil alkol karışımı ile ekstrakte edilip amonyum asetat vasıtasıyla çökeltilip ardından etanol ile yıkanmıştır. Elde edilen DNA ekstraktı PZR analizlerinde DNA kaynağı olarak kullanılmış ve içerisinde hedef genlerin varolup olmadıkları araştırılmıştır. PZR yöntemi sonucunda elde edilen veriler agaroz jel üzerinde değerlendirilmiştir. PZR analizinde DNA kaynağı olarak rekombinant maya hücrelerinden izole edilen DNA, elektroporasyon öncesinde mayalara aktarılmak üzere doğrusal hale getirilen vektör (pozitif kontrol), rekombinant maya hücrelerinden izole edilen DNA, elektroporasyon işlemi uygulanmayan ebeveyn hücrelerden izole edilen DNA (negatif kontrol) kullanılmıştır. PZR reaksiyonu dört farklı tüp içerisinde spesifik primerler kullanılarak yürütülmüştür. İlk reaksiyonda *Pichia pastoris* mayalarının transformasyonu amacıyla hazırlanmış ve yapısında klonlanmış LeExp1 genini barındıran vektör (pozitif kontrol) DNA kaynağı olarak kullanılmış ve 918 bp'lik bir DNA bölgesini çoğaltmayı hedefleyen spesifik primer çifti kullanılmıştır. İkinci reaksiyonda elektroporasyon yöntemiyle dönüştürülen mayalardan izole edilen DNA

nükleik asit kaynağı olarak kullanılmış ve 918 bp'lik bir DNA bölgesini çoğaltmayı hedefleyen spesifik primer çifti kullanılmıştır. Üçüncü reaksiyonda ikinci reaksiyonda kullanılan DNA kaynağı aynı şekilde değerlendirilmiş ancak primer olarak LeExp1 geni üzerinde 650 bp'lik bir bölgeyi hedef alan oligo çifti kullanılmıştır. Dördüncü reaksiyonda ise transforme edilmemiş parent mayalardan izole edilen DNA nükleik asit kaynağı olarak kullanılmış (negatif kontrol) ve primer çifti olarak ise LeExp1 geni üzerinde 918 bp'lik bir bölgeyi hedef alan oligo DNA çifti kullanılmıştır. Pozitif kontrol ve negatif kontrol örnekleri kullanılarak dizayn edilen PZR sonucunda elde edilen veriler elektroporasyon uygulanmış mayaların genomlarında hedef geni taşıdıklarını göstermiştir. Üçüncü ve nihai seleksiyon yöntemi olarak rekombinant mayaların artan konsantrasyonlu Genetisin 418 antibiyotiği içeren besiyerlerinde geliştirilmesi yolu kullanılmıştır. Bu amaçla His⁺ rekombinant maya kolonileri sırasıyla 0.5-1-2-4 mg/mL konsantrasyonlarında Genetisin 418 antibiyotiği içeren katı YPD besiyerlerinde ekilerek gelişimleri gözlenmiştir. His⁺ rekombinant maya kolonileri ilk olarak 0.5 mg/mL düzeyinde antibiyotik içeren ortamda geliştirilmiş ve bu ortama adapte olarak gelişim gösteren koloniler seçilerek 1 mg/mL düzeyinde antibiyotik içeren ortamda geliştirilmiştir. 1mg/mL antibiyotik seviyesine adapte olabilen mayalar 2 mg/mL antibiyotik seviyesine ve bu besiyeri şartlarına adapte olanlar ise daha sonra 4 mg/mL konsantrasyonunda antibiyotik içeren YPD besiyerine ekilmiştir.

3.11. Transgenik *Pichia pastoris* Suşlarının Ekspresyonu

Başarılı transformasyon işlemi gerçekleştirilmiş mayalardan tek bir koloni alınarak 250 mL'lik erlen içerisindeki 25 mL BMG (Buffered Minimal Glycerol) besiyerine aktarılmış ve OD600 değeri 2-6'ya ulaşınca kadar 30°C'de 250 rpm'de inkübe edilmiştir. Hücreler santrifüj vasıtasıyla toplanıp süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra rekombinant protein ekspresyonunun indüklenmesi için OD600 değeri 1.0 olacak şekilde taze BMM (Buffered Minimal Methanol) besiyerinde süspanse edilmiştir. İndüksiyonun devamı için her 24 saatte konsantrasyonu %0.5 olacak şekilde ortama %100 saf metanol eklenmiştir. Ekspresyonun kontrolü için 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 ve 96. saatlerde maya

kültüründen 1'er mL alınarak eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Oda sıcaklığında 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant ve pellet birbirlerinden ayrıştırılmıştır ve daha sonra süpernatantlar yeni tüplere aktarılmıştır. Süpernatant ve pelletler sıvı azot ile dondurularak analizlerde kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.12. *Pichia pastoris*'te Rekombinant Ekspanzin Enzimi Üretme Yeteneğinin Belirlenmesi ve Saflaştırılması

Ekspanzin proteinin ifadesinin belirlenmesi için % 1 maya özütü, % 2 pepton, % 1,34 YNB, % 4 X 10⁻⁵ biyotin, % 0,5 metanol ve 100 mL/L fosfat tamponu (pH 6,0; 1 M) içeren Buffered Methanol-Complex Medium (BMMY) hazırlanmıştır. Besiyeri bileşenlerinden biyotin ve metanol, aseptik şartlarda şırınga filtre yardımı ile steril edilerek, besiyeri sterilizasyonundan (121 °C, 15 dk) sonra ilave edilmiştir. Transgenik SMD1168-pPIC9K-Exp1, SMD1168-pHIL-S1-Exp1, GS115-pPIC9K-Exp1 ve GS115-pHIL-S1-Exp1 suşları ayrı ayrı 250 mL'lik erlen içerisindeki 50 mL besiyerine aşılanarak 3 gün boyunca 225 rpm ve 32 °C'de geliştirilmiştir. İnkübasyon süresince 24 saat aralıklarla % 0,5 oranında metanol ilave edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, kültür 10.000xg'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve elde edilen süpernatant protein kaynağı olarak kullanılmıştır. Ham özüt ve değişik oranlarda yoğunlaştırılmış ekstraselüler sıvının protein profili SDS-PAGE yöntemi ile belirlenmiştir. Yoğunlaştırma işlemi, 10 kDa cut-off'luk ultrafiltrasyon membranı ile Amicon ultrafiltrasyon hücresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE yönteminin uygulaması sırasında proteinlerin ayrılması % 10'luk poliakrilamid jeller içerisinde 30 mA sabit akım ile gerçekleştirilmiştir. Jelde yürütme sonrasında hızlı gümüş boyama ile görüntüleme işlemleri yapılmıştır.

3.13. Toplam Protein Konsantrasyonu

Toplam protein konsantrasyonunun ölçümü spektrofotometrik yöntemle Bradford assay (Bradford, 1976) prensibine göre yapılmıştır. Oluşturulan vektör dizaynına göre üretilcek rekombinant proteinlerin besiyeri ortamına salgılanması

sağlanmıştır. Dolayısıyla toplam protein konsantrasyonu hesaplanırken ekspresyonun 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 ve 96. saatlerinde alınan ve santrifüjle ayrılan süpernatantlar kullanılmıştır. Bu amaçla örnek sayısı adedince hazırlanan mikrosantrifüj tüplerine 80 µL Bradford boya çözeltisi aktarılmıştır. Boyaların üzerine dondurucudan çıkarılarak buz üzerinde çözündürülen supernatantlardan 20 µL eklenmiştir. Elde edilen karışım vibratörde birkaç saniye hafifçe karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5-60 dk. inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresinin sonlanmasıyla örneklerin absorbens değeri 595 nm’de spektrofotometre vasıtasıyla ölçülmüş ve kalibrasyon eğrisine (Ek) göre protein miktarı tespit edilmiştir.

3.14. Kuru Hücre Ağırlıkları

Ekspresyon süresi boyunca hücrelerin toplam kuru hücre ağırlıkları hesaplanmıştır. Bu amaçla, ekspresyonun 24, 48, 72 ve 96. saatlerinde fermentasyon ortamından örnek alınarak 10000xg’de 4°C’de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda supernatant uzaklaştırılarak pelletler 105°C’de kurutulmuştur. Hücrelere ait toplam kuru ağırlık Wang ve ark.,’ın (2010) metoduna göre hesaplanmıştır.

3.15. SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) Analizi

Proteinler SDS-PAGE yöntemiyle Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) minijel tankı kullanılarak ve genel laboratuvar tekniklerine riayet edilerek ayrıştırılmıştır (Laemli, 1970).

3.16. Western-Blot Analizi

Ekspanzin proteinleri poliklonal ekspanzin antitadileri kullanılarak tanımlanmışlardır (Rose ve ark., 2000). Birincil antitadiler 1:1.500 ikincil antitadiler (antirabbit) 1:10.000 oranında seyreltilerek kullanılmışlardır. Western blot analizinde Enhanced chemiluminescent (ECL) protein tespit sistemi kullanılmıştır.

3.17. Ekspanzin Proteininin Selülozik Aktivitesinin HPLC Yöntemiyle Tayini

Rekombinant ekspanzin proteinlerinin selülozik etkisinin belirlenmesi amacı ile filtre kağıdı aktivitesi ölçülmüştür. Bu amaçla 50 mg parçalanmış filtre kağıdı (Whatman No1) deney tüpünde sitrat buffer (0,05M, pH 4,8) içerisine alınarak, üzerine artan oranlarda (0, 100, 200, 300, 400, 500 µg ekspanzin/g filtre kağıdı) rekombinant ekspanzin eklenerek ekspanzin proteinlerinin filtre kağıdında oluşturduğu hidroliz sonucu oluşan glukoz ve sellobioz miktarları HPLC yöntemiyle belirlenmiştir. Ayrıca rekombinant ekspanzinlerin sinerjistik etkisinin belirlenmesi amacıyla artan oranlarda eklenen ekspanzin proteinleri ile birlikte sabit miktarda ticari selülotik bir enzim olan vegazim (5 FPU) enziminin filtre kağıdında oluşturduğu hidroliz ile oluşan glukoz ve sellobioz miktarları HPLC ile belirlenmiştir.

3.18. İstatistiksel Analizler

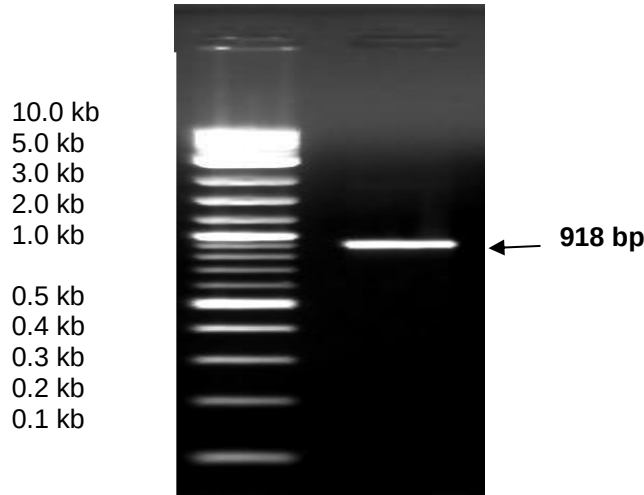
96 saatlik ekspresyon süresince transgenik suşlardan elde edilen rekombinant ekspanzin miktarları Bradford yöntemiyle mg/L düzeyinde hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar DUNCAN çoklu karşılaştırma testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. *Solanum lycopersicum* Genomundan LeExp1 Komplementer DNA'sının (cDNA) İzolasyonu

Rekombinant ekspanzin proteinlerinin fermentasyon ortamında ifade edilebilmesi (maya hücrelerine sentezletilebilmesi) için gerekli hedef DNA (LeExp1 geni) *Solanum lycopersicum* (domates) genomundan izole edilmiştir. Sözü edilen genin izolasyonu için ilk olarak toplam RNA ekstraksiyonu yapılmış ve daha sonra ters transkriptaz enzimi vasıtasıyla cDNA'lar sentezlenmiş ve kullanılan spesifik primerler vasıtasıyla LeExp1 geninin açık okuma bölgesi (Open Reading Frame) çoğaltılmıştır. LeExp1 geninin açık okuma bölgesinin amplifikasyonunda tek adımlı RT-PZR yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem temel olarak cDNA sentezi sonrasında hedef genin (LeExp1) spesifik primerler kullanılarak çoğaltılması esasına dayanmaktadır. RT-PZR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünler öncelikle agaroz jel üzerinde ayrıştırılmış ve sonuçlar fotoğraflanarak kayıt altına alınmıştır (Şekil 4.1.).

Reaksiyon sonucunda çoğaltılması hedeflenen bölgenin 918 baz çifti uzunluğunda olması öngörülmekteydi ve dolayısıyla ilk olarak agaroz jel üzerindeki DNA bantlarının boyutları kontrol edilerek çoğaltılan bölgenin hedef bölgeye ait olup olamayacağı değerlendirilmiştir. PZR sonucunda elde edilen reaksiyon ürünü kullanılan DNA markörü vasıtasıyla boyut açısından incelenmiştir. Agaroz jel üzerindeki DNA bant boyutu izole edilmesi planlanan LeExp1 gen bölgesine karşılık geldiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. *Solanum lycopersicum* ekspanzin geninin (LeExp1) spesifik primerler kullanılarak PZR yöntemiyle çoğaltılması sonucu elde edilen %1.2 agaroz jel görüntüsü

Solanum lycopersicum genomundan ekstrakte edilen toplam RNA denemelerde nükleik asit kaynağı olarak kullanılmış ve bu nükleik asitlerden komplementer DNA (cDNA) sentezi yapılmıştır. Elde edilen cDNA'lar üzerinden spesifik LeF1 ve LeR1 primerleri vasıtasıyla hedef genin açık okuma bölgesi çoğaltılmaya çalışılmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonrasında elde edilen reaksiyon ürünleri içerisinde etidyum bromit bulunan %1.2 agaroz jelinde 100 volt ve 10 mA'lık elektrik alanda yürütülmüş ve jel görüntüleme sisteminde ultra viyole ışık altında görüntülenmiştir. Elde edilen PZR reaksiyon ürünlerinin boyutları açısından değerlendirilmesinde 1.0 kb DNA markörü kullanılmıştır. Yaklaşık olarak 1000 baz çiftinden meydana gelen *Lycopersicum esculentum* Ekspanzin 1 (LeExp1) geni domates bitkisinden izole edilmiştir. Uygun primerler kullanılarak hedef LeExp1 geni çoğaltılmıştır. Hedef DNA bölgesinin dizilimi ve bu gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan primerler **Şekil 4.2.**'de gösterilmektedir.

atgggtatcataattttcatcctgttctctttttagactcatgtttcaacattgtgaaggaagaatccctgggtgttactct
 ggtggtcatgggaaactgcacatgctacattttacggcggaagtgatgcttctggaacaatggcggtgcgtgtggtt
 atggaaattatacagccaaggatacggagttaacacagcagcactgagtactgcttgtttaacaatggattaagtgt
 ggagcctgtttgaacttaaatgtacaaatactcctaattggaaatggtgtcttctggaacccttccattttaatcacag
 ctaccaatttctgcccaccaaattacgcgttgccaaatgacaatggtggctggtgaaccctcctcgccctcactttgac
 ctgcgtatgcctatgtttctcaaactgctcagtaccgcgctggcattgttctgtaacttatcgaggatcccatgccgaa
 agcaaggaggaatcagattaccatcaatggattccgttacttcaacttagtgtgatcacgaatgtagcaggtgcagg
 ggatattattaaggttgggtaaaaggaacaaagacaaattggattccattgagccgtaattggggacaaaattggca
 atcaaatgcggttttaactggtcaatcactctctttcagagttaaagctagtgaccatcgatctctacctcatggaatatg
 gttccttctcattggcaatttggccaaactttcatcggaagaatttcaaaatataaaattagtaagggtattgtattttaat
 ttgtgggaaaactaggatattcagagtgtgttcaccttaggaaaagaaatcgagtcctcactgaaaatacagataga
 taattaattaaactactaaaattttcgatattttgag
 tgtgtatcaacatttaacctaagtatggttaaatggagagaaagggt

Şekil 4.2. *Solanum lycopersicum* genomundan izole edilmesi hedeflenen LeExp1 gen bölgesine ait nükleik asit dizilimi (www.ncbi.nlm.nih.gov/AF548376)

PZR sonucunda elde edilen reaksiyon ürünlerinin değerlendirilmesinde agaroz jel analizi kullanılmış ve boyut doğrulaması yapıldıktan sonra ikinci bir konformasyon yöntemi olarak DNA dizilemesi yapılarak sekans bilgisi elde edilmiştir. Domates LeExp1 geni NCBI bilgi bankasında AF548376 aksesyon numarası ile depolanmıştır ve bu genin dizilim bilgisi belirtilen web sitesi (www.ncbi.nlm.nih.gov) adresinden temin edilmiştir. Hedef gen bölgesinin amplifikasyonu sonucunda elde edilen DNA bantları beklenen boyutta oldukları için PZR ürünleri saflaştırılmış ve sekans bilgileri tespit edilerek dizilimler belirlenmiştir (Şekil 4.3.). Elde edilen dizilimler ve NCBI bilgi bankasından temin edilen sekansların karşılaştırılması sonucunda hedef genin cDNA'sıyla %100 oranında benzerlik tespit edilmiş ve kesin olarak PZR reaksiyonu sonucundan çoğaltılması hedeflenen bölgenin amplifiye edildiği tespit edilmiştir.

GAATTCGAACTTCAATTCATTAAATCTTAAGAATGGGTATCATCATCTTCATCTTGGTTTTGTTGTTGCTTGACTCCTG
 |||
 GAATTCGAACTTCAATTCATTAAATCTTAAGAATGGGTATCATCATCTTCATCTTGGTTTTGTTGTTGCTTGACTCCTG

TTTCAACATCGTTGAGGGTAGAATCCAGGTGTTACTCTGGTGGTCTTGGGAACTGCTCAGCTACTTTTACGGTG
 |||
 TTTCAACATCGTTGAGGGTAGAATCCAGGTGTTACTCTGGTGGTCTTGGGAACTGCTCAGCTACTTTTACGGTG

GTTCTGACGCTTCTGGTACTATGGGTGGTCTTGTGGTACGGTAACTGTACTCTCAGGGTTACGGTGTTAACACTGC
 |||
 GTTCTGACGCTTCTGGTACTATGGGTGGTCTTGTGGTACGGTAACTGTACTCTCAGGGTTACGGTGTTAACACTGC

TGCTTTGTCCACTGCTTTGTTCAACAACGGTTTGCCTGTGGTGCTTGTTCGAGTTGAAGGTACAAACACTCCAACTG
 |||
 TGCTTTGTCCACTGCTTTGTTCAACAACGGTTTGCCTGTGGTGCTTGTTCGAGTTGAAGGTACAAACACTCCAACTG

GAAGTGGTGTGGCCAGGTAACCATCCATCTTGATCACTGCTACTAATTTCTGTCCACAACTACGCTTTGCCAAACGA
 |||
 GAAGTGGTGTGGCCAGGTAACCATCCATCTTGATCACTGCTACTAATTTCTGTCCACAACTACGCTTTGCCAAACGA

TAACGGTGGTGGTGTAAACCAAGACCACACTTTGATTGGCTATGCCAATGTTCTTGAAGTTGGCTCAGTAC
 |||
 TAACGGTGGTGGTGTAAACCAAGACCACACTTTGATTGGCTATGCCAATGTTCTTGAAGTTGGCTCAGTAC

AGAGCTGGTATCGTTCCAGTTACTTACAGAAGAATCCCTGTAGAAAGCAGGGTGGTATCAGATTCACATCAAC
 |||
 AGAGCTGGTATCGTTCCAGTTACTTACAGAAGAATCCCTGTAGAAAGCAGGGTGGTATCAGATTCACATCAAC

GGTTTCAGATACTTAACTTGGTTTTGATCACTAACGTTGCTGGTGCTGGTGACATCATCAAGGTTTGGGTTAAGGGTAC
 |||
 GGTTTCAGATACTTAACTTGGTTTTGATCACTAACGTTGCTGGTGCTGGTGACATCATCAAGGTTTGGGTTAAGGGTAC

TAAGACTAACTGGATCCATTGTCCAGAACTGGGGTCAAACTGGCAATCCAACGCTGTTTGACTGGTCAGTCCTTG
 |||
 TAAGACTAACTGGATCCATTGTCCAGAACTGGGGTCAAACTGGCAATCCAACGCTGTTTGACTGGTCAGTCCTTG

TCCTTCAGAGTTAAGGCTTCTGACCACAGATCCTCCACATCCTGGAACATGGTTCATCTCACTGGCAATTCGGTCAGACT
 |||
 TCCTTCAGAGTTAAGGCTTCTGACCACAGATCCTCCACATCCTGGAACATGGTTCATCTCACTGGCAATTCGGTCAGACT

TTTCATCGGTAAGAACTTCAAGATCTAAATAGTAAGGGTATTGTTATTTTAATTTGTGGGAACTAGGATATTTT
 |||
 TTTCATCGGTAAGAACTTCAAGATCTAAATAGTAAGGGTATTGTTATTTTAATTTGTGGGAACTAGGATATTTT

AGAGTGTGTTACCTTAGGAAAAGAAATCGAGTCCTCACTGAAAATTCAGATAGATAATTAATTAATACTAAAA
 |||
 AGAGTGTGTTACCTTAGGAAAAGAAATCGAGTCCTCACTGAAAATTCAGATAGATAATTAATTAATACTAAAA

TTTTTCGATATTTTGAAGTGTGTATCAACATTTAACCTAAGTATGGTTAAATGGAGAGAAAGGTTGAAGTGGCTGC
 |||
 TTTTCGATATTTTGAAGTGTGTATCAACATTTAACCTAAGTATGGTTAAATGGAGAGAAAGGTTGAAGTGGCTGC

AAAATCATGCAGCCG CAGCTGTTTTTTTTTTTACAATATACATCACAAGGCGGCCG
 |||
 AAAATCATGCAGCCG CAGCTGTTTTTTTTTTTACAATATACATCACAAGGCGGCCG

Şekil 4.3. LeExp1F1 ve LeExp1R1 spesifik primerleri kullanılarak *Solanum lycopersicum* genomundan çoğaltılan gen bölgesi ve bu bölgenin NCBI bilgi bankasından elde edilen AF548376 giriş numaralı LeExp1 mRNA'sına ait dizilimle karşılaştırılması

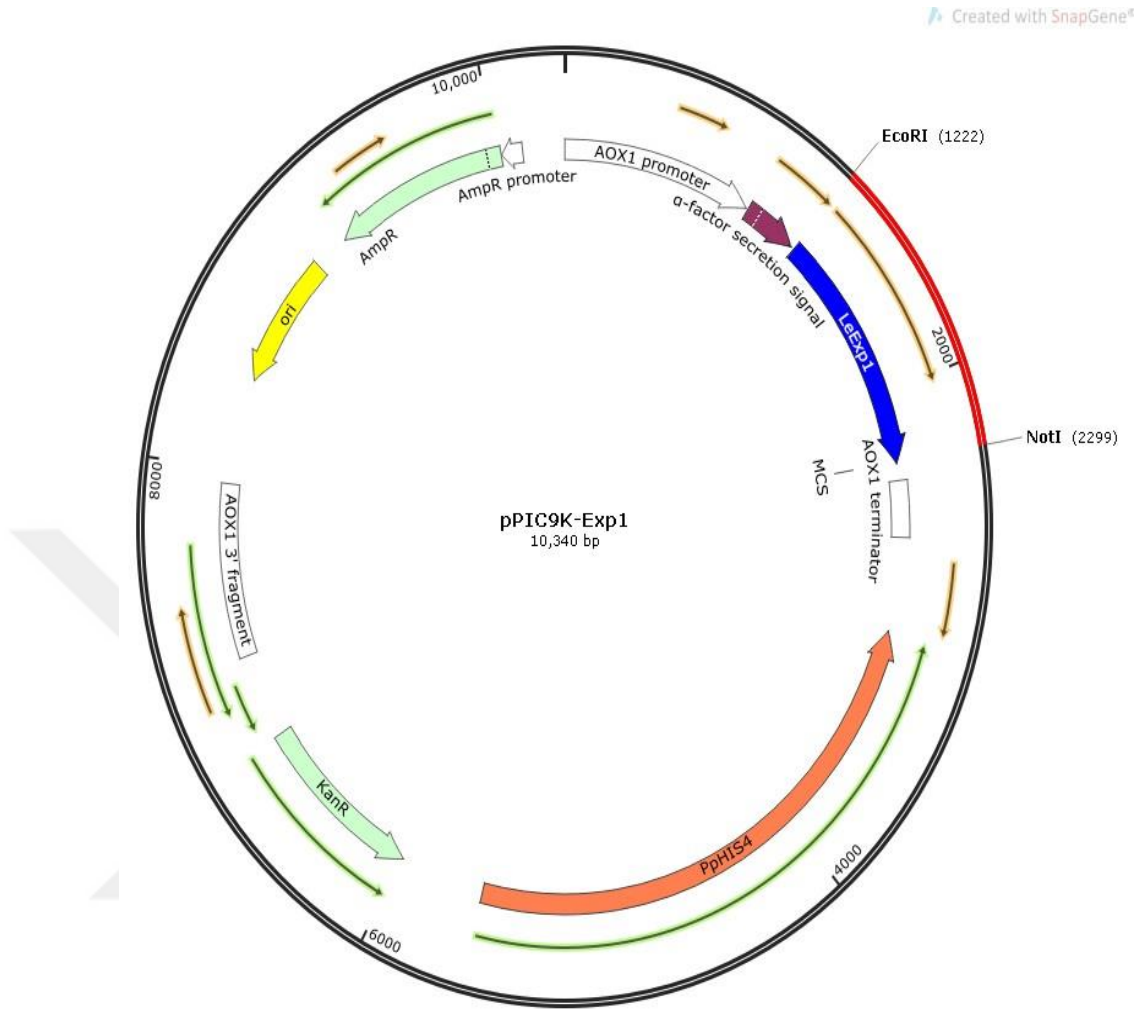
4.2. LeExp1 Hedef Genlerini Taşıyan pPIC9K ve pHIL-S1 Vektörlerinin İnşa Edilmesi

Rekombinant protein üretiminin önemli basamaklarından bir tanesi hedef genin uygun bir vektöre klonlanması ve seçilen uygun bir teknikle konakçı hücreye aktarılmasıdır. Vektör seçimi üretilcek protein miktarını, çalışmada kullanılması gereken restriksiyon enzimlerini, rekombinant protein üretiminin ekstraselüler veya intraselüler olması vb. önemli noktaları doğrudan veya dolaylı olarak etkilemektedir. Herhangi bir yabancı genin *P. pastoris* mayalarında ekspresyonu üç temel adımda gerçekleşmektedir. 1. Hedef genin ekspresyon vektörüne klonlanması. 2. Vektörün konakçı *P. pastoris* genomuna transferi. 3. *P. pastoris* mayalarında yabancı genin eksprese edilmesi. Otuz yılı aşkın süredir rekombinant protein üretiminde sıklıkla kullanılan *P. pastoris* ekspresyon sistemi gelişen teknoloji paralelinde geniş bir konakçı suş ve vektör çeşitliliğine sahip olmuştur. *Escherichia coli*'de çoğaltılmak üzere dizayn edilen *P. pastoris* ekspresyon sistemine ait tüm vektörler *E. coli* hücrelerinde seçilimi sağlayacak gen dizilimine sahiptir ve ayrıca ekspresyon vektörlerinin tamamı 0.9 kb büyüklüğünde AOX1 promotörü taşımaktadır.

Bu çalışma kapsamında domates ekspanzin proteininin rekombinant olarak üretilmesi ve maya hücrelerinin geliştiği fermentasyon ortamına ekstraselüler olarak salgılanması amacıyla farklı vektör sistemleri dizayn edilmiştir. Transgenik maya hücreleri tarafından üretilen rekombinant proteinlerin kültür ortamına salgılanması amacıyla farklı sekresyon sinyal bölgesine sahip pPIC9K ve pHIL-S1 olmak üzere iki adet vektör kullanılmıştır. Bu vektörler ayrı ayrı olarak *P. pastoris* mayalarına aktarılmış ve rekombinant ekspanzin proteini üretme yetenekleri açısından test edilmişlerdir. LeExp1 genleri sözü edilen vektörlere klonlandıktan sonra inşa edilen yeni vektörler pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 olarak isimlendirilmişlerdir.

pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 vektörleri sırasıyla alfa mating prepro (α -MF) ve asit fosfataz (*PHO1*) sekresyon sinyal sekanslarına sahiptir. Sekresyon sinyal dizilimleri farklı kaynaklardan izole edilmiştir ve ticari olarak üretilen pPIC9K ve

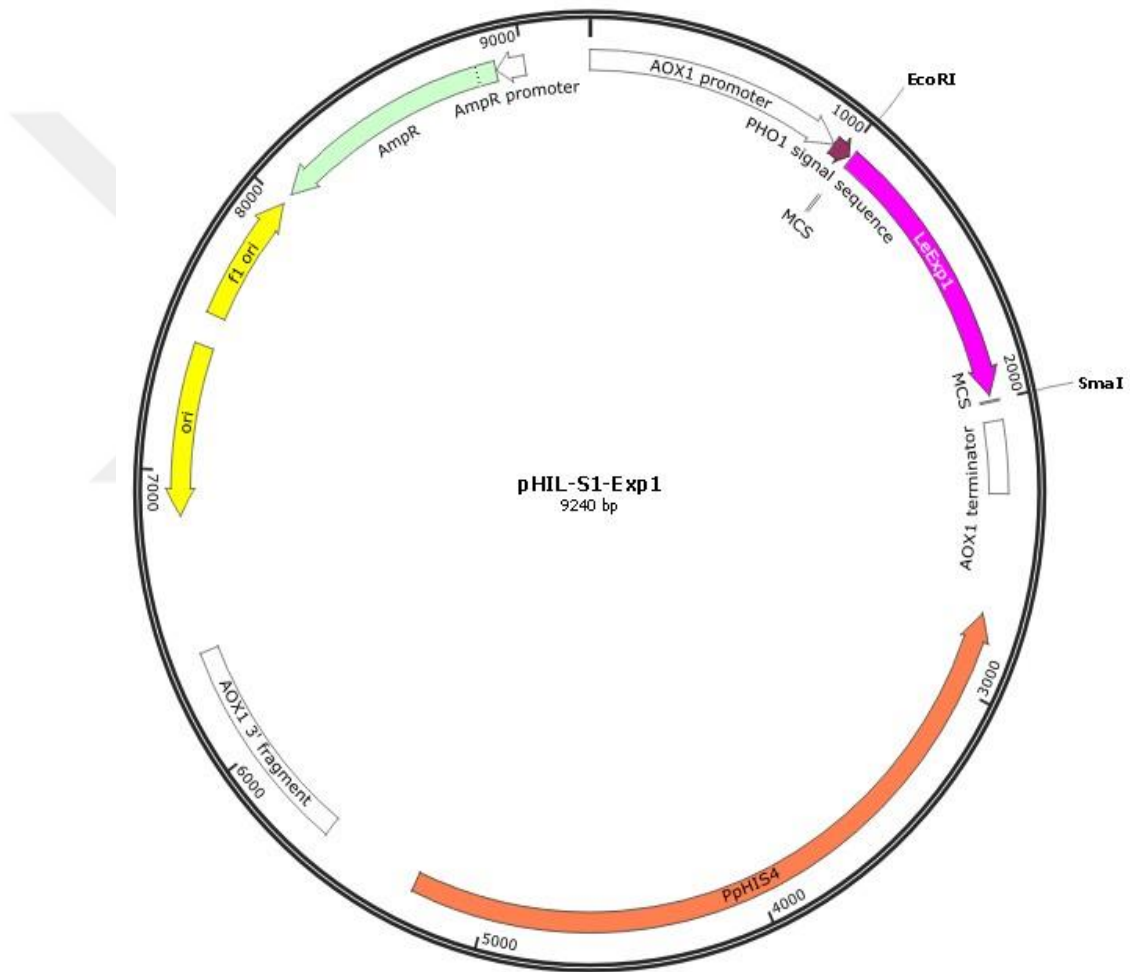
pHIL-S1 vektörlerine üretici firmalar tarafından klonlanmıştır. Dolayısıyla vektörler sinyal sekans bölgelerine sahip bir biçimde temin edilmiş ve bu çalışma kapsamında rekombinant olarak üretilmesi hedeflenen proteini kodlayan hedef gen vektöre klonlanmıştır. *S. cerevisiae* mayalarından izole edilen alfa mating prepro (α -MF) sinyal sekans bölgesi 19 aminoasitlik pre-peptid ve 67 aminoasitlik pro-peptid olmak üzere toplam 86 amino asitten oluşmaktadır. 949- 1218. bazlar arasında yer alan alfa mating (α -MF) sinyal sekans bölgesi, 1980-4514. bazlar arasında yer alan transformant hücrelerde seçim sağlayan *HIS4* geni, 4928- 5743. bazlar arasında yer alan Kanamisin direnç geni (*Kanr*) ve son olarak 8106-8966. bazlar arasında yer alan ampicilin dirençlilik genine sahip pPIC9K vektörü 9276 baz çiftinden oluşmaktadır. Hedef LeExp1 geni yaklaşık olarak 1000 baz çiftinden oluşmaktadır. LeExp1 hedef geninin klonlanması sonucunda pPIC9K vektörü yeni bir yapı kazanmıştır. Klonlanma işleminin ardından vektörün sahip olduğu yeni yapı [Şekil 4.4.](#)'de verilmiştir.



Şekil 4.4. LeExp1 genini taşıyan pPIC9K vektörünün şematik gösterimi

Solanum lycopersicum genomundan RT-PZR vasıtasıyla izole edilen LeExp1 geninin açık okuma bölgesi şekilde gösterildiği haliyle pPIC9K vektörüne klonlanmıştır. Klonlama işlemi öncesinde LeExp1 geninin 5' ve 3' uçlarına yönlendirilmiş bölgesel mutasyon yöntemiyle *EcoRI* ve *NotI* restriksiyon DNA endonükleaz enzimlerinin kesme bölgeleri uygun şekilde dizayn edilmiş primerler vasıtasıyla eklenmiştir. *EcoRI* ve *NotI* enzimleriyle kesilen LeExp1 geni; çoklu klonlama bölgesinde bulunan aynı enzim kesme bölgeleri üzerinden kesilmiş olan pPIC9K vektörüne DNA ligaz enzimi vasıtasıyla klonlanmıştır. İnşa edilen yeni vektöre pPIC9K- Exp1 adı verilmiş ve protein ifade denemelerinde kullanılmıştır.

pHIL-S1 vektörü *P. pastoris* mayalarından izole edilen ve 22 amino asit- 66 baz çiftinden oluşan asit fosfataz (PHO1) sinyal sekans dizilimine sahiptir. Temel olarak 942 ile 1007. bazlar arasında yer alan *PHO1* sinyal sekansına, *P. pastoris* mayalarında seçilimi sağlayan *HIS4* genine ve 7062- 7922. bazlar arasında yer alan ampisilin dirençlilik genine sahip pHIL-S1 vektörü toplamda 8260 baz çiftinden oluşmaktadır. Yaklaşık bin baz çiftinden oluşan LeExp1 geninin pHIL-S1 vektörüne klonlama işleminin ardından elde edilen vektör dizaynı Şekil 4.5.'de verilmiştir.



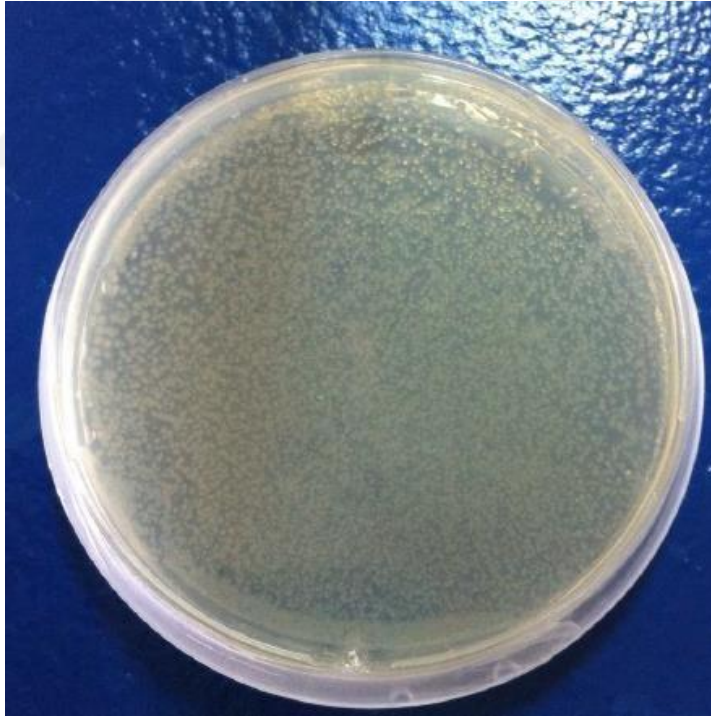
Şekil 4.5. LeExp1 genini taşıyan pHIL-S1 vektörünün şematik gösterimi

Solanum lycopersicum genomundan RT-PZR vasıtasıyla izole edilen LeExp1 geninin açık okuma bölgesi şekilde gösterildiği haliyle pHIL-S1 vektörüne klonlanmıştır. Klonlama işlemi öncesinde LeExp1 geninin 5' ve 3' uçlarına yönlendirilmiş bölgesel mutasyon yöntemiyle EcoRI ve SmaI restriksiyon DNA

endonükleaz enzimlerinin kesme bölgeleri uygun şekilde dizayn edilmiş primerler vasıtasıyla eklenmiştir. *EcoRI* ve *SmaI* enzimleriyle kesilen LeExp1 geni; çoklu klonlama bölgesinde bulunan aynı enzim kesme bölgeleri üzerinden kesilmiş olan pPIC9K vektörüne DNA ligaz enzimi vasıtasıyla klonlanmıştır. İnşa edilen yeni vektöre pHIL-S1-Exp1 adı verilmiş ve protein ifade denemelerinde kullanılmıştır.

4.3. pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 Vektörlerinin *E. coli* Hücrelerine Transforme Edilmesi

LeExp1 hedef genini içeren pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 vektörlerinin sub-cloning işlemi JM109 *Escherichia coli* hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 vektörleri JM 109 *E.coli* hücrelerine ısı-şoku yoluyla transfer edilmiştir. Transfer işleminin ardından hücreler 100 µg/mL ampicilin içeren LB agar katı besiyerinde geliştirilmiştir. Gelişim gösteren ve tek koloni oluşturan *E.coli* hücrelerinin örnek bir petri resmi Şekil 4.6.'da örnek olarak verilmiştir.



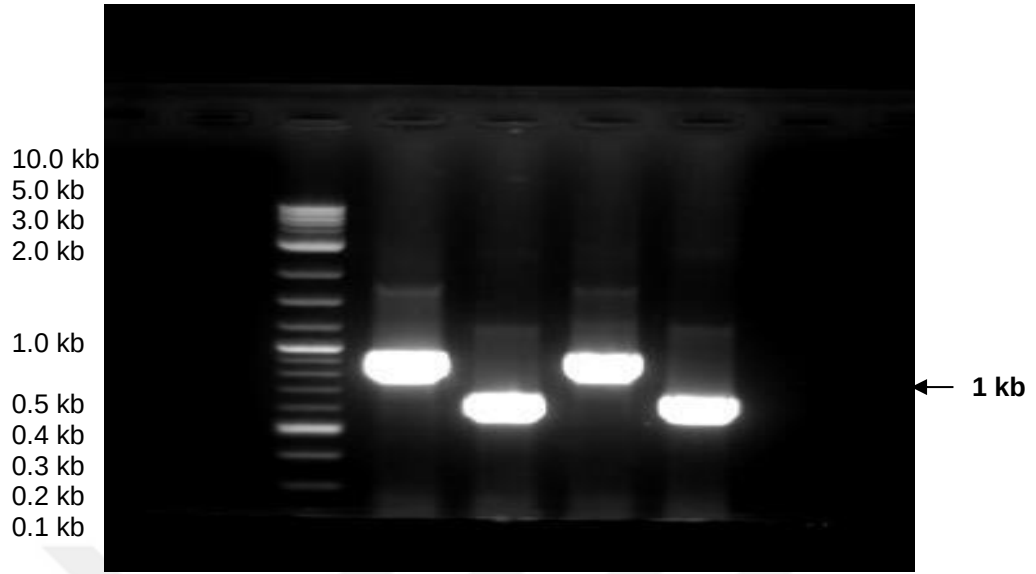
Şekil 4.6. 100 µg/mL ampicilin içeren Luria Bertani katı besiyerinde geliştirilen pPIC9K-Exp1 vektörünü içeren JM109 kompetent *E. coli* hücreleri

pPIC9K-Exp ve pHIL-S1-Exp vektörleri kompetent *E. coli* hücrelerine ısı şoku yöntemiyle transforme edilmişlerdir. Transformasyon sonrasında JM109 *E. coli* hücreleri içerisinde ampisilin antibiyotiği bulunan katı besiyerine yüzey yayma metoduyla ekilmiş ve vektörü taşıyan hücrelerin seçilimi yapılmıştır. Antibiyotikli besiyerinde gelişim gösteren hücrelerin pPIC9K-Exp ve pHIL-S1-Exp vektörünü taşıdığı değerlendirilmiştir. Ancak sadece antibiyotikli ortamda gelişmiş olmaları yani vektörün sağladığı antibiyotik dirençliliği vektör içeren *E. coli* hücrelerinin seçiminde yeterli görülmemiştir ve bu nedenle PZR yöntemi de kullanılarak hücrelerin ikinci bir doğrulama metoduyla pPIC9K ve pHIL-S1 vektörlerini ve bu vektörlere bağlı olarak hücre içine aktarılan LeExp1 genini içerip içermedikleri ikinci bir adımda analiz edilmiştir. Bu amaçla öncelikle vektörü içerdiği düşünülen antibiyotik dirençli JM109 bakteri hücre kolonileri seçilerek antibiyotik içeren (100 µg/mL) 5 mL sıvı LB besiyerine aktarılmış ve bir gece boyunca 37°C’de bekletilerek bakteri gelişimi ve aynı zamanda bakterilerin içerisinde vektörlerin çoğaltılması işlemi yapılmıştır (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. pPIC9K-LeExp1 vektörü ile transforme edilmiş JM109 kompetent hücrelerinin katı LB besiyerinde oluşturdukları kolonilerin antibiyotikli sıvı besiyerine inoküle edilmesi ve gece boyunca 37°C 200 rpm’de inkübe edilmesi sonucunda elde edilen hücre kültürü

E. coli bakteri hücre kültüründen ‘Plasmid DNA Preparation from *E. coli* by the Alkaline Lysis Procedure’ yöntemine göre plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Plazmid DNA izolasyonu işlemi sonucunda elde edilen plazmid DNA’lar PZR yönteminde DNA kaynağı olarak kullanılmıştır. PZR yöntemiyle transformasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiği ve pPIC9K ve pHIL-S1 vektörlerinin hedef genleri kesin olarak taşıdığı doğrulanmıştır. Şekil 4.8. LeExp1 genini taşıyan vektörlerle transforme edilmiş *E. coli* hücrelerinden izole edilen plazmidler kullanılarak yapılan PZR çalışması sonucunun agaroz jel üzerindeki görüntüsünü ifade etmektedir. PZR analizi sonucunda elde edilen veriler LeExp1 geninin *E. coli* hücrelerine aktarılan vektörler tarafından taşındığını göstermektedir. Primer çiftleri sırasıyla yaklaşık 900 bp ve 650 bp’lik DNA bölgelerini çoğaltmayı hedefleyecek şekilde tasarlanmışlardır. Agaroz jel görüntüsünden de anlaşılaacağı üzere ikinci ve dördüncü kuyucuktaki PZR ürünlerindeki primer çiftleri beklenildiği şekilde 900 bp’lik bir bölgeyi çoğaltmış; üçüncü ve beşinci kuyucuktaki PZR ürünlerindeki primerler çiftleri beklenildiği şekilde 650 bp’lik bir bölgeyi çoğaltmıştır. Dolayısıyla antibiyotik dirençliliği sonrasındaki seçimde elde edilen *E. coli* hücre kültürlerinin içerisindeki plazmidlerin hedef geni taşıdığı bu şekilde tayin edilmiştir.



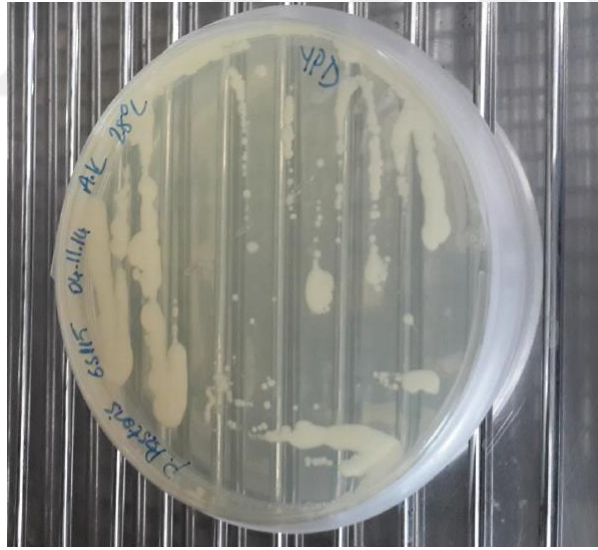
Şekil 4.8. pPIC9K-LeExp1 vektörüyle transforme edilen JM109 kompetent *E. coli* hücre kültüründen izole edilen plazmidlerin DNA kaynağı olarak kullanıldığı PZR ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü

E. coli hücrelerinin vektör içirip içermedikleri koloni PZR yöntemiyle analiz edilmiştir. Bu yöntemde antibiyotikli sıvı besiyerinde gelişen tek koloniye ait hücrelerden alkalın plazmid DNA ekstraksiyonu yöntemiyle nükleik asitler izole edilmiş ve PZR reaksiyonunda DNA kaynağı olarak kullanılmışlardır. PZR yöntemi için LeExp1F1-LeExp1R1 ve LeExp1F2-LeExp1R2 olmak üzere iki farklı primer çifti kullanılmıştır. Bu primerlerin karşılık geldikleri DNA parçacık uzunlukları sırasıyla 918 baz çifti ve 650 baz çifti olarak beklenilmektedir. PZR reaksiyonunda DNA kaynağı olarak 2. ve 3. kuyucukta pPIC9K-Exp1 vektöründen izole edilen DNA; 4. ve 5. kuyucukta ise pHIL-S1-Exp1 vektörlerinden izole edilen DNA kullanılmıştır. PZR ürünlerinin agaroz jel üzerinde ayrıştırılması sonucunda elde edilen görüntülere göre 2. ve 4. kuyucuklarda bulunan PZR ürünleri LeExp1F1-LeExp1R1 çiftinin kullanıldıkları reaksiyonlardır ve beklenildiği şekliyle 918 baz çiftine karşılık gelmektedir. Bilakis, 3. ve 5. kuyucuklara yüklenen PZR ürünlerinin eldesinde LeExp1F2-LeExp1R2 primer çiftleri kullanılmış ve sonucunda beklenildiği şekliyle 650 baz çiftlik DNA bantları elde edilmiştir.

4.4. *Pichia pastoris* Mayalarının pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 Vektörleri ile Transformasyonu (dönüştürülmesi)

Rekombinant ekspansin proteinlerinin ifade edilmesi amacıyla *Pichia pastoris* mayaları kullanılmıştır. *P. pastoris* mayalarının üretilmesi hedeflenen rekombinant proteinleri ifade edebilmeleri için genetik yapılarının dizayn edilmesi ve bu amaca uygun hale getirilmeleri gerekmektedir. Bu amaçla *P. pastoris* hücrelerine elektroporasyon yöntemiyle pPIC9K-LeExp1 ve pHIL-S1-LeExp1 vektörlerinin aktarılması çalışmaları yürütülmüştür.

Escherichia coli hücrelerinde çoğaltılmış olan ve LeExp1 hedef gen bölgesini taşıdıkları doğrulanmış pPIC9K ve pHIL-S1 vektörlerinin elektroporasyon yöntemiyle *P. pastoris* mayalarına aktarılması amacıyla ilk olarak kompetent *P. pastoris* mayaları hazırlanmıştır. GS115 suşlarının YPD agarda gelişimlerini gösteren şekil örnek olarak verilmiştir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. pPIC9K-LeExp1 ve pHIL-S1-LeExp1 vektörleri ile transforme edilmesi amacıyla kullanılan kompetent *P. pastoris* GS115 hücreleri

P. pastoris hücreleri stab kültürlerden alınarak Yeast Peptone Dextroz (YPD) katı besiyerine öze yardımıyla çizilerek aktarılmışlardır. Öze ile aktarılmadan sonra petri kapları 30°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiş ve tek koloni oluşturup oluşturamadıkları gözlenmiştir. Gelişen tek koloniler kompetent maya eldesinde ve

müteakiben elektroporasyon vasıtasıyla mayalara vektör aktarımında kullanılmışlardır.

YPD agarda geliştirilen *P. pastoris* kolonilerinden tek koloni seçilerek önce YPD sıvı besiyerine aşılanarak bir gece; sonra ise YPD sıvı besiyerinde belli bir konsantrasyon değerine ulaşana kadar zenginleştirilmiştir. İnkübasyondan sonra santrifüjleme ve sorbitol ile çözme işlemleri gerçekleştirilerek nihayetinde elektroporasyona uygun hale getirilmiş maya kültürü elde edilmiştir.

Hedef genleri taşıyan pPIC9K ve pHIL-S1 vektörleri hazırlanan kompetent maya hücrelerine aktarılmadan önce *SacI* enzimi ile 37⁰C’de gece boyunca doğrusal hale getirilmiştir. Elektroporasyon cihazı üretici firmanın tavsiyelerine uygun olarak *S. cerevisiae*’ye göre ayarlanmıştır ve elektroporasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektroporasyon işlemi tamamlanınca elektropore olmuş hücreler yayma yöntemiyle MD (Minimal Dextrose) katı besiyerine ekilmiş ve koloni oluşumu gözlenene kadar 30⁰C’de inkübe edilmiştir. 3-5 gün süren 30⁰C’deki inkübasyon sonucunda hedef genleri taşıyan pPIC9K ve pHIL-S1 vektörlerine sahip transgenik *P. pastoris* mayaları gelişmeye başlamışlardır (Şekil 4.10., 4.11.).



Şekil 4.10. pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1 vektörleri ile transforme edilmiş GS115 hücreleri GS115- pPIC9K-Exp1 (üstte) ve GS115-pHIL-S1-Exp1

Hedef gen bölgesini taşıyan vektörler elektroporasyon vasıtasıyla GS115 hücrelerine aktarılmıştır. Elektropore olmuş hücreler histidin içermeyen MD besiyerinde geliştirilmiştir. İnkübasyon sonunda hücrelerin gelişim göstermesi elektroporasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleşmiş olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.11. pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1 vektörleri ile transforme edilmiş SMD1168 hücreleri SMD1168- pPIC9K-Exp1 (üstte) ve SMD1168-pHIL-S1-Exp1

Hedef gen bölgesini taşıyan vektörler elektroporasyon vasıtasıyla SMD1168 hücrelerine aktarılmıştır. Elektropore olmuş hücreler histidin içermeyen MD besiyerinde geliştirilmiştir. İnkübasyon sonunda hücrelerin gelişim göstermesi elektroporasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleşmiş olduğunu göstermektedir.

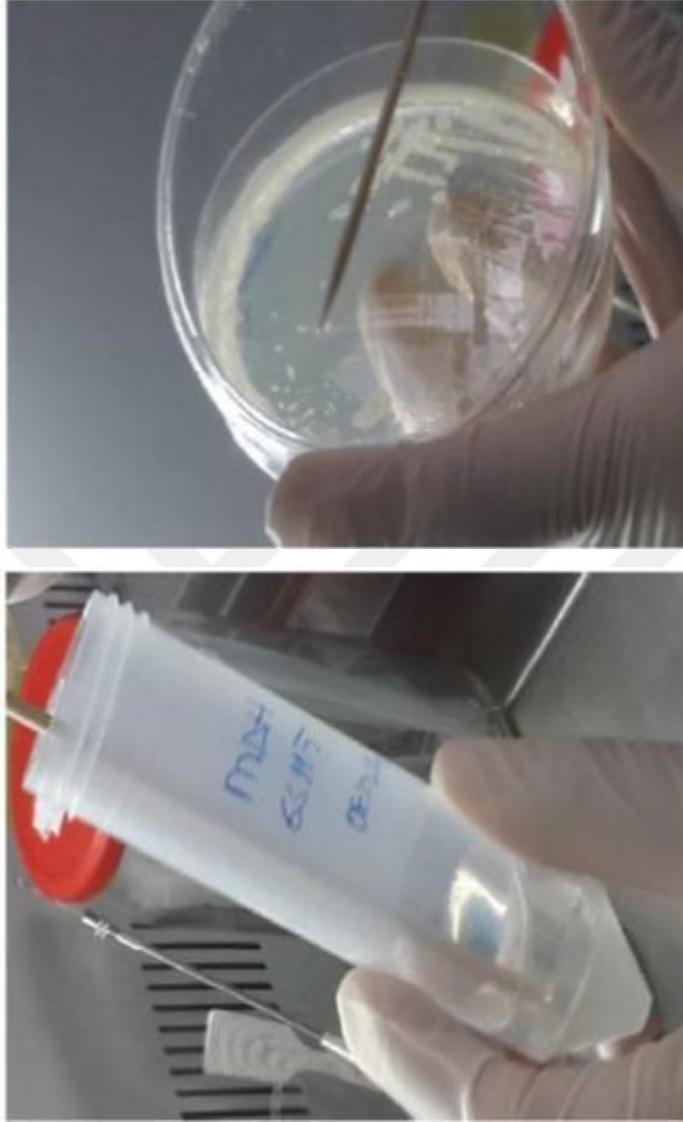
P. pastoris mayaları gelişebilmek için bulundukları besiyeri ortamında histidin amino asidi bulunmasına ihtiyaç duyarlar ya da histidin bulunmadığı durumlarda metabolik olarak bu amino asidi üretebilme yeteneğinde olmaları gerekir ancak *P.*

pastoris GS115 ve SMD1168 suşlarının histidin üretme yetenekleri bulunmamaktadır. Yapılan dizayna göre *P. pastoris* mayalarının genomuna rekombine olma yeteneğinde bulunan pPIC9K ve pHIL-S1 vektörleri yapılarında hedef genin yanı sıra histidin üretimini katalizleyen *HIS4* genini ve antibiyotik dirençlilik genlerini bulundurmaktadırlar. Dolayısıyla ancak genomuna pPIC9K ve pHIL-S1 vektörünün yerleştiği *Pichia* mayalarının histidin bulunmayan selektif besiyerinde koloni oluşturma yeteneğine sahip olabilecekleri önkabülünden yola çıkılarak ilk adımda vektör içeren mayaların seçimi bu prensibe göre yapılmıştır. Buna göre hedef genleri taşıyan pPIC9K ve pHIL-S1 vektörleriyle başarılı bir şekilde dönüştürülen maya hücrelerinin histidin içermeyen besiyerinde gelişim gösterme yeteneğinde olabilecekleri öngörülmektedir ve birinci kademe başarılı maya transformant seçimi histidin bulunmayan besiyerindeki gelişimlerine göre yapılmıştır. İçerdiği vektör sayesinde histidin bulunmayan selektif besiyerinde gelişme yeteneğini gösteren maya hücreleri ise His⁺ olarak adlandırılmışlardır.

4.5. Transgenik Mayaların PZR Reaksiyonu Vasıtasıyla Genom Analizi ve Antibiyotikli Besiyerinde Seçimleri

Elektroporasyon işlemi sonrasında başarılı bir şekilde vektörün maya genomlarına aktarılıp aktarılmadığının ilk seviyede denenmesi ve teyit edilmesi kültürlerin histidin içermeyen besiyerinde gelişme özelliği kazanmaları olarak düşünülebilir. Kazanılan bu özellik kültürlerin His⁺ olarak kodlanmasını ve ilk etapta vektörlerin başarılı bir şekilde mayalara aktarılmasının göstergesi olarak kabul edilmiştir. Ancak bu seçim mekanizması tek başına hedef genleri taşıyan vektörlerin başarılı bir şekilde mayaların genetik yapılarına eklemlendiğini göstermek için yeterli bir seleksiyon mekanizması olarak kabul edilememektedir. Dolayısıyla ikinci seviye seçim ve doğrulama işlemine ihtiyaç duyulmuştur ve bu amaçla His⁺ olarak adlandırılan kolonilerden DNA izolasyonu yapılmış ve bu DNA'ya bağlı olarak hedef genlerin maya genomundaki varlıkları PZR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Şekil 4.12.'de DNA izolasyonuna örnek olarak GS115-pPIC9K-Exp1 transgenik suşundan His⁺ koloni seçimi ve sıvı MD besiyerine

inokulasyonuna ait resimler gösterilmiştir.

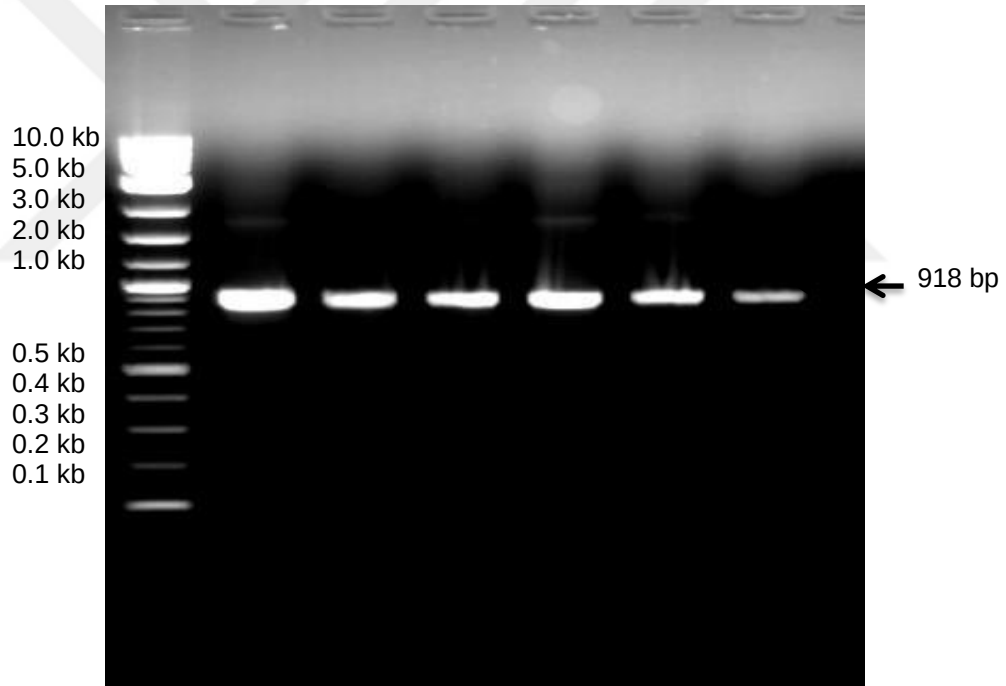


Şekil 4.12. His⁺ GS115-pPIC9K-Exp1 kolonilerin katı MD besiyerinden seçimi ve MD sıvı besiyerine inokülasyonu

İnkübasyon, hücrelerde istenen konsantrasyon elde edilene kadar devam etirilmiştir. İnkübasyon sonucunda MD sıvı besiyerinde gelişen ve His⁺ olarak adlandırılan GS115-pPIC9K- Exp1, GS115-pHIL-S1-Exp1, SMD1168-pPIC9K-Exp1 ve SMD1168-pHIL-S1-Exp1 maya kültürleri DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

Santrifüjle çöktürülen maya peleti çeşitli tampon çözeltiler ve su ile

             ve hücre duvarını parçalama yeteneğine sahip enzimler kullanılarak maya hücre duvarlarının parçalanması ve dolayısıyla DNA moleküllerinin çıkışı sağlanmıştır. SDS ve Asetat gibi     lt  ler yardımıyla hücre ve organel membranları parçalanarak DNA molekülleri     lt   içerisinde dağıtılmış ve daha sonra DNA molekülleri     lt  lenerek hücre ortamından ayrıştırılmıştır. Transgenik His⁺ GS115-pPIC9K-Exp1, GS115-pHIL-S1-Exp1, SMD1168-pPIC9K-Exp1 ve SMD1168-pHIL-S1-Exp1 *P. pastoris* suşlarının tamamından DNA izolasyonu yapılmıştır ve transgenik mayalardan elde edilen DNA ekstraktları PZR analizlerinde DNA kaynağı olarak kullanılmış ve içerisinde hedef genlerin varolup olmadıkları araştırılmıştır. Rekombinant mayalardan izole edilen DNA'ların kullanıldığı PZR reaksiyonuna ait agaroz jel görüntüsü şekil 4.13.'de verilmiştir.



şekil 4.13. Transgenik *P. pastoris* GS115 ve SMD1168 maya hücrelerinden spesifik LeExp1 primerleri kullanımıyla elde edilen reaksiyon ürünlerinin %1.2 agaroz jel üzerinde gösterimi

Elde edilen PZR   r  nleri maya hücrelerine klonlanmış olan LeExp1 geninin beklenen uzunluğuna karşılık geldiği şekilde görülmektedir.

PZR analizinde DNA kaynağı olarak rekombinant maya hücrelerinden izole edilen DNA, elektroporasyon öncesinde mayalara aktarılacak üzere *SacI* DNA restriksiyon enzimi kullanılarak doğrusal hale getirilen pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 vektörleri (pozitif kontrol), rekombinant maya hücrelerinden izole edilen DNA kullanılmıştır. PZR reaksiyonu iki adet pozitif kontrol ve dört adet transgenik mayaya ait DNA'ların kaynak DNA olarak kullanıldığı toplam altı farklı tüp içerisinde spesifik primerler kullanılarak yürütülmüştür. Agaroz jel görüntüsüne göre birinci kuyucukta DNA markörü, ikinci ve yedinci kuyucuklarda *P. pastoris* mayalarının transformasyonu amacıyla hazırlanmış ve yapısında klonlanmış hedef genleri barındıran vektör (pozitif kontrol), üçüncü, dördüncü, beşinci ve altıncı kuyucuklarda elektroporasyon yöntemiyle dönüştürülen dört adet transgenik mayadan izole edilen DNA nükleik asit kaynağı olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçtan da görülebileceği üzere kontrol örneklerinden öngörüldüğü şekilde pozitif sonuçların bulunması, üç, dört, beş ve altıncı kuyucuklarda beklenen büyüklükte bant elde edilmesi reaksiyonun sağlıklı ve kontrollü bir şekilde yürütülmüş olduğunu göstermektedir. PZR reaksiyonu aynı koşullarda iki kere daha tekrar edilmiş ve her seferinde de aynı sonuç elde edilmiştir. PZR sonucunda elde edilen veriler elektroporasyon uygulanmış mayaların genomlarında hedef gen bölgesini taşıdıklarını göstermiştir. Bu yöntem histidin seleksiyonu sonrasında elektroporasyon işleminin başarısını doğrulayan ve mayaların genomunda vektörleri ve dolayısıyla LeExp1 genini taşıdıklarını doğrulayan ikinci bir kontrol basamağı olarak değerlendirilmiştir.

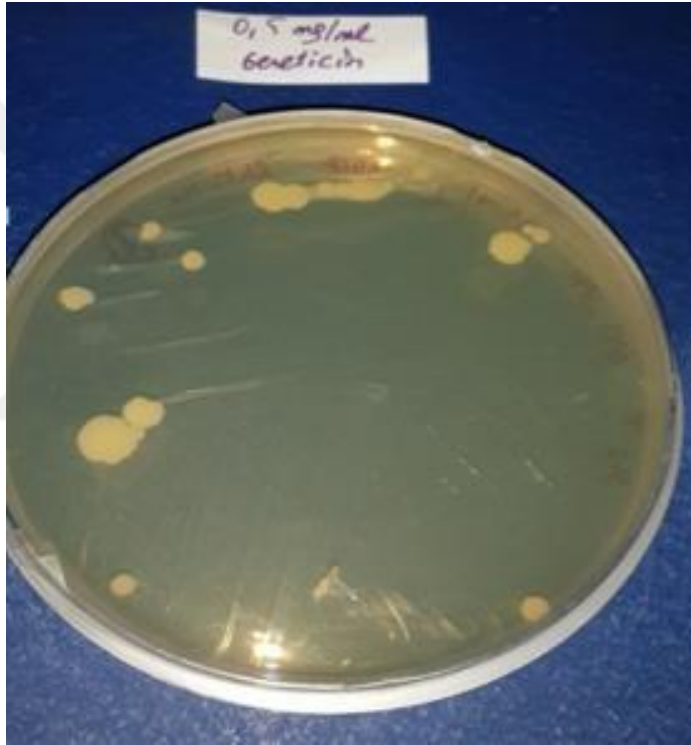
Normal koşullarda *P. pastoris* maya hücreleri genomlarında antibiyotik dirençliliği sağlayan herhangi bir gen dizilimine sahip değildir. Dolayısıyla maya hücrelerinin Genetisin 418 antibiyotikli ortamda gelişim gösterebilmeleri yalnızca genomlarına transforme edilmiş ve antibiyotik dirençliliğine sahip vektörler vasıtasıyla gerçekleşecektir. Antibiyotik testi iki farklı nedenden dolayı önemlidir. Birincisi mayaların hedef vektörü içerdiğinin bir kanıtı olması, ikincisi ise maya genomuna aktarılan hedef gen kopya sayısının bir indikatörü olarak bilgi vermesidir. Protein ekspresyonunun optimizasyonu genellikle hedef genin çoklu kopyasını taşıyan ekspresyon suşlarının kullanılması ile mümkün olmaktadır. Ekspresyon

kasetinin birden fazla kopyasını genomunda bulunduran suşlar tekli kopya taşıyan suşlardan daha fazla rekombinant protein üretme yeteneğine sahip olmaktadır (Thill ve ark., 1990; Clare ve ark., 1991). *P. pastoris* maya genomuna hedef genin çoklu kopyasının aktarılması için çeşitli yöntemler mevcuttur. Bunlardan bir tanesi ‘*HIS4*’ ve ‘*kanR*’ genine sahip -histidin bulunmayan ortamda gelişim özelliği gösteren ve kanamisin antibiyotiğine dirençli- vektörlerin kullanılmasıdır. Bakteriyel kanamisin direnç geni Genetisin 418’e direnç sağlar ve hücrelerin G418’in farklı seviyelerinde gelişim göstermesi çoklu kopya taşıdıklarının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Clare ve ark., (1991) tarafından yapılan bir çalışmada bu yöntem kullanılmış ve hedef genin 30 kopyasını taşıyan konakçı suşlar elde edilmiştir. (Scorer ve ark., 1994).

pPIC9K ve pHIL-S1 plazmidleri vektör haritalarında gösterildiği üzere genomlarında antibiyotik direncini sağlayan gen bölgesine sahiptir. Bu sayede plazmidler, genomuna transfer edilmiş maya hücrelerine de antibiyotikli ortamda gelişme özelliği kazandıracaklardır. Buradan yola çıkılarak üçüncü ve nihai seleksiyon yöntemi olarak rekombinant mayaların Genetisin 418 antibiyotiği içeren besiyerlerinde geliştirilmesi yolu kullanılmıştır. Bu amaçla His⁺ olarak adlandırılan ve PZR reaksiyonu ile hedef gen bölgesini taşıdığı doğrulanan maya hücreleri sırasıyla 0.5, 1, 2 ve 4 mg/mL düzeylerinde antibiyotik içeren YPD agarlarda gelişime alınmıştır.

Transgenik mayaların antibiyotik dirençlilikleri belirlenirken dört farklı transgenik mayaya ait His⁺ koloniler ilk olarak 1mg/mL düzeyinde antibiyotik içeren YPD besiyerinde gelişime alınmıştır. Fakat maya hücrelerinin 1 mg/mL antibiyotikli ortamda gelişim gösteremedikleri gözlemlenmiştir. Ancak transgenik maya hücrelerinin histidin bulunmayan MD besiyerinde gelişim göstermesi ve PZR reaksiyonları sonucunda elde edilen pozitif bantların varlığı elektroporasyon işleminin doğru bir şekilde yapıldığının ve hedef geni taşıyan vektörlerin maya hücrelerine doğru bir şekilde aktarıldığının göstergesi olarak kabul edilmişti ve buradan yola çıkılarak hedef gene sahip vektörleri genomlarında taşıyan transgenik maya hücrelerinin antibiyotikli besiyerinde gelişim göstermeleri beklenmekteydi.

Dolayısıyla maya hücrelerinin 1 mg/mL düzeyinde antibiyotik içeren besiyerinde gelişim gösteremeyişi antibiyotik miktarının yoğun olabileceği ihtimalini düşündürmüştür. Bu nedenle transgenik maya hücreleri yeniden 0.5 mg/mL düzeyinde antibiyotik içeren besiyerine ekilerek buradaki gelişimleri incelenmiştir. İnkübasyon sonucunda 0.5 mg/mL düzeyinde antibiyotikli besiyerinde maya hücrelerinin gelişim gösterdiği gözlemlenmiştir. Şekil 4.14.'de GS115-pPIC9K-Exp1 transgenik maya hücrelerinin 0.5 mg/mL antibiyotikli ortamda gelişimini gösteren fotoğraf örnek olarak gösterilmektedir.



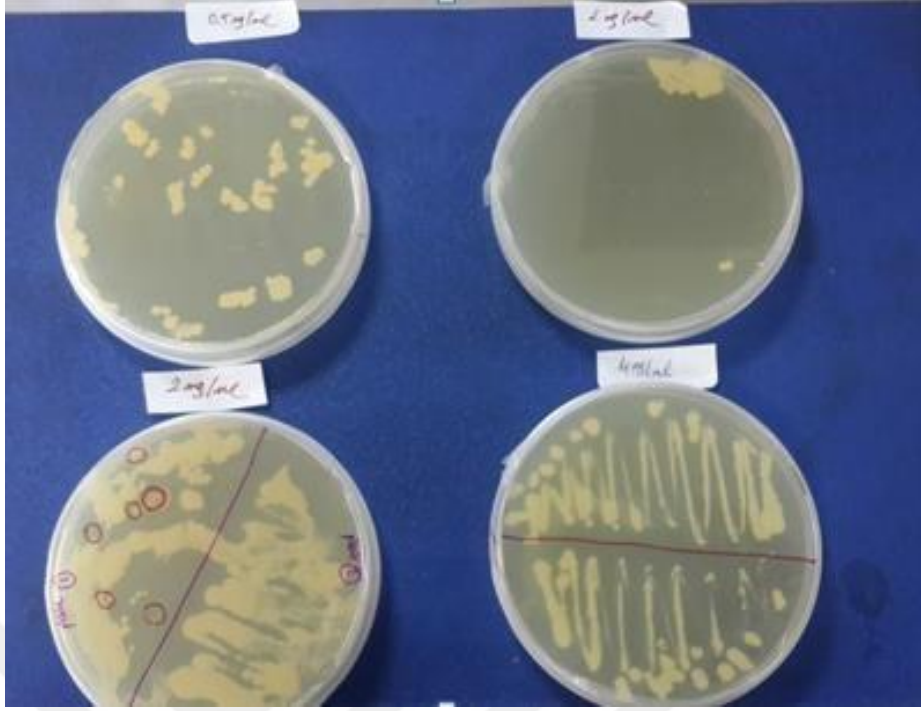
Şekil 4.14. 0.5 mg/mL düzeyinde antibiyotik içeren YPD besiyerinde gelişim gösteren GS115-pPIC9K-Exp1 hücreleri

Dört adet transgenik maya hücresi 0.5 mg/mL düzeyinde antibiyotikli ortamda gelişim göstermiş ve 0.5 mg/mL düzeyinde antibiyotik içeren ortamda ortama adapte olarak gelişim gösteren koloniler seçilerek 1 mg/mL antibiyotik içeren ortamda geliştirilmiştir. Şekil 4.15.'de GS115-pPIC9K-Exp1 transgenik maya hücrelerinin 1 mg/mL antibiyotikli ortamda gelişimini gösteren fotoğraf örnek olarak gösterilmektedir.



Şekil 4.15. 1 mg/mL antibiyotikli besiyerinde gelişim gösteren GS115-pPIC9K-Exp1 maya kolonileri

Şekil 4.16.'dan görüleceği üzere 0.5 ve 1.0 mg/mL düzeylerinde antibiyotik içeren besiyerlerinde gelişebilen koloniler daha sonra 2.0 ve 4.0 mg/mL gibi daha yüksek konsantrasyon düzeylerinde antibiyotik içeren besiyerlerine aktarılarak gelişim gösterebilme yetenekleri incelenmiştir. Antibiyotikli besiyerlerinde gelişebilme özellikleri mayaların rekombinant karakterini gösteren üçüncü seviyede kontrol testi olarak kayıt altına alınmıştır.



Şekil 4.16. Farklı konsantrasyonlarda Genetisin 418 antibiyotiği içeren YPD besiyerlerinde geliştirilen GS115 pPIC9K-LeExp1 rekombinant *P. pastoris* hücreleri

Genel olarak 4.0 mg/mL antibiyotik konsantrasyonu düzeylerinde gelişme yeteneğine sahip olan mayaların 8-12 kopya sayısında transgeni genomlarında taşıdıkları belirtilmektedir. Bu nedenden dolayı 4.0 mg/mL antibiyotik konsantrasyonunda gelişebilen mayalar ileriki rekombinant protein ekspresyon aşamalarda kullanılmak üzere stab kültür haline getirilerek uygun koşullar altında muhafazaya alınmıştır (Şekil 4.17.).



Şekil 4.17. Rekombinant protein ekspresyonunda kullanılmak üzere 4.0 mg/mL Genetisin 418 antibiyotik içeren ortamda gelişebilen hedef transgeni içeren maya kültürleri

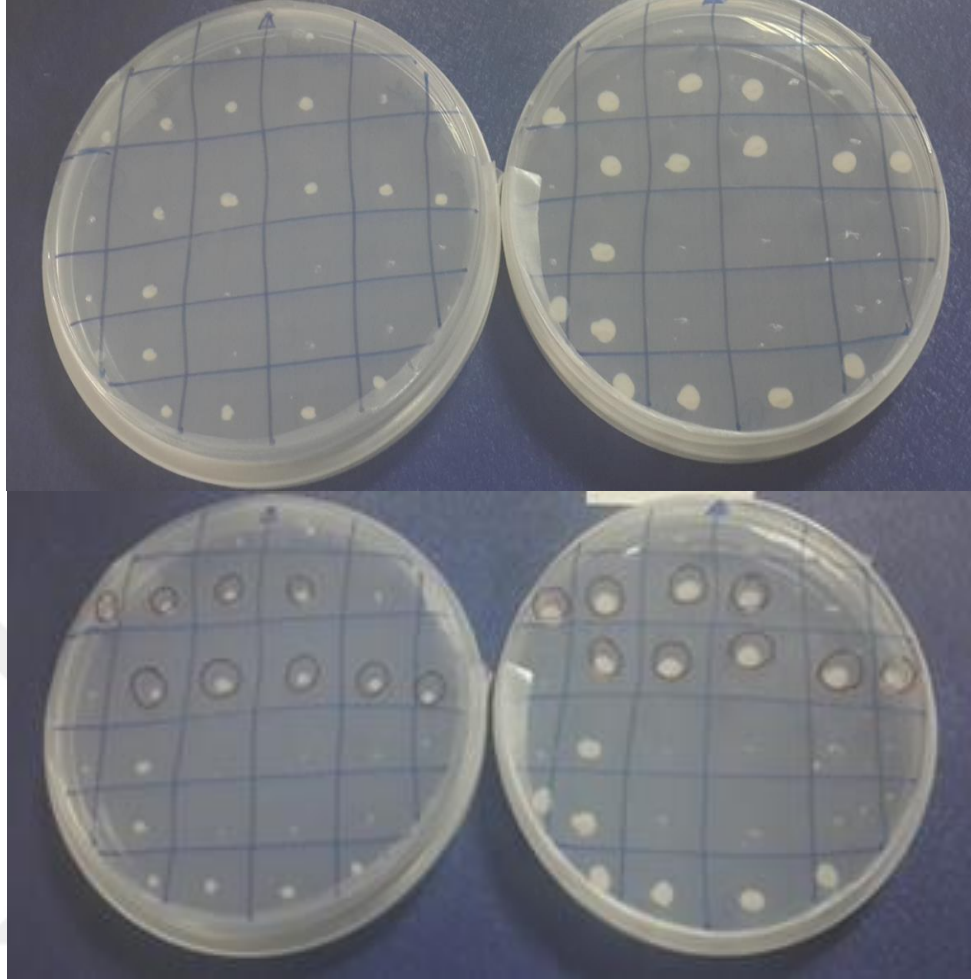
4.6. Mut⁺ (Methanol utilization-plus) Fenotipinin Belirlenmesi

Metilotropik *Pichia pastoris* mayaları karbon kaynağı olarak metanolü kullanmaktadır ve bu kullanım durumuna göre *P. pastoris* suşları Mut (+) (Methanol utilization plus) ve Mut (s) (Methanol utilization slow) olmak üzere iki farklı fenotip oluşturmaktadır. Daha önce de belirtildiği gibi ticari olarak üretilen herhangi bir *P. pastoris* suşu metanolü etkin veya düşük miktarda kullanımına göre bu fenotiplerden biri ile tanımlanmaktadır. AOX1 ve AOX2 *P. pastoris*'de alkol oksidaz enzimlerinin enkodlanmasından sorumlu gen dizilimleridir ve fenotiplerdeki farklılık AOX1 ve AOX2 promotörün etkisinden doğmaktadır. AOX1 geninin ekspresyonu metanol varlığında çok yüksek seviyelere çıkmaktadır ve maya hücrelerinde alkol oksidaz aktivitesinin önemli kısmı AOX1 kontrolünde gerçekleşmektedir. Metanol varlığında ortamda bulunan toplam protein büyük ölçüde AOX1 proteinleri tarafından oluşturulmaktadır. AOX2 geni metanol varlığında AOX1'e göre çok daha yavaş gelişme gösterir. AOX1 geninin yokluğu veya azlığı alkol oksidaz aktivitesini yavaşlatacağından dolayı suşların metanolde düşük oranda gelişme göstermesine neden olur ve böylece Mut^S fenotipinde suşlar oluşur. Suşlar AOX1 genlerinde

mutasyona sahip iken; AOX2 genleri doğal tip halindedir. AOX1 genlerindeki mutasyon sonucunda suşların metanolü metabolize etme yetenekleri azalmaktadır. Mut⁺ fenotipi suşların doğal tipde olduğunu ve metanolü karbon kaynağı olarak kullandığını ifade etmektedir. Dolayısıyla Mut⁺ fenotipine sahip hücreler büyümek için Mut^S suşlardan daha fazla metanole ihtiyaç duymaktadır (Cereghino ve Cregg, 2000).

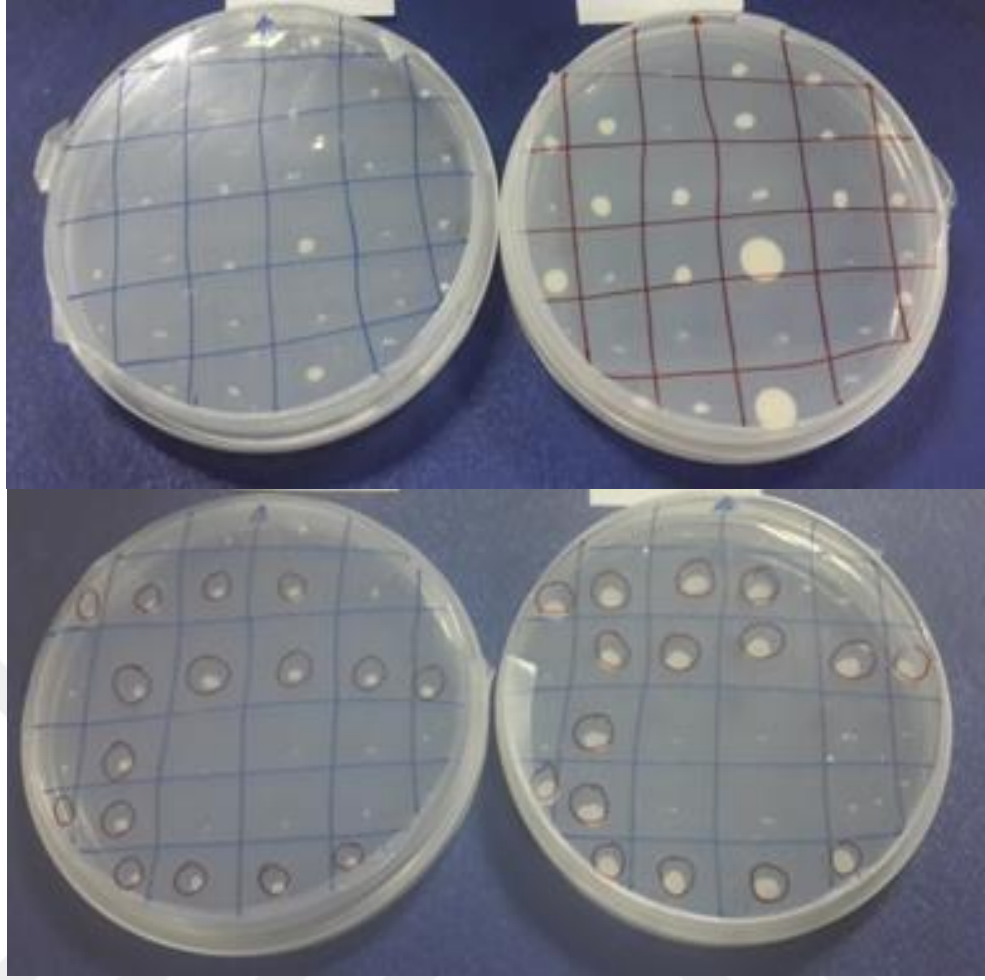
Bu çalışmada kullanılmış olan pPIC9K ve pHIL-S1 vektörleri AOX promotörlerine sahip vektörlerdir ve vektörleri lineer hale getirmek amacıyla *SacI* enzimi kullanıldığı takdirde oluşacak fenotipin Mut⁺ olması beklenmektedir. Mut⁺ fenotipine sahip maya hücreleri hem MD hem de MM (Minimal methanol) besiyerinde gelişme özelliği göstermektedir. Suşları doğrusal hale getirmek amacıyla *SacI* enzimi ile kesildiğinde plazmidler AOX1 geninin 5' ucundan bağlanmakta, dolayısıyla AOX1 promotörü kesilmemektedir ve böylece metanolü bir biçimde kullanan Mut⁺ fenotipler oluşmaktadır (Romanos, 1995).

Elektroporasyon işleminin ardından elde edilen transgenik maya hücrelerinin öncelikle histidin bulunmayan ortamda gelişim göstererek, ardından PZR reaksiyonları yürütülerek ve son olarak Genetisin 418 antibiyotikli ortamda geliştirilerek hedef genlere sahip vektörleri taşıdıkları doğrulanmıştır. Transgenik maya hücrelerinin sahip oldukları fenotiplerinin belirlenmesi amacıyla elektroporasyon sonrasında ekim yapılmış olan MD besiyerlerinden dört adet maya hücresine ait His⁺ koloniler seçilmiştir ve sırasıyla MM ve MD besiyerine inoküle edilmiştir. 30 °C'de 3-5 gün inkübasyon sonucunda maya hücreleri her iki besiyerinde de gelişim göstererek Mut⁺ fenotipine sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.18., 4.19.).



Şekil 4.18. Sırasıyla MM ve MD’de gelişim gösteren transgenik GS115-pPIC9K-Exp1 (üstte) ve GS115-pHIL-S1 maya hücreleri

Yanyana bulunan her iki petri eşit şekilde bölünmüştür ve her iki petride aynı hücre içerisindeki koloniler aynı His⁺ kolonisine aittir. Örneğin; birinci petrinin birinci karesinde yer alan ve ikinci petrinin birinci karesinde yer alan koloni aynı koloniye temsil etmektedir. Hazırlanan vektör dizaynına göre ve kullanılan enzimlere bağlı olarak her dört transgenik mayaya ait hücrelerin inkübasyon boyunca besiyeri ortamında bulunan metanol ve dekstrozu bileşenlerini etkin bir biçimde kullanarak gelişim göstermesi beklenmektedir. Çünkü maya genomlarını doğrusal hale getirmek amacıyla kullanılan *SacI* enziminin kesim noktasına göre plazmidlerin maya genomunda AOX1 geninin 5’ ucundan bağlanmış olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla da AOX1 promotörü kesilmeyecek ve maya hücrelerinin gelişimi esnasında metanol etkili bir biçimde kullanılacaktır.

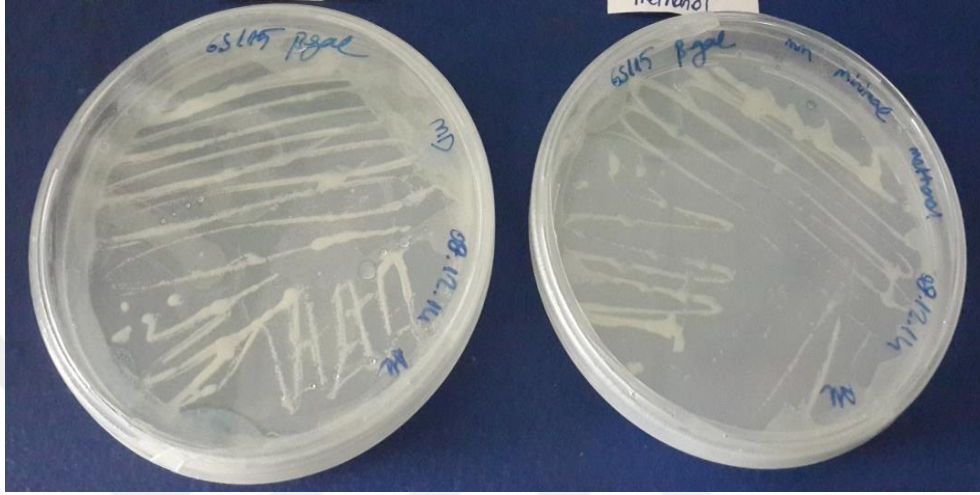


Şekil 4.19. MM ve MD besiyerlerinde gelişim gösteren transgenik SMD1168-pPIC9K-Exp1 (üstte) ve SMD1168-pHIL-S1-Exp1 maya hücreleri

Şekil 4.18. ve 4.19.'dan görüldüğü üzere her dört transgenik mayaya ait koloniler sırasıyla MM ve MD besiyerlerine ekilmiş ve inkübasyon sonunda her iki besiyerinde koloni oluşumunun görülmesi ile transgenik maya suşlarının fenotipik karakterlerinin Mut^+ olduğu belirlenmiştir. Mut^+ kolonilerin her iki besiyerinde gelişim gösterdiği halka içine alınan kolonilerden görülmektedir.

Fenotipik karakterin belirlenmesi işleminin doğru bir şekilde yürütüldüğünü kontrol etmek amacıyla *P. pastoris* GS115 β -Galactosidaz suşu kullanılmıştır. *P. pastoris* GS115 β -Galactosidaz suşu Mut^+ karakteristik fenotipine sahiptir ve hem MM hem de MD besiyerlerinde gelişim göstermesi beklenmektedir. Dolayısıyla transgenik mayalara paralel olarak *P. pastoris* GS115 β -Galactosidaz suşu da önce MM sonra ise MD besiyerine çizim metodu kullanılarak inoküle edilmiştir.

İnkübasyon sonunda *P. pastoris* GS115 β -Galaktosidaz suşlarının hem MM hem de MD besiyerinde hızlı bir şekilde çoğalma ve gelişim gösterdikleri belirlenmiştir. Şekil 4.20.'de her iki besiyerinde gelişim gösteren *P. pastoris* GS115 β -Galaktosidaz suşlarının görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.20. His⁺Mut⁺ karakteristik fenotipine sahip *P. pastoris* GS115 β -Galaktosidaz suşları

Kontrol amacıyla kullanılan *P. pastoris* GS115 β -Galactosidaz suşu her iki besiyerinde gelişim göstermiştir. Dolayısıyla maya hücrelerinin fenotipik karakterinin doğru bir şekilde ve beklenildiği gibi Mut⁺ olarak belirlendiği tespit edilmiştir.

4.7. Rekombinant *Pichia pastoris* Hücrelerinin Seçilimi

Pichia pastoris ekspresyon sistemi bakteri, memeli, küf vb. çeşitli organizmalara ait çok sayıda proteinin rekombinant olarak üretilmesinde son yıllarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Hızlı bir şekilde çoğaltılabilmesi, rekombinant protein üretim dizaynının kolaylıkla yapılabilmesi, ekstraselüler üretime olanak vermesi gibi özellikleri *P. pastoris* maya hücrelerinin sahip oldukları bazı avantajlar olarak sayılabilmektedir. Üretilen rekombinant proteinlerin kültür ortamına salgılanması *P. pastoris* gibi çok az sayıda endojen protein üreten organizmaların kullanıldığı ekspresyon sistemlerinde büyük önem arz etmektedir. Bu sistemlerde kültür ortamında bulunan proteinlerin tamamına yakına hedef proteinlerden oluşacağı

protein üretiminin bir sonraki basamağı olan saflaştırma işlemini de önemli ölçüde rahatlatmaktadır. Proteinlerin hücre ortamına salgılanması, maya genomlarına transforme edilen vektörlerin sahip oldukları sekresyon sinyal sekansları sayesinde gerçekleşmektedir. Günümüzde *P. pastoris* ekspresyon sisteminde kullanılması amacıyla ticari olarak üretilmiş birçok vektör mevcuttur. Söz konusu vektörler ekstraselüler veya intraselüler protein üretimine olanak sağlayan sinyal sekans dizilimlerine sahip olabilmektedir.

Bu çalışmada daha önce de belirtildiği gibi rekombinant proteinlerin fermentasyon ortamına salgılandığı (ekstraselüler) bir vektör düzayını yapılmıştır. Öncelikle rekombinant olarak üretilmesi hedeflenen proteinlere ait gen bölgesi *Solanum lycopersicum*'dan izole edilmiştir ve ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu yardımıyla çoğaltılmıştır. PZR reaksiyonu vasıtasıyla çoğaltılmış olan hedef gen bölgesi saflaştırılmıştır ve çalışma kapsamında kullanılması planlanan pPIC9K ve pHIL-S1 vektörlerine uygun metodlar yoluyla klonlanmıştır. Hedef gen bölgelerine sahip yeni vektörler *P. pastoris* GS115 ve SMD1168 suşlarına elektroporasyon yolu ile transfer edilmek amacıyla *E. coli* hücrelerinde çoğaltılmıştır ve elektroporasyon işlemi başarılı bir şekilde tamamlanmıştır. Mevcut GS115 ve SMD1168 suşları artık hedef geni taşıyan vektörler ile dönüştürülmüş olup rekombinant protein üretimine hazır hale getirilmiştir.

P. pastoris metilotropik maya olarak kabul edilir ve karbon kaynağı olarak metanolü kullanır. Metanolün metabolizmasındaki ilk adım moleküler oksijenin alkol dehidrogenaz tarafından kullanılmasıyla metanolün formaldehite oksidasyonudur. Alkol oksidaz enziminin oksijene olan afinitesi düşük olduğundan bu açığı *P. pastoris* yüksek miktarda enzim üreterek kapatmaktadır. Alkol oksidaz'ın üretimini düzenleyen promotör (AOX1) *Pichia*'da heterolog protein ekspresyonunu gerçekleştirmek için kullanılmıştır. Dolayısıyla bu çalışmada rekombinant protein üretiminin AOX1 promotör kontrolünde gerçekleştirilmesinin sebebi bu şekilde açıklanabilmektedir.

Rekombinant protein üretimi gerçekleştirilirken maya hücrelerinden (GS115-

pPIC9K-Exp1, GS115-pHIL-S1-Exp1, SMD1168-pPIC9K-Exp1, SMD1168-pHIL-S1-Exp1) tekli (single colony) koloniler seçilmiştir. Dolayısıyla her bir koloni bir örnek teşkil etmektedir ve değerlendirmeler buna göre yapılmıştır. Bilindiği gibi tüm mikrobiyoloji temelli araştırmalarda çalışmalar bu yönde gerçekleştirilmektedir. Çünkü her ne kadar aynı bileşim ve şartlarda geliştirilmiş olsa da bir petri kabı içerisindeki her bir koloni birbirinden farklı özelliklere sahip olabilmektedir ve dolayısıyla bir petri kabından onlarca saf kültür elde edilebilmektedir. Bu durumun bir sonucu olarak hali hazırda tamamlamış olduğumuz çalışmamızda dört adet transgenik maya hücresinden rekombinant protein üretiminde kullanılmak üzere yüzlerce koloni elde edilmiştir.

Rekombinant protein üretimi denemelerinde öncelikle her bir transgenik maya hücresinden farklı antibiyotik dirençliliğine sahip koloniler kullanılmıştır. Antibiyotiğe dirençli kolonilerin kullanımı şu hususta önem kazanmaktadır: antibiyotik dirençliliği maya genomuna aktarılan hedef gen kopya sayısının bir indikatörü olarak bilgi vermektedir. Bir başka deyişle; maya hücrelerinin yükselen antibiyotik düzeylerinde gelişim gösterebilmeleri genomlarında birden fazla sayıda hedef gen kopyasına sahip oldukları anlamına gelmektedir. Genel olarak 4.0 mg/mL antibiyotik konsantrasyonu düzeylerinde gelişme yeteneğine sahip olan mayaların 8-12 kopya sayısında transgeni genomlarında taşıdıkları belirtilmektedir. Bu nedenden dolayı 4.0 mg/mL antibiyotik konsantrasyonunda gelişebilen mayalar recombinant protein ekspresyon aşamalarında kullanılmıştır. Bu amaçla antibiyotik dirençliliği çalışmaları sonunda farklı konsantrasyonlarda gelişim gösteren kolonilerden hazırlanan saf kültürlerden (stablar) örnek alımı yapılmıştır.

Her bir transgenik maya hücresine ait 0.5, 1, 2 ve 4 mg/mL düzeylerinde antibiyotikli ortama direnç gösteren koloniler ilk aşamada protein üretimi çalışmalarında kullanılmıştır. Denemeler sonunda 'Bradford assay' analizleri ile dört adet transgenik hücreye ait örneklerin süpernatantları içerisindeki toplam protein konsantrasyonu hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre genel olarak 0.5 mg/mL düzeyinde antibiyotiğe dirençli kolonilerin kullanıldığı örneklerde neredeyse yok denecek kadar az; yükselen antibiyotik dirençliliğine sahip örneklerde ise protein

konsantrasyonunun nispeten daha yoğun olduğu tespit edilmiştir. *P. pastoris* mayalarının natif proteinlerinin oldukça düşük miktarlarda olması durumundan yola çıkılarak ortamdaki protein yoğunluğunun hedef proteinler tarafından oluşturulduğu düşünülmüştür ve ekspresyon çalışmalarının devamında yüksek antibiyotik (4 mg/mL) dirençliliğine sahip koloniler kullanılmıştır. Rekombinant protein üretimi amacıyla kullanılan her bir transgenik suşa ait koloni sayısı Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Her bir transgenik suşa ait 4 mg/mL antibiyotikli besiyerinde gelişim gösteren ve rekombinant protein ekspresyonunda kullanılan koloni sayısı

Transgenik suş	Koloni sayısı
SMD1168-pPIC9K-Exp1	64
SMD1168-pHIL-S1-Exp1	48
GS115-pPIC9K-Exp1	52
GS115-pHIL-S1-Exp1	58

4.8. Rekombinant *Pichia pastoris* Hücrelerinin Fermentasyon Ortamında LeExp1 Genlerini Transkribe Etme Yeteneklerinin Araştırılması

Transgenik *Pichia pastoris* SMD1168-pPIC9K-Exp1, SMD1168-pHIL-S1-Exp1, GS115-pPIC9K-Exp1 ve GS115-pHIL-S1-Exp1 suşlarından rekombinant ekspanzin üretimini gerçekleştirmek amacıyla öncelikli olarak koloni seçimi yapılmıştır. Ekspresyonda kullanılacak koloniler her transgenik maya hücresine ait 4 mg/mL düzeyinde antibiyotikli besiyerine direnç gösteren koloniler arasından rastgele seçilerek ekspresyon çalışmaları yürütülmüştür. Ekspresyon çalışmalarına paralel olarak transgenik mayaların ekspanzin proteinlerinin üretiminden sorumlu LeExp1 genini üretebilme yetenekleri belirlenmiştir. Bu amaçla transgenik *P. pastoris* hücrelerinden toplam RNA izolasyonu yapılmış ve elde edilen RNA Yarı Kantitatif Ters Transkriptaz (RT-PZR) reaksiyonunda kullanılmıştır. Elde edilen veriler neticesinde ekspresyonun 24, 48, 72 ve 96. saatlerinde transgenik *P. pastoris* mayalarının LeExp1 genini üretebilme kabiliyetleri belirlenmiştir.

4.8.1. pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 vektörlerini içeren SMD1168 *Pichia pastoris* suşunun LeExp1 gen transkripsiyonu

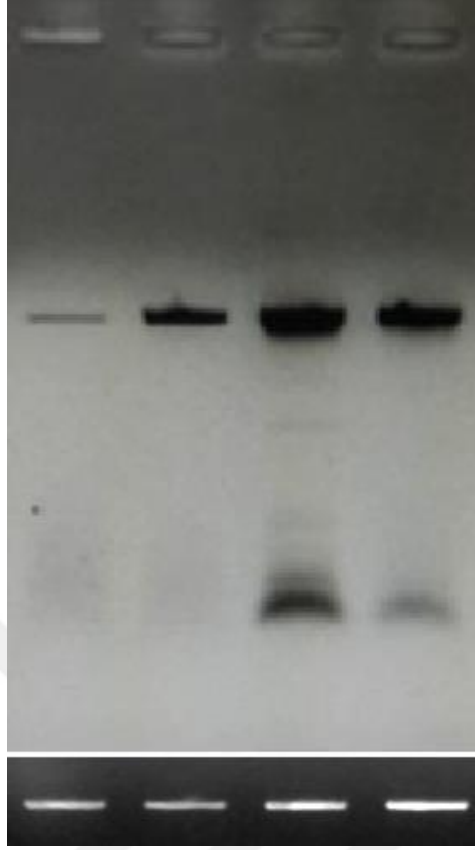
pPIC9K-Exp1 vektörlerini içeren SMD1168 hücreleri çeşitli moleküler ve antibiyotikli besiyerlerinde gelişebilme yeteneklerine bağlı olarak tespit edilmiştir. Fermentasyon esnasında LeExp1 geninin transkripsiyon karakteristiğini ve profilini belirlemek amacıyla Yarı Kantitatif Ters Transkriptaz (RT - PZR) reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ters transkriptaz PCR yöntemi için toplam RNA *P. pastoris* hücrelerinden ekstrakte edilmiştir. Fermentasyon ortamında gelişen *P. pastoris* hücrelerinin 24, 48, 72 ve 96. saatlerde örneklemeleri yapılarak 4°C ve 10000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmişlerdir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılarak santrifüj tüplerinin altında kalan hücre peleti toplam RNA izolasyonu amacıyla kullanılmıştır. Toplam RNA izolasyonunun gerçekleştirilmesinde Invitrogen™ Ambion™ RNAqueous Total RNA İzolasyon kiti üretici firmanın talimatlarına uygun olarak kullanılmıştır. RNA moleküllerinin stabil olmayan yapısı ve kolaylıkla enzimatik parçalanmaya uğradıklarından dolayı RNA ekstraksiyonunda kullanılan tüm plastik ve cam malzemeler DEPC ile muamele edilmiştir. Ekstraksiyon esnasında steril laboratuvar çalışma kurallarına riayet edilmiş, örnek kalitesi ve miktarı spektrofotometrik analizlerle belirlendikten sonra kısa süre içerisinde kullanılacak numuneler -20°C'de saklanmışlardır, diğer örnekler ise uzun süreli depolama amacıyla -86°C'ye alınmışlardır.

LeExp1 geninin SMD1168 hücrelerinde ve pPIC9K vektörleri kontrolündeki transkripsiyon karakteristiği ve profili Şekil 4.21.'de görüldüğü gibidir. Agaroz jel görüntüsünden anlaşılabileceği gibi LeExp1 gen transkripsiyonu fermentasyonun ilk 24 saati sonunda başlamıştır ve bu transkripsiyon fermentasyonun ileriki safhalarında da devam etmiştir. Elde edilen sonuçlara göre örneklemenin yapıldığı her 24 saatlik evrelerde de belirgin bir LeExp1 transkripsiyonu da mevcuttur. En yoğun transkripsiyon 72 saatlik evrede alınan örneklerde görülmüştür.



Şekil 4.21. LeExp1 geninin pPIC9K-Exp1 vektörünü taşıyan SMD1168 *Pichia pastoris* hücrelerinde fermentasyon esnasında transkripsiyonunun %1.2 agaroz jel üzerindeki gösterimi

1. kuyucuk LeEpx1 geninin 24 saat sonundaki transkripsiyonunu, 2. kuyucuk 48 saat sonundaki transkripsiyonu, 3. ve 4. kuyucuklar ise sırasıyla 72 ve 96. saatler sonundaki LeExp1 geninin transkripsiyonunu göstermektedir.



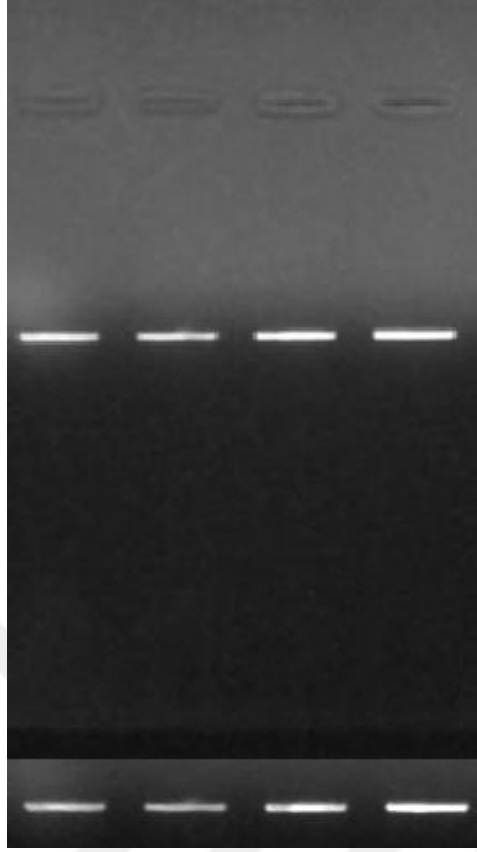
Şekil 4.22. LeExp1 geninin pHIL-S1-Exp1 vektörünü taşıyan SMD1168 *Pichia pastoris* hücrelerinde fermentasyon esnasında transkripsiyonunun %1.2 agaroz jel üzerindeki gösterimi

1. kuyucuk LeExp1 geninin 24 saat sonundaki transkripsiyonunu, 2. kuyucuk 48 saat sonundaki transkripsiyonu, 3. ve 4. kuyucuklar ise sırasıyla 72 ve 96. saatler sonundaki LeExp1 geninin transkripsiyonunu göstermektedir.

4.8.2. pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 vektörlerini içeren GS115 *Pichia pastoris* suşunun LeExp1 gen transkripsiyonu

Bu çalışmada ikinci bir protein ekspresyon suşu olarak *P. pastoris*'in GS115 hücreleri kullanılmıştır. GS115 hücreleri pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 vektörlerini içermeleri açısından ayrı ayrı test edilmişlerdir. Sözü edilen vektörlerin herbirini taşıyan hücreler saf kültür olarak stab besiyerlerine alınmış ve protein ekspresyon çalışmalarında kullanılmak üzere uygun koşullar altında bekletilmişlerdir. Fermentasyon esnasında GS115 suşunun pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 kontrolü altında LeExp1 geninin transkribe etme yetenekleri ve profilini belirlemek amacıyla Yarı Kantitatif Ters Transkriptaz (RT - PZR) reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar [Şekil 4.23.](#) ve [Şekil 4.24.](#)'de verilmiştir.

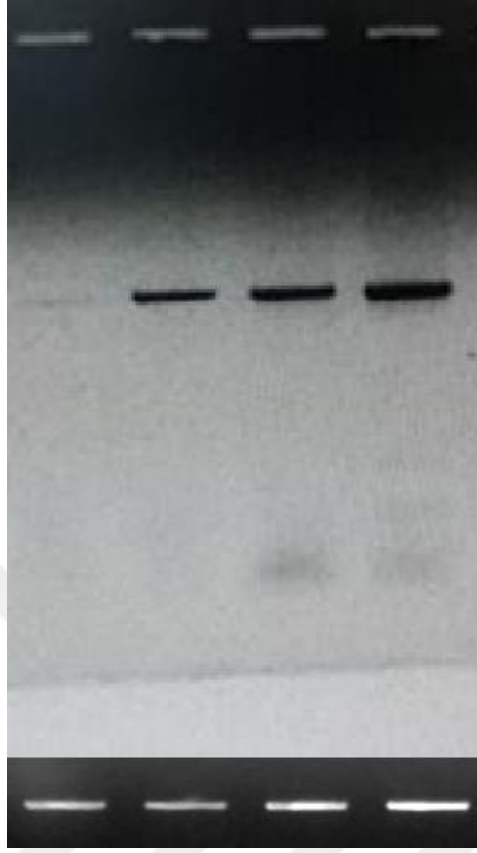
LeExp1 geninin GS115 hücrelerinde ve pPIC9K vektörü kontrolündeki transkripsiyon karakteristiği ve profili [Şekil 4.23.](#)'de görüldüğü gibidir. Agaroz jel görüntüsünden anlaşılabileceği gibi LeExp1 gen transkripsiyonu fermentasyonun ilk 24 saati sonunda başlamıştır ve bu transkripsiyon fermentasyonun ileriki safhalarında da devam etmiştir. Elde edilen sonuçlara göre örnekleme yapıldığı her 24 saatlik evrelerde de belirgin bir LeExp1 transkripsiyonu da mevcuttur. En yoğun transkripsiyon 72 saatlik evrede alınan örneklerde görülmüştür.



Şekil 4.23. LeExp1 geninin pPIC9K-Exp1 vektörünü taşıyan GS115 *Pichia pastoris* hücrelerinde fermentasyon esnasında transkripsiyonunun %1.2 agaroz jel üzerindeki gösterimi

1. kuyucuk LeExp1 geninin 24 saat sonundaki transkripsiyonunu, 2. kuyucuk 48 saat sonundaki transkripsiyonu, 3. ve 4. kuyucuklar ise sırasıyla 72 ve 96. saatler sonundaki LeExp1 geninin transkripsiyonunu göstermektedir.

LeExp1 geninin GS115 hücrelerinde ve pHIL-S1 vektörü kontrolündeki transkripsiyon karakteristiği ve profili Şekil 4.24.'de görüldüğü gibidir. Agaroz jel görüntüsünden anlaşılabacağı gibi LeExp1 gen transkripsiyonu fermentasyonun ilk 24 saati sonunda başlamıştır ve bu transkripsiyon fermentasyonun ileriki safhalarında da devam etmiştir. Elde edilen sonuçlara göre örnekleme yapıldığı her 24 saatlik evrelerde de belirgin bir LeExp1 transkripsiyonu da mevcuttur. En yoğun transkripsiyon 72 saatlik evrede alınan örneklerde görülmüştür.



Şekil 4.24. LeExp1 geninin pHIL-S1-Exp1 vektörünü taşıyan GS115 *Pichia pastoris* hücrelerinde fermentasyon esnasında transkripsiyonunun %1.2 agaroz jel üzerindeki gösterimi

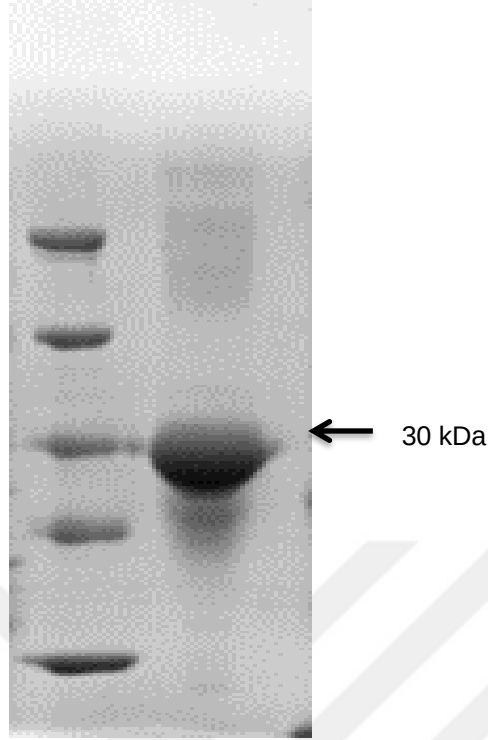
1. kuyucuk LeEpx1 geninin 24 saat sonundaki transkripsiyonunu, 2. kuyucuk 48 saat sonundaki transkripsiyonu, 3. ve 4. kuyucuklar ise sırasıyla 72 ve 96. saatler sonundaki LeExp1 geninin transkripsiyonunu göstermektedir.

4.9. Rekombinant Ekspanzin Proteinlerinin SDS-PAGE Yöntemiyle Ayırıştırılması

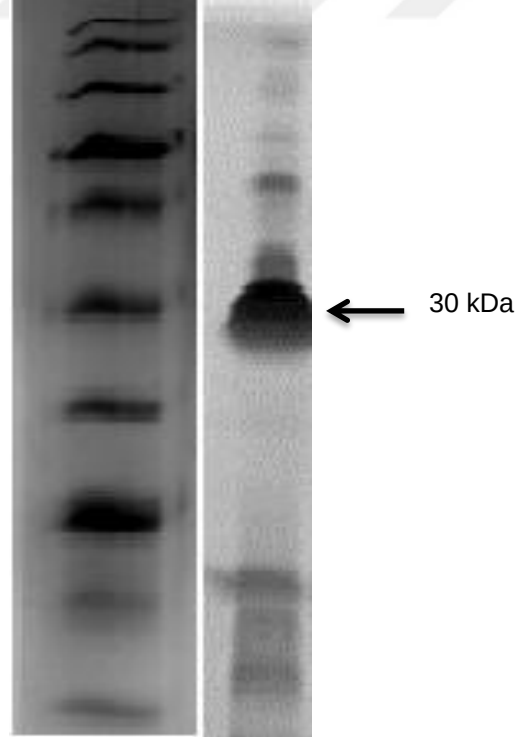
Pichia pastoris'ten rekombinant ekspanzin üretimi fermentasyon normlarına ve maksimum protein üretilen koşullara uyum gösterecek şekilde yürütülmüştür. Elde edilen verilerin ışığında fermentasyon ortam sıcaklığı 25°C ve ortam pH'sı 7 olarak ayarlanmıştır. Protein ekspresyonları çalkalamalı inkübatörde erlenmayerler içerisinde yapılmıştır.

İnkübatörde rekombinant protein üretimi esnasında toplam kuru hücre ağırlığı ve süpernatanttaki toplam protein miktarı takip edilmiştir. Süpernatant içerisindeki proteinler saflaştırıldıktan sonra SDS-PAGE vasıtasıyla ayrıştırılmış ve Western Blot analiziyle immünolojik tanımlanması yapılmıştır. Ekstraselüler olarak eksprese edilen proteinlerin analizi ve denemelerde kullanımı için süpernatant steril bir kaba alınmış ve -86°C'de dondurularak saklanmıştır.

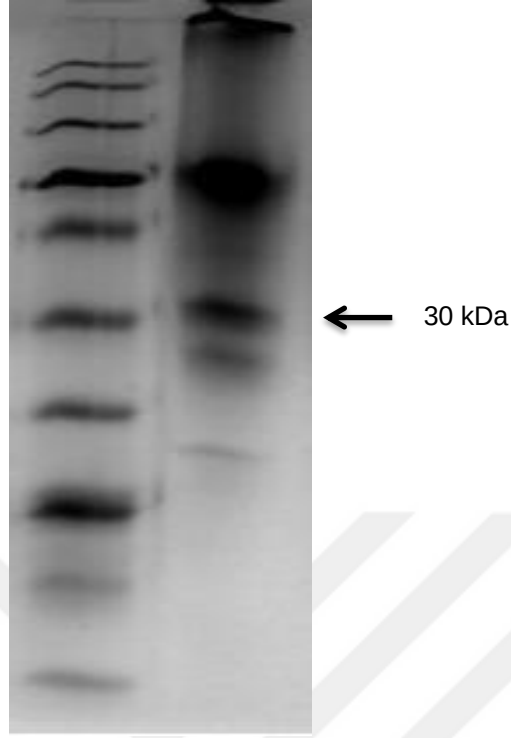
Rekombinant mayaların fermentasyon ortamlarından elde edilen süpernatantların SDS-PAGE sonuçları Şekil 4.25., 4.26., 4.27. ve 4.28.'de gösterildiği gibidir. Şekillerde verildiği haliyle dört farklı süpernatant'ın ayrıştırılması sonucunda da ekspanzin proteinlerinin moleküler ağırlıklarına karşılık gelen protein bandları gözlenmiştir. Gözlenen bantların ekspanzin proteinlerinin boyutlarına uygun olması nedeniyle rekombinant mayaların başarılı bir şekilde protein ekspresyonu yapabildikleri belirlenmiştir. *P. pastoris* mayaları çok az sayıda ekstraselüler protein üretmektedirler ve dolayısıyla bu mayaların fermentasyon ortamında ekstraselüler olarak üretilen rekombinant protein haricinde çok sayıda farklı protein bandı bulunması beklenmemektedir. Bu durum elde edilen dört SDS-PAGE görüntüsünde de beklenildiği şekliyle gözlenmiştir. SDS-PAGE görüntüleri incelendiğinde hem SMD 1168 hem de GS115 suşlarının sahip oldukları pPIC9K-Exp1 ve pHIL-S1-Exp1 vektörlerinin kontrolünde ekspanzin proteinlerinin boyutlarına uygun, 30 kDa, seviyelerde ekstraselüler protein üretme yeteneğinde bulundukları belirlenmiştir. Az sayıda ekstraselüler protein üretilmesi aynı zamanda proteinlerin saflaştırılmasını kolaylaştıran bir avantaj olarak da değerlendirilmiştir.



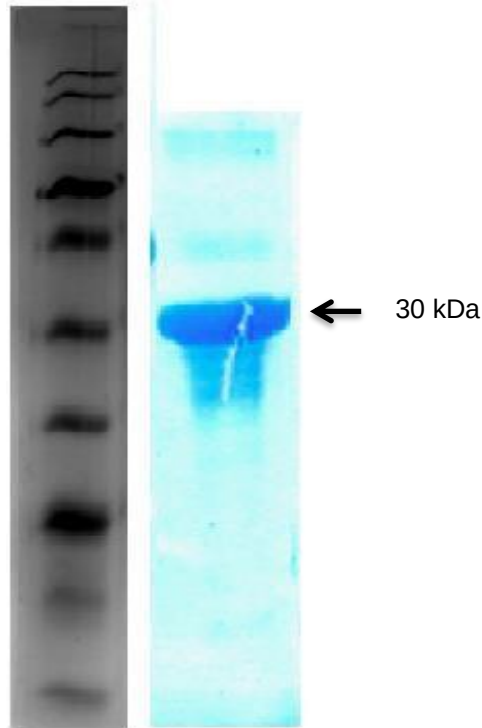
Şekil 4.25. pPIC9K-Exp1 vektörünü taşıyan SMD1168 hücrelerinin fermentasyon ortamından alınan süpernatantın SDS-PAGE görüntüsü



Şekil 4.26. pHIL-S1-Exp1 vektörünü taşıyan SMD1168 hücrelerinin fermentasyon ortamından alınan süpernatantın SDS-PAGE görüntüsü



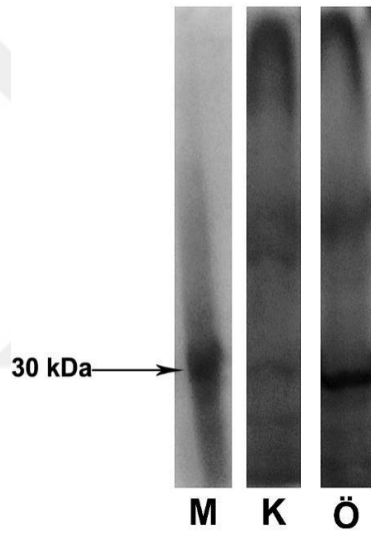
Şekil 4.27. pPIC9K-Exp1 vektörünü taşıyan GS115 hücrelerinin fermentasyon ortamından alınan süpernatantın SDS-PAGE görüntüsü



Şekil 4.28. pHIL-S1-Exp1 vektörünü taşıyan GS115 hücrelerinin fermentasyon ortamından alınan süpernatantın SDS-PAGE görüntüsü

4.10. *Pichia pastoris*'te Üretilen Rekombinant Ekspanzin Enziminin Saflaştırılması

Transgenik suşlardan elde edilen rekombinant ekspanzin enziminin saflaştırılması amacıyla suşlar 3 gün boyunca 225 rpm ve 30°C'de geliştirilmiştir. Inkübasyon sonunda pellet ve hücre birbirinden ayrıştırılmış ve elde edilen supernatant protein kaynağı olarak SDS-PAGE analizinde kullanılmıştır. Jelde yürütme işleminden sonar proteinler hızlı gümüş boyama ile görüntülenmiştir (Şekil 4.29.).



Şekil 4.29. Saflaştırılmış ve ultrafiltre edilmiş ham özütün protein profilinin SDS – PAGE yöntemi ile gözlemlenmesi

M: Marker.

K: *P. pastoris* GS115

Ö: *P. Pastoris* GS115 His⁺ - Mut⁺

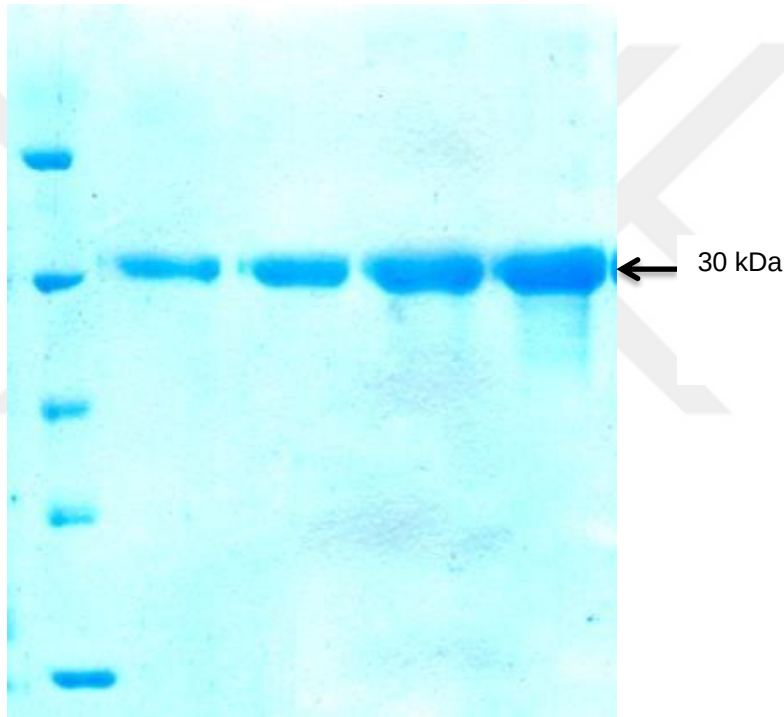
Elde edilen görüntüye göre control örneğinde herhangi bir bant gözlenmemiş olması ve transgenik GS115 suşuna ait supernatantın kullanıldığı kuyucukta 30 kDa' a karşılık gelen bölgede bant oluşmuş olması ayrıca bundan farklı bir boyutta bant oluşmamış olması transgenik suşlardan elde edilen rekombinant proteinin ekspanzin olduğunu doğrulamıştır.

Rekombinant ekspanzin proteinlerinin *P. pastoris*'teki ifadesinin araştırılması için LeExp1 proteinlerini üretme yeteneğinde olan mayalarda ilk olarak denemeler yapılmıştır. Elde edilen ham özütler Amicon ultrafiltrasyon hücreleri kullanılarak deriştirilmiş ve elde edilen protein çözeltileri %10'luk SDS-PAGE jelleri üzerinde ayrıştırılmıştır. Şekil 4.29.'da görüldüğü üzere birinci kuyucuk protein markörü,

ikinci kuyucuk negatif kontrol olarak kullanılan *P. pastoris* GS115 suşunun fermentasyonundan elde edilen özütü, üçüncü kuyucuk ise LeExp1 genini içeren rekombinant *P. pastoris*'in fermentasyon özütünü göstermektedir. Elde edilen verilere göre negatif kontrol örneğinin bulunduğu jel kanalının ekspanzin proteinlerinin yaklaşık boyutuna karşı gelen 30 kDa boyutunda herhangi bir protein bantı gözlenmemiştir. Bunun yanı sıra rekombinant *P. pastoris* mayalarının fermentasyonundan elde edilen özüt ise protein jeli üzerinde ayrıştırıldığında 30 kDa'luk marköre yakın boyutlarda negatif kontrol örneğinden farklı olarak bir protein bantının varlığı tespit edilmiştir. Şekil 4.29.'da elde edilen veriler rekombinat *P. pastoris* mayalarının negatif kontrollerden farklı olarak beklenen boyutlara uygun protein eksprese ettiğini göstermiştir. Bunun ötesinde farklı boyutlarda değişik protein bantlarının jel üzerinde bulunmaması proteinlerin diğer *Pichia pastoris*'e ait endojenik proteinlerle karışımının minimum düzeyde olmasını sağlamıştır. Bilindiği gibi *P. pastoris* ekstraselüler olarak sadece bir kaç tane protein salgılayabilmekte ve dolayısıyla bu protein ekspresyon sistemi vasıtasıyla ekstraselüler biçimde rekombinant protein üretilmesinin saf protein eldesinde kolaylık sağladığına işaret etmektedir. Dolayısıyla burada elde edilen sonuçlar ışığında amonyum sülfat çöktürmesi ve ultrafiltrasyon yardımıyla proteinlerin diğer safsızlıklardan uzaklaştırılması gerçekleştirilmiştir. Optimal koşullarda gerçekleştirilen inkübasyon sonrasında hücrelerin fermentasyon ortamından uzaklaştırılması 5.000 rpm, 4°C'de ve 30 dakika santrifüj edilerek sağlanmıştır. Ekstrasellüler rekombinant ekspanzinleri içeren ham ekstrakt ise %50-80 derişimlerdeki amonyum sülfat ile muamele edilerek aşamalı bir şekilde proteinlerin çökmesi sağlanmıştır ve çökelen proteinler 20.000 rpm, 4°C'de 20 dakika santrifüjlenerek elde edilmiş ve daha sonra da 50 mM Tris-HCl tamponunda çözündürülmüştür (Tuncer, 2008). Amonyum sülfat çökeltmesinden elde edilen örnekler, tuzların ve diğer küçük iyonların uzaklaştırılması için, protein çözeltisi 3 hacim aynı tampon kullanılarak 4°C'de, moleküler sınırı 10.000 Da olan membran kullanıldığı ultrafiltrasyon sistemiyle yıkanmıştır. Protein miktarları Bradford assay yöntemiyle hesaplanmıştır.

4.11. Rekombinant Ekspanzin Proteinlerinin Western Blot Yöntemiyle İmmunolojik Tanımlanması

Fermentasyon ortamından elde edilen 10 µg proteinleri %12'lik SDS-PAGE (Laemmli, 1970) ile ayrıştırıldıktan sonra Transblot hızlı protein aktarım sistemi (BIORAD) kullanılarak PVDF membranlarına aktarılmışlardır. Ekspanzin proteinlerinin tespiti bu proteinler için geliştirilmiş antikorlar vasıtasıyla yapılmıştır (Rose ve ark., 2000). Rekombinant ekspanzin proteinlerin Western-Blot analizi sonucunda elde edilen görüntü Şekil 4.30.'da verildiği gibidir.



Şekil 4.30. Fermentasyon ortamından izole edilen ekstraselüler *P. pastoris* proteinlerinin poliklonal ekspanzin antitadisi kullanılarak elde edilen western blot verisi

1. kuyucuk protein markörü, 2. kuyucuk GS115-pPIC9K-Exp1 maya hücre kültüründen elde edilen süpernatantın immunolojik tanımlanması, 3. kuyucuk GS115-pPHIL-S1-Exp1 maya hücre kültüründen elde edilen süpernatantın immunolojik tanımlanması, 4. kuyucuk SMD1168-pPHIL-S1-Exp1 maya hücre kültüründen elde edilen süpernatantın immunolojik tanımlanması, 5. kuyucuk SMD1168-pPIC9K-Exp1 maya hücre kültüründen elde edilen süpernatantın immunolojik tanımlanması. Rekombinant ekspanzin proteinlerinin tanımlanmasında domates ekspanzin

poliklonal antitadisi kullanilmistir.

4.12. Rekombinant *Pichia pastoris*'in Fermentasyon Ortaminda Protein Salgilama Yeteneğinin Arastirilmesi

Transgenik *Pichia pastoris* mayalarından rekombinant protein üretimi amacıyla 4 mg/mL düzeyinde antibiyotik dirençliliğine sahip kolonilerin kullanıldığı daha önce belirtilmişti. Bu amaçla GS115-pPIC9K-Exp1, GS115-pHIL-S1-Exp1, SMD1168-pPIC9K-Exp1 ve SMD1168-pHIL-S1-Exp1 suşlarından ekspresyonda kullanılmak üzere seçilimi yapılan koloniler önce BMG besiyerinde geliştirilerek belli bir konsantrasyona ulaştırılmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler santrifüj vasıtasıyla toplanarak süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücre pelleti rekombinant protein ekspresyonunun başlatılması amacıyla taze hazırlanmış BMM besiyerinde OD600 değeri 1.0 olacak şekilde çözündürülmüştür ve çalkalamalı inkübatörde, % 0.5 metanol konsantrasyonunda, 30°C'de dört gün boyunca protein ekspresyonu sağlanmıştır. Kültür ortamının metanol konsantrasyonu her 24 saatte bir %100 metanol eklenerek belli düzeyde tutulmuştur. Eklenen metanol miktarı, hücrelerin BMM ile çözündürülmesi aşamasında harcanan BMM miktarına göre tayin edilmiştir. BMM sarfiyatı bütün örnekler için ortalama olarak 190-240 mL arasında değişkenlik göstermiştir. Her örnek aynı oranda BMM harcanarak OD600 değeri 1.0'e ulaştırılmamıştır dolayısıyla örneklere eklenen metanol miktarları ayrı ayrı hesaplanarak fermentasyon boyunca her 24 saatte bir bu miktarlar protein ekspresyonunun indüklenmesi amacıyla kültür ortamına aktarılmıştır. Dört günlük ekspresyon denemesi süresince her 6 saatte bir fermentasyon ortamından örnekler alınarak süpernatant ve pellet birbirinden ayrıştırılmış ve muhafaza edilmiştir.

4.12.1. Transgenik *Pichia pastoris* mayalarının ekspresyon süresi boyunca kuru hücre ağırlıkları

Pichia pastoris maya genomunda proteaz A, proteaz B ve karboksipeptidaz olmak üzere üç adet önemli proteaz enzimini kodlayan gen bulunmaktadır ve bunların tamamı asidik proteazlardır. Proteaz A ve proteaz B enzimlerinden sorumlu genler sırasıyla *pep4* ve *prb1* şeklindedir. Rekombinant protein ekspresyonu

esnasında söz konusu enzimler, mayalar için optimum gelişim pH'sının altında yüksek aktivite göstererek hedef proteinlerin degradasyonuna neden olmaktadır (Qiu ve ark., 2016).

Bu çalışmada rekombinant protein üretimi amacıyla konakçı hücre olarak *P. pastoris*'in mutant suşlarından histidin üretimi geni (*his4*) inhibe edilmiş suşu GS115 ile proteaz A (*pep4*) ve proteaz B (*prb1*) enzimleri inhibe edilmiş SMD1168 suşu kullanılmıştır. GS115 suşu *P. pastoris* mayalarının rekombinant protein üretiminde en başarılı şekilde kullanılan ticari suşu olarak literatürdeki yerini almıştır (Byrne, 2015). SMD1168 suşu proteaz genleri inhibe edilmiş ve özellikle protein degradasyonuna karşı hassas proteinlerin rekombinant üretiminde oldukça başarılı şekilde kullanılan suşudur (Kelle ve ark., 2014; Zhou ve ark., 2014; Wang ve ark., 2014; Assiri ve ark., 2014).

Konakçı hücrelere hedef genin aktarılması amacıyla AOX1 promotörüne sahip pPIC9K ve pHIL-S1 vektörleri kullanılmıştır. Promotör seçimi hedef protein üretiminde kilit noktalardan birtanesidir. *P. pastoris* ekspresyon sisteminde yaygın kullanılan promotörler AOX1, GAP ve FLD1 şeklindedir (Qiu ve ark., 2016). AOX1 promotörü *P. pastoris* ekspresyon sisteminde en yaygın kullanıma sahip ayrıca yüksek verimde ekstraselüler protein üretimine olanak sağlayan bir promotör olarak literatürde yer edinmiştir.

pPIC9K ve pHIL-S1 vektörleri sırasıyla; içerisinde bulundukları hücrede üretilen proteinlerin besiyerine sentezlenmesini sağlayan α - mating factor ve PHO1 sinyal sekans dizilimlerine sahip vektörlerdir. Sekresyon sinyal sekansına sahip vektörlerin kullanımı ekspanzin proteinlerinin kültür ortamına aktarılmasını sağlamıştır ve *P. pastoris* mayalarının kendilerine özgü üretmiş oldukları protein miktarının çok düşük düzeyde olması neticesinde ortamdaki proteinlerin tamamına yakını ekspanzin proteinleri oluşturmuştur. Dolayısıyla vektör seçiminin sekresyon sinyal sekansına sahip ve *P. pastoris* ekspresyon sisteminde sıklıkla kullanılan vektörler arasından yapılması rekombinant üretim sonrasında saflaştırma işlemini kolaylaştırıcı bir basamak haline gelmiştir.

P. pastoris mayalarının rekombinant protein üretiminde yaygın kullanımının sebeplerinden bir tanesi hücrelerin gelişimi amacıyla gerekli besiyerinin kolaylıkla temin edilebilir ve düşük maliyetli olmasıdır. *P. pastoris* maya hücreleri gelişebilmek için tek bir karbon kaynağına ihtiyaç duymaktadır. Bunlar sorbitol, metanol, gliserol, glikoz vb şeklinde sayılabilir (Inan ve Meagher, 2001). Metanol, gliserol ve glikoz en yaygın kullanılan karbon kaynaklarıdır (Looser ve ark., 2014). Bu çalışmada rekombinant protein üretimi AOX1 promotörü kontrolünde gerçekleştirilmiştir ve AOX1 promotörü metanol varlığında yüksek seviyelere çıkmaktadır. Rekombinant protein üretimi süresince transgenik *P. pastoris* GS115-pPIC9K-Exp1, GS115-pHIL-S1-Exp1, SMD1168-pPIC9K-Exp1 ve SMD1168-pHIL-S1-Exp1 maya suşları %0.5 metanol varlığında geliştirilmiştir. Bilindiği gibi metanol mikroorganizmalar üzerinde toksik etki yaratan bir maddedir ve dolayısıyla AOX1 promotörünün kullanımı ile birlikte rekombinant protein üreitm çalışmaları boyunca muhtemel kontaminasyonlar önemli ölçüde bertaraf edilmiştir. Ayrıca metanol varlığında AOX1 promotörünün yüksek seviyelere çıkmasının bir sonucu olarak hücreler hızlı bir şekilde yüksek biyomass (hücre yoğunluğu) değerlerine ulaşmışlardır.

P. pastoris maya hücrelerinin 30°C'de maksimum hücre ağırlığına ulaştığı literatürdeki birçok kaynakta yer almıştır (Jahic ve ark., 2002; Byrne, 2015; Qiu ve ark., 2016; Salamin ve ark., 2010; Chen ve ark., 2015; Chahal ve ark., 2017). Ayrıca *P. pastoris* SMD1168 konakçı hücrelerinin rekombinant protein üretimi optimizasyonu üzerine yapılan bir çalışmada hücrelerin pH 6.0 ve 30°C'de optimum gelişim gösterdiği tespit edilmiştir (Qiu ve ark., 2016). Cereghino ve ark., (2002) tarafından *P. pastoris* konakçı hücrelerinin toplam kuru hücre ağırlığının belirlendiği çalışmada hücrelerin 100 g/L düzeyinin üzerinde gelişim gösterdiği kaydedilmiştir. Looser ve ark., (2015) AOX1 promotörünün kullanıldığı Mut⁺ fenotipine sahip hücrelerin Mut^S fenotipine sahip hücrelerden daha yüksek hücre ağırlığına ulaştığını tespit etmiştir. Bu durum metanolde geliştirilen hücrelerde AOX1 promotörünün yüksek aktivite göstermesi ve dolayısıyla da daha fazla hücre bölünmesinin bir sonucu olarak düşünülmektedir. Kobayashi ve ark. (2000) Mut⁺ fenotipine sahip hücrelerin 30°C'de metanol varlığında maksimum düzeyde gelişim gösterdiğini kayıt

altına almıştır. Kuru hücre konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla transgenik suşlara ait kültür ortamından ekspresyon süresi boyunca 24., 48., 72. ve 96. saatler sonunda örnek alımı yapılarak her bir transgenik suşa ait kuru hücre ağırlıkları belirlenmiştir. Çizelge 4.2.'de dört adet transgenik suşa ait beş örneğin 24., 48., 72., 96. saatler sonundaki kuru hücre ağırlıkları bir litrede gelişen gram miktar şeklinde (g/L) dönüştürülmüştür. Sonuçların daha net görülebilmesi amacıyla her transgenik suşa ait beş örnekten elde edilen en yüksek kuru hücre ağırlıkları ayrıca bir tablo haline getirilmiştir (Çizelge 4.3.) ve veriler grafik düzeninde incelenmiştir (Şekil 4.31.).



Çizelge 4.2. Transgenik suşlara ait 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki kuru hücre ağırlıkları (g/L)

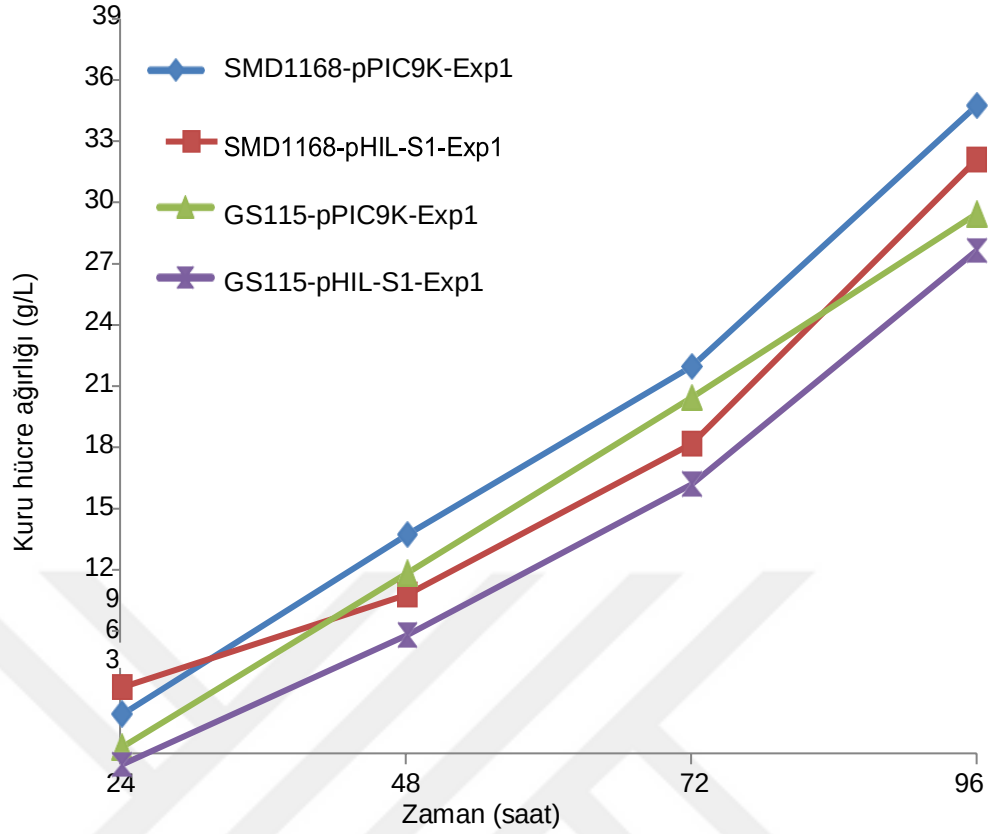
Transgenik Suş	Saat	Örnek No				
		1	2	3	4	5
SMD1168-pPIC9K-Exp1	24	5.2	6.4	4.5	6.6	6.3
	48	10.5	15.7	9.1	9.8	11.9
	72	21.2	18.3	24.4	22.4	23.8
	96	31.3	24.5	37.9	33.7	35.2
SMD1168-pHIL-S1-Exp1	24	5.2	7.8	4.6	6.2	5.2
	48	8.4	11.2	9.8	11.5	12.6
	72	14.6	20.4	17.8	19.6	19.7
	96	22.9	24.9	29.3	28.3	35.1
GS115-pPIC9K-Exp1	24	3.1	4.3	3.1	4.4	4.7
	48	8.3	8.5	13.7	9.6	11.2
	72	15.9	19.9	22.8	15.9	22.5
	96	29.6	31.5	32.3	30.6	31.7
GS115-pHIL-S1-Exp1	24	3.4	3.8	2.3	3.2	3.1
	48	8.9	10.5	9.5	8.4	10.2
	72	13.6	17.3	16.7	16.9	18.3
	96	30.4	27.6	28.3	26.2	25.6

Çizelge 4.2.'de görülebileceği üzere ekspresyon boyunca 24, 48, 72 ve 96. saatler sonunda her dört suşa ait kuru hücre ağırlıkları arasında büyük farklar olmamakla beraber maksimum hücre ağırlığına ulaşan transgenik suş SMD1168-pPIC9K-Exp1 suşu olmuştur. SMD1168-pPIC9K-Exp1 suşu 96. saatin sonunda 37.9 g/L düzeyinde kuru hücre ağırlığına ulaşmıştır. SMD1168-pHIL-S1-Exp1 suşu ekspresyon süresi sonunda 35.1 g/L kuru hücre ağırlığına sahip iken; GS115-pPIC9K-Exp1 ve GS115-pHIL-S1-Exp1 suşları sırasıyla 32.3 g/L ve 30.4 g/L düzeyine kuru hücre ağırlığına ulaşmıştır. Aynı çizelgede yer alan değerlere göre transgenik suşlara ait kuru hücre ağırlığının özellikle 72. saatin sonunda yaklaşık iki kat arttığı gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.3. Dört adet transgenik suşa ait 24, 48, 72 ve 96. saatlerde maksimum kuru hücre ağırlık değerleri (g/L)

Trangenik Suş	Zaman (Saat)			
	24	48	72	96
SMD1168-pPIC9K-Exp1	6.4	15.7	24.4	37.9
SMD1168-pHIL-S1-Exp1	7.8	12.6	20.4	35.1
GS115-pPIC9K-Exp1	4.7	13.7	22.8	32.3
GS115-pHIL-S1-Exp1	3.8	10.5	18.3	30.4

Çizelge 4.3.'de SMD1168-pPIC9K-Exp1, SMD1168-pHIL-S1-Exp1 GS115-pPIC9K-Exp1 ve GS115-pHIL-S1-Exp1 suşlarına ait 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki maksimum kuru hücre ağırlıkları verilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü gibi SMD1168-pHIL-S1-Exp1 transgenik suşu hızla gelişim göstererek 24 saat sonunda en yüksek kuru hücre ağırlığına sahip olmuştur. GS115-pPIC9K-Exp1 suşu 24-48. saat zaman aralığında kuru hücre ağırlığında yaklaşık üç kat artış sağlayan gelişim göstermiştir. GS115-pHIL-S1-Exp1 suşuna ait kuru hücre ağırlığı ilk 72 saatte yavaş şekilde artarken 72-96. saat aralığında yaklaşık birbuçuk kat artış göstererek ekspresyon sonunda 30.4 g/L düzeyine ulaşmıştır. SMD1168-pPIC9K-Exp1 suşu 24 saatten sonra hızlı şekilde gelişim göstermiş ve 96 saat sonunda 37.9 g/L düzeyinde kuru hücre ağırlığına ulaşarak ekspresyon süresi sonunda maksimum gelişime sahip transgenik suş olmuştur.



Şekil 4.31. SMD1168-pPIC9K-Exp1, SMD1168-pHIL-S1-Exp1, GS115-pPIC9K-Exp1 ve GS115-pHIL-S1-Exp1 transgenik suşlarına ait maksimum kuru hücre ağırlıklarının zamana bağlı değişimi

Şekil 4.31.'de görüldüğü gibi 24, 48, 72 ve 96. saatlerde maksimum kuru hücre ağırlığına ilk olarak SMD1168-pPIC9K-Exp1 transgenik suşu ulaşmıştır. SMD1168-pHIL-S1-Exp1 suşunun 24 saat sonunda diğer üç suşa göre en yüksek değere ulaşarak hızlı bir şekilde büyümeye başladığı ancak 24 saatten sonra gelişimin yavaşladığı ve 48. saat sonunda SMD1168-pPIC9K-Exp1 ve GS115-pPIC9K-Exp1 suşlarından daha düşük kuru hücre ağırlığına sahip olduğu görülmektedir.

4.12.2. Transgenik *Pichia pastoris* mayaları tarafından üretilen toplam protein miktarları (mg/L)

4 mg/mL antibiyotik dirençliliğine sahip kolonilerin kullanıldığı ekspresyon çalışmaları sonucunda yapılan Bradford analizlerine göre her bir transgenik maya hücresine ait beş adet örneğin 24., 48., 72. ve 96. saatler sonunda üretmiş olduğu

maksimum protein miktarları birim hacimde çözünen toplam protein (mg/L) şeklinde tespit edilmiştir ve Çizelge 4.4.'de gösterilmiştir. Sonuçların daha net görülebilmesi amacıyla her transgenik suşa ait beş örnekten elde edilen en yüksek toplam protein miktarları ayrıca bir tablo haline getirilmiştir (Çizelge 4.5.) ve veriler grafik düzeninde incelenmiştir (Şekil 4.32.).

Rekombinant ekspanzin üretiminde kullanılan suşlardan biri olan SMD1168 *P. pastoris*'in proteaz A (*pep4*) ve proteaz B (*prb1*) genleri inhibe edilmiş mutant suşudur. Proteaz genleri inhibe edilmiş suşlarla yapılan rekombinant protein üretim denemelerinde proteaz aktivitesinin olmamasına bağlı olarak diğer suşlara göre daha yüksek miktarda protein üretimi beklenmektedir. Jönsson ve ark., (1997) tarafından yapılan rekombinant lakkaz üretim çalışmasında GS115 ve SMD1168 suşları kullanılmıştır ve SMD1168 suşlarından yaklaşık iki kat daha fazla protein miktarı elde edilmiştir.

Çizelge 4.4. Transgenik suşlardan elde edilen toplam protein miktarları (mg/L)

Transgenik Suş	Zaman (Saat)	Örnek No				
		1	2	3	4	5
SMD1168-pPIC9K-Exp1	24	55	62	24	58	47
	48	96	84	6	75	50
	72	192	161	184	206	164
	96	279	216	265	283	214
SMD1168-pHIL-S1-Exp1	24	24	36	4	35	46
	48	78	65	54	40	62
	72	183	194	89	81	71
	96	216	252	192	184	154
GS115-pPIC9K-Exp1	24	42	33	16	25	18
	48	56	41	28	54	29
	72	92	86	67	77	64
	96	101	97	76	213	84
GS115-pHIL-S1-Exp1	24	32	24	14	19	21
	48	31	34	24	54	43
	72	56	61	65	77	81
	96	88	91	189	86	92

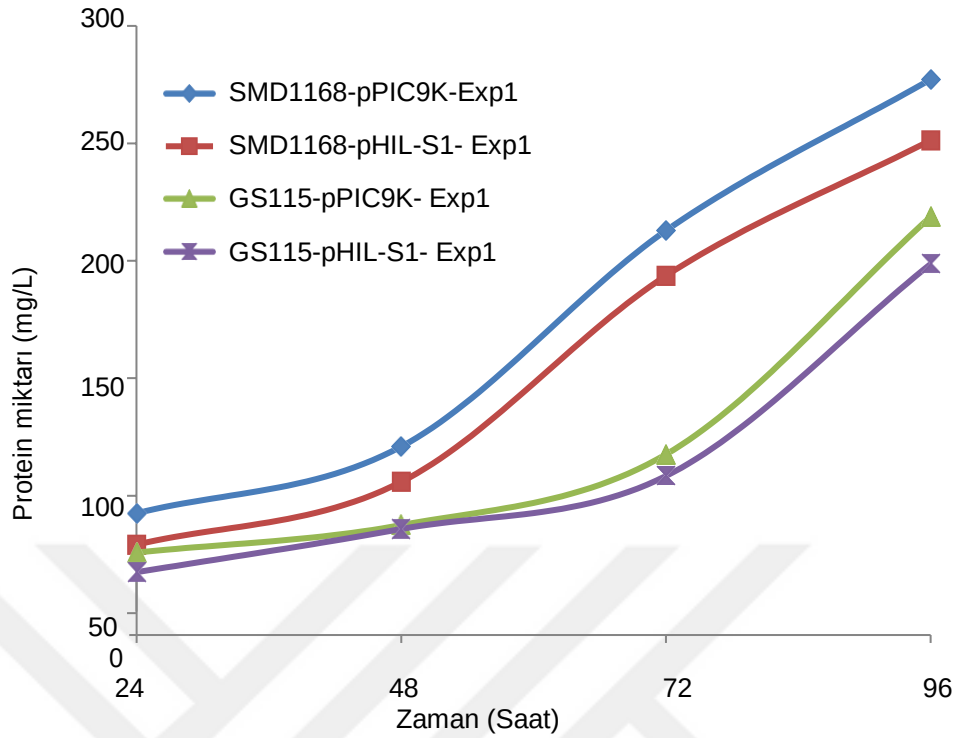
Transgenik bir suşa ait toplam kuru hücre ağırlığı ile protein üretim miktarının ilişkili olduğu ve kuru hücre ağırlığı yüksek suşlardan daha fazla protein elde edildiği literatürde yer almaktadır (Looser ve ark., 2015; Jungo ve ark., 2007). Özellikle rekombinant protein üretiminde kullanılmak üzere geliştirilen ticari suşlar daha hızlı gelişme ve dolayısıyla da daha fazla rekombinant protein üretimi eğiliminde olmaktadır (Gasser ve ark., 2008; Glick, 1995; Heyland ve ark., 2011). Çizelge 4.4.'den görüldüğü gibi ekspresyon süresi sonunda maksimum protein miktarı SMD1168-pPIC9K-Exp1 transgenik suşlarından elde edilmiştir. SMD1168-pPIC9K-Exp1 suşu aynı zamanda en yüksek kuru hücre ağırlığına ulaşmış (Çizelge 4.2.) ve

buna bağlı olarak da maksimum protein üretimini gerçekleştirmiş olduğu düşünölmektedir.

Çizelge 4.5. Dört adet transgenik suştan 24, 48, 72 ve 96. saatlerde üretilen toplam protein miktarları (mg/L)

Trangenik Suş	Zaman (Saat)			
	24	48	72	96
SMD1168-pPIC9K-Exp1	62	96	206	283
SMD1168-pHIL-S1- Exp1	46	78	183	252
GS115-pPIC9K- Exp1	42	56	92	213
GS115-pHIL-S1- Exp1	32	54	81	189

Proteaz genleri inhibe edilmiş suş kullanımı (SMD1168), *P. pastoris* hücrelerinde maksimum verimle protein üretimini sağlayan alfa mating faktör sinyal sekans bölgesine sahip pPIC9K vektörünün kullanımı, ekspresyon sıcaklığının SMD1168 ve GS115 suşları için optimum değer olan 30°C olarak belirlenmesi gibi faktörler dahilinde maksimum düzeyde protein miktarı SMD1168-pPIC9K-Exp1 suşlarından elde edilmiştir. SMD1168-pPIC9K-Exp1 suşuna ait süpernatanttan Bradford assay denemeleri ile saptanan toplam protein konsantrasyonu ilk 24 saatin sonunda 62 mg/L düzeyinde olmuştur ve 96 saatlik ekspresyon süresi boyunca artarak devam etmiştir. Oransal olarak 48 saat sonunda düşük miktarda protein üretimi gözlenirken 72 ve 96. saatler sonunda yaklaşık ikişer kat artan protein miktarı 96 saat sonunda 283 mg/L olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.32. Transgenik suşlardan elde edilen toplam protein miktarlarının zamana bağlı değişim grafiği

İlk 24 saat sonunda SMD1168-pHIL-S1-Exp1 suşunun kuru hücre ağırlığı diğer transgenik suşlara göre yüksek düzeyde olmasına rağmen maksimum protein SMD1168-pPIC9K-Exp1 suşu tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu farklılığın sinyal sekans dizilimi ile ilgili olduğu düşünülmektedir. pHIL-S1 vektörünün sahip olduğu *PHO1* sinyal sekans dizilimi *P. pastoris* maya hücrelerinin natif sinyal sekans bölgesidir ve *P. pastoris* ekspresyon sisteminde alfa mating faktörden sonra en fazla kullanılan sinyal sekans dizilimidir. Yapılan çalışmalarda alfa mating faktör sinyal sekans dizilimine sahip pPIC9K vektörü ile pHIL-S1 vektörü kullanılarak elde edilenden daha yüksek oranda ekstraselüler protein elde edilmiştir (Bieszke ve ark., 1999; Raemaekers ve ark., 1999). SMD1168-pHIL-S1-Exp1 suşundan elde edilen protein miktarı 48 ve 72. saatler arasında büyük oranda artış göstermiştir ve ekspresyon süresi sonunda 252 mg/L düzeyinde toplam protein ürettiği görülmüştür. GS115-pPIC9K-Exp1 ve GS115-pHIL-S1-Exp1 suşundan ilk 72 saat boyunca düşük miktarlarda protein üretimi sağlanırken ekspresyonun son 24 saatinde hızlı bir artış gözlemlenmiştir ve protein miktarları yaklaşık iki kat artış göstermiştir. GS115-pHIL-S1-Exp1 suşlarına ait kuru hücre ağırlığı miktarının da benzer şekilde ilk 72

saatte düşük iken son 24 saatte hızla arttığı Çizelge 4.2.'de görülmektedir. Ekspresyon süresi sonunda GS115-pPIC9K-Exp1 suşundan 213 mg/L; GS115-pHIL-S1-Exp1 suşundan ise 189 mg/L düzeyinde toplam protein üretimi sağlanmıştır.

4.13. Elde Edilen Rekombinant Ekspanzin Enzimlerinin Enzimatik Aktivitesinin Belirlenmesi

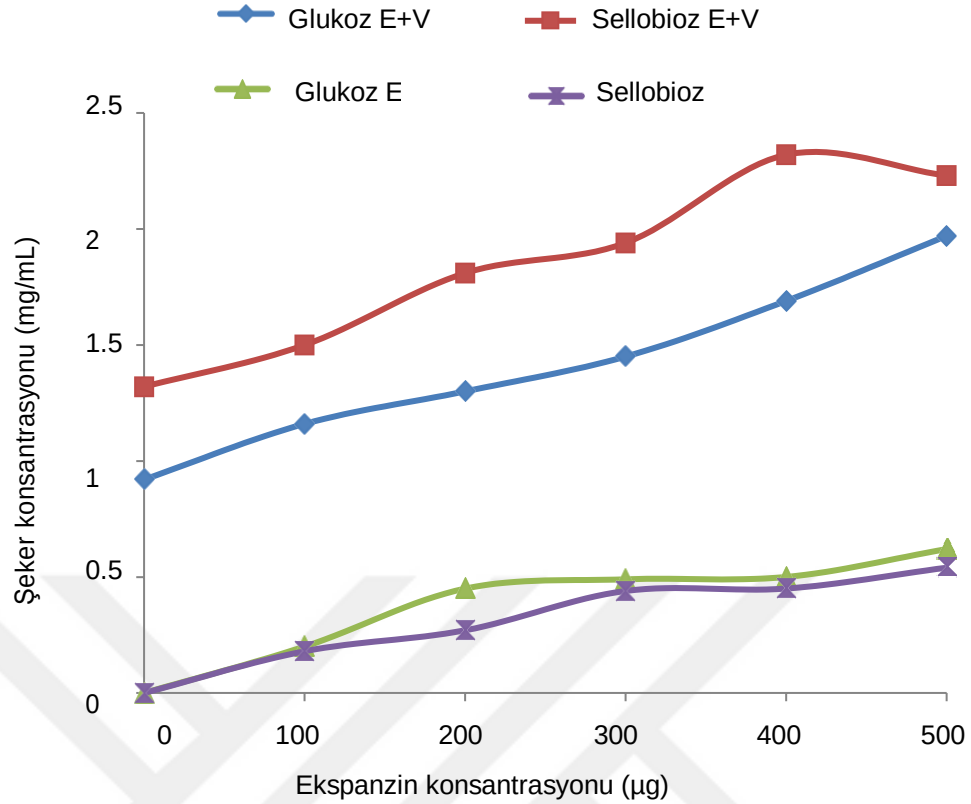
HPLC analizlerinde SMD1168- pPIC9K-Exp1, SMD1168-pHIL-S1-Exp1, GS115-pPIC9K-Exp1, GS115-pHIL-S1-Exp1 transgenik suşlarından elde edilen rekombinant ekspanzin proteinleri ayrı ayrı kullanılmıştır. Artan ekspanzin oranlarına göre filtre kağıdı üzerinde hidroliz etkisinin arttığı ve artan oranlarda glukoz ve sellobioz oluştuğu tespit edilmiştir.

SMD1168-pPIC9K-Exp1 transgenik suşundan elde edilen rekombinant ekspanzin proteininin 0-500 µg arasında değişen miktarlarda kullanımı ile gerçekleştirilen HPLC analiz sonuçları Çizelge 4.6.'da verilmiştir ve Şekil 4.33.'de grafik düzeninde incelenmiştir.

Çizelge 4.6. Sabit oranda vegazim (5 FPU) ile artan miktarda eklenen rekombinant ekspanzinin (0-500 µg SMD1168-pPIC9K-Exp1) filtre kağıdı üzerine hidrolizinin etkisi

Ekspanzin (µg/g filter paper)	Ekspanzin + Vegazim (5 FPU)		Ekspanzin	
	Glukoz (mg/mL)	Sellobioz (mg/mL)	Glukoz (µg/mL)	Sellobioz (µg/mL)
0,0	0,92 ^a	1,32 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
100	1,16 ^b	1,50 ^b	0,20 ^b	0,18 ^a
200	1,30 ^b	1,81 ^c	0,45 ^c	0,27 ^a
300	1,45 ^b	1,94 ^c	0,49 ^c	0,44 ^b
400	1,69 ^c	2,32 ^d	0,50 ^d	0,45 ^b
500	1,97 ^d	2,23 ^d	0,62 ^d	0,54 ^c

*Aynı sütunda değişik harflerle gösterilen örnekler arasındaki fark önemlidir (p<0,05)



Şekil 4.33. Artan oranlarda SMD1168-pPIC9K-Exp1 ekspanzin (µg ekspanzin/g filtre kağıdı) yanında sabit miktarda ticari vegazim enzimi eklenerek filtre kağıdından ekstrakte edilen glukoz ve sellobioz miktarları

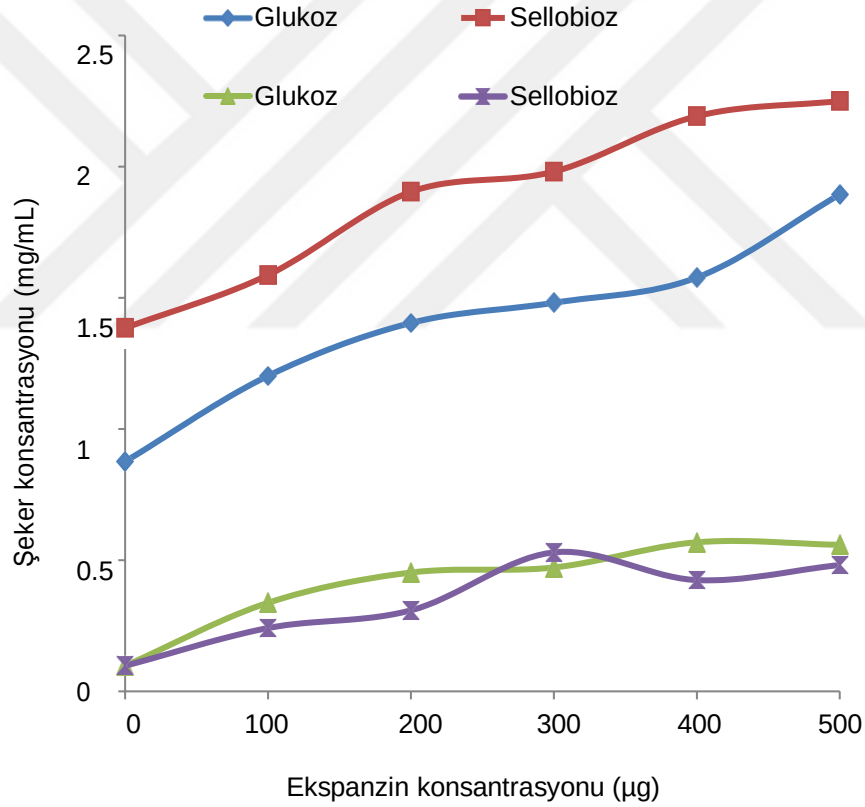
Şekil 4.33.'de SMD1168-pPIC9K-Exp1 suşundan elde edilen rekombinant ekspanzin miktarındaki artışa paralel olarak filtre kağıdından ekstrakte edilen glukoz ve sellobioz miktarları grafiksel olarak gösterilmiştir. Sadece vegazim içeren uygulamada 0.92 mg glukoz ve 1.32 mg sellobioz olduğu gözlenirken, 500 µg ekspanzin içeren örnekte 0.62 mg glukoz ve 0.54 mg sellobioz oluşumu gözlenmiştir. Buna karşılık 500 µg ekspanzin ve vegazim içeren uygulamada 1.97 mg glukoz 2.23 mg sellobioz tespit edilmiştir.

SMD1168-pHIL-S1-Exp1 transgenik suşundan elde edilen rekombinant ekspanzin proteininin 0-500 µg arasında değişen miktarlarda kullanımı ile gerçekleştirilen HPLC analiz sonuçları Çizelge 4.7.'de verilmiştir ve Şekil 4.34.'de grafik düzeninde incelenmiştir.

Çizelge 4.7. Sabit oranda vegazim (5 FPU) ile artan miktarda eklenen rekombinant ekspanzinin (0-500µg SMD1168-pHIL-S1-Exp1) filtre kağıdı üzerine hidrolizinin etkisi

Ekspanzin (µg/g filter paper)	Ekspanzin + Vegazim (5 FPU)		Ekspanzin	
	Glukoz (mg/mL)	Sellobioz (mg/mL)	Glukoz (µg/mL)	Sellobioz (µg/mL)
0,0	0,81 ^a	1,34 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
100	1,15 ^b	1,55 ^b	0,25 ^b	0,15 ^a
200	1,36 ^b	1,88 ^c	0,37 ^c	0,22 ^a
300	1,44 ^b	1,96 ^c	0,39 ^c	0,45 ^b
400	1,54 ^c	2,18 ^d	0,49	0,34 ^b
500	1,87 ^d	2,24 ^d	0,48 ^d	0,40 ^c

*Aynı sütunda değişik harflerle gösterilen örnekler arasındaki fark önemlidir (p<0,05)



Şekil 4.34. Artan oranlarda SMD1168-pHIL-S1-Exp1 ekspanzin (µg ekspanzin/g filtre kağıdı) yanında sabit miktarda ticari vegazim enzimi eklenerek filtre kağıdından ekstrakte edilen glukoz ve sellobioz miktarları

Şekil 4.34.'de SMD1168-pHIL-S1-Exp1 suşundan elde edilen rekombinant ekspanzin miktarındaki artışa paralel olarak filtre kağıdından ekstrakte edilen glukoz ve sellobioz miktarları grafiksel olarak gösterilmiştir. Sadece vegazim içeren

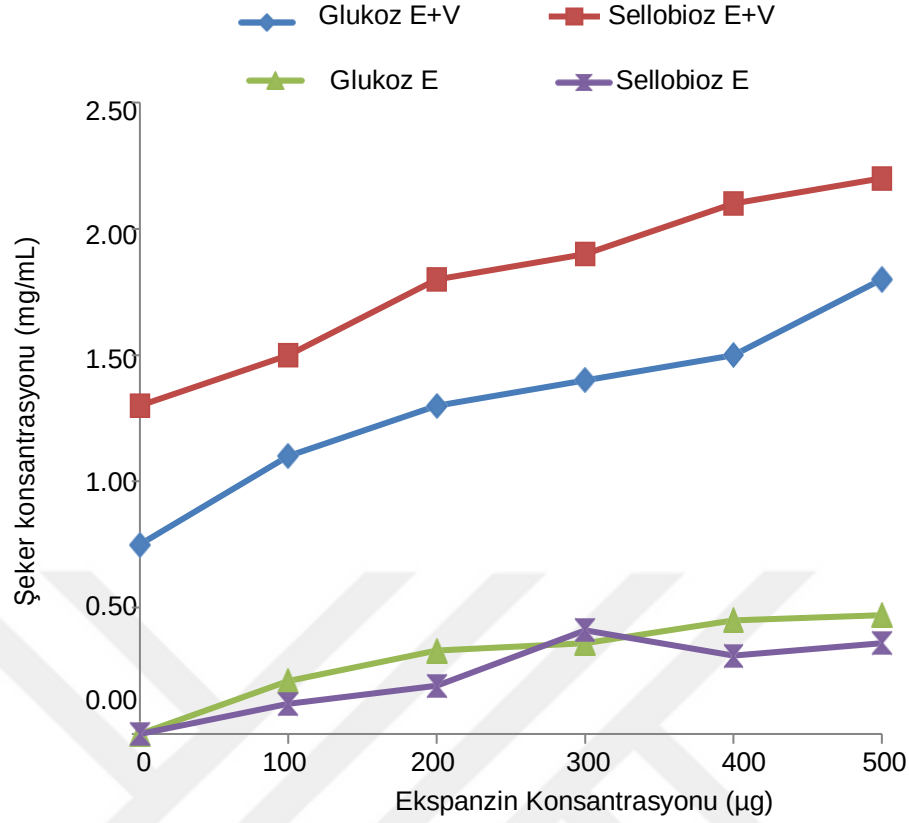
uygulamada 0.81 mg glukoz ve 1.34 mg sellobioz oluşurken, 500 µg ekspanzin içeren örnekte 0.48 mg glukoz ve 0.40 mg sellobioz oluşumu gözlenmiş, buna karşılık yine 500 µg ekspanzin ve vegazim içeren uygulamada 1.87 mg glukoz tespit edilmiştir.

GS115-pPIC9K-Exp1 transgenik suşundan elde edilen rekombinant ekspanzin proteininin 0-500 µg arasında değişen miktarlarda kullanımı ile gerçekleştirilen HPLC analiz sonuçları Çizelge 4.8.'de verilmiştir ve Şekil 4.35.'de grafik düzeninde incelenmiştir.

Çizelge 4.8. Sabit oranda vegazim (5 FPU) ile artan miktarda eklenen rekombinant ekspanzinin (0-500 µg GS115- pPIC9K-Exp1) filtre kağıdı üzerine hidrolizinin etkisi

Ekspanzin (µg/g filter paper)	Ekspanzin + Vegazim (5 FPU)		Ekspanzin	
	Glukoz (mg/mL)	Sellobioz (mg/mL)	Glukoz (µg/mL)	Sellobioz (µg/mL)
0.0	0.75 ^a	1.30 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
100	1.10 ^b	1.50 ^b	0.21 ^b	0.12 ^a
200	1.30 ^b	1.80 ^c	0.33 ^c	0.19 ^a
300	1.40 ^b	1.90 ^c	0.36 ^c	0.41 ^b
400	1.50 ^c	2.10 ^d	0.45 ^d	0.31 ^b
500	1.80 ^d	2.20 ^d	0.47 ^d	0.36 ^c

*Aynı sütunda değişik harflerle gösterilen örnekler arasındaki fark önemlidir (p<0,05)



Şekil 4.35. Artan oranlarda GS115-pPIC9K-Exp1 ekspanzin (µg ekspanzin/g filtre kağıdı) yanında sabit miktarda ticari vegazim enzimi eklenerek filtre kağıdından ekstrakte edilen glukoz ve sellobioz miktarları

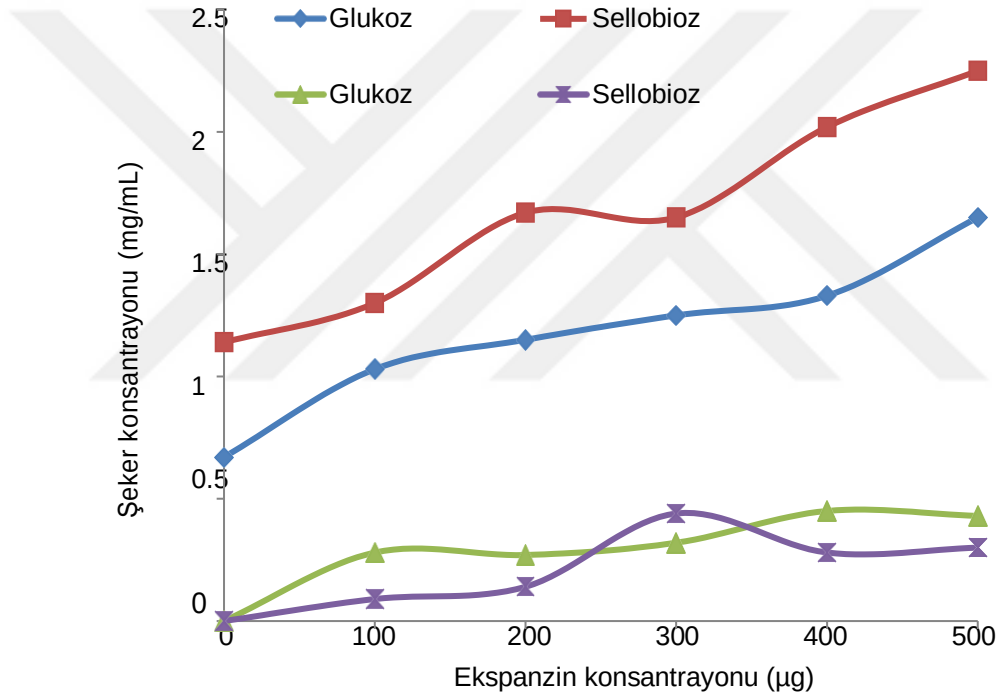
Şekil 4.35.'de GS115-pPIC9K-Exp1 suşuna ait ekspanzin miktarındaki artışa paralel olarak filtre kağıdından ekstrakte edilen glukoz ve sellobioz miktarları grafiksel olarak gösterilmiştir. Sadece vegazim içeren uygulamada 0.75 mg glukoz oluşurken 500 µg ekspanzin içeren örnekte 0.47 mg glukoz oluşumu gözlenmiştir. buna karşılık yine 500 µg ekspanzin ve vegazim içeren uygulamada 1.80 mg glukoz tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, sabit oranda ekspanzin üzerine eklenen Vegazim enzimi sadece ekspanzin uygulanan örneklere göre filtre kağıdının hidrolizi üzerine daha fazla etki göstermiş oransal olarak vegazim üzerine ekspanzin proteinlerinin sinerjistik etkisi gözlenmiştir.

GS115-pHIL-S1-Exp1 transgenik suşundan elde edilen rekombinant ekspanzin proteininin 0-500 µg arasında değişen miktarlarda kullanımı ile gerçekleştirilen HPLC analiz sonuçları Çizelge 4.9.'da verilmiştir ve Şekil 4.36.'da grafik düzeninde incelenmiştir.

Çizelge 4.9. Sabit oranda vegazim (5 FPU) ile artan miktarda eklenen rekombinant ekspanzinin (0-500µg GS115-pHIL-S1-Exp1) filtre kağıdı üzerine hidrolizinin etkisi

Ekspanzin (µg/g filter paper)	Ekspanzin + Vegazim (5 FPU)		Ekspanzin	
	Glukoz (mg/mL)	Sellobioz (mg/mL)	Glukoz (µg/mL)	Sellobioz (µg/mL)
0.0	0.65 ^a	1.14 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
100	1.03 ^b	1.30 ^b	0.28 ^b	0.09 ^a
200	1.15 ^b	1.67 ^c	0.27 ^c	0.14 ^a
300	1.25 ^b	1.65 ^c	0.32 ^c	0.44 ^b
400	1.33 ^c	2.02 ^d	0.45 ^d	0.28 ^b
500	1.65 ^d	2.25 ^d	0.43 ^d	0.30 ^c

* Aynı sütunda değişik harflerle gösterilen örnekler arasındaki fark önemlidir (p<0.05)



Şekil 4.36. Artan oranlarda GS115-pHIL-S1-Exp1 ekspanzin (µg ekspanzin/g filtre kağıdı) yanında sabit miktarda ticari vegazim enzimi eklenerek filtre kağıdından ekstrakte edilen glukoz ve sellobioz miktarları

Şekil 4.36.'da GS115-pHIL-S1-Exp1 suşuna ait rekombinant ekspanzin miktarındaki artışa paralel olarak filtre kağıdından ekstrakte edilen glukoz ve sellobioz miktarları grafiksel olarak gösterilmiştir. Sadece vegazim içeren uygulamada 0.65 mg glukoz ve 1.14 mg sellobioz oluşurken, 500 µg ekspanzin içeren örnekte 0.43 mg glukoz ve 0.30 mg sellobioz oluşumu gözlenmiştir. Buna karşılık 500 µg ekspanzin ve vegazim içeren uygulamada 1.65 mg glukoz ve 2.25 mg

sellobioz oluştuğu tespit edilmiştir.

Uygulamalarda elde edilen sonuçlara göre sabit oranda ekspanzin üzerine eklenen vegazim enzimi sadece ekspanzin uygulanan örneklere göre filtre kağının hidrolizi üzerine daha fazla etki göstermiş ve oransal olarak vegazim üzerine ekspanzin proteinlerinin sinerjistik etkisi gözlenmiştir. Buradan yola çıkılarak rekombinant ekspanzin proteinlerinin selülozik etkilerinin olduğu bitkisel dokularda sinerjistik etkiyle hidrolizi artırdığı. aynı zamanda selülozik ticari enzimlerle paralel olarak da kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

SMD1168 proteaz üretimi engellenmiş mutant suşundan elde edilen rekombinant ekspanzin proteinlerinin kullanıldığı filtre kağı denemelerinde GS115 suşlarından elde edilen rekombinant ekspanzin proteinlerinin kullanıldığı denemelere göre daha yüksek miktarlarda glikoz ve sellobioz elde edildiği grlmştir. Bu durum. SMD1168 suşunun proteaz aktivitesinin olmamasının bir sonucu olarak daha yüksek kalitede rekombinant ekspanzin üretmiş olması şeklinde açıklanabilmektedir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Pichia pastoris mayaları gıda, yem, ilaç, insan sağlığı vb. alanlarda kullanılan proteinlerin in vitro ortamda başarılı ve yüksek miktarlarda üretimini sağlayan önemli bir konakçı organizma olarak otuz yılı aşkın süredir bilimsel araştırmalarda yer edinmiştir.

Rekombinant ekspresyon çalışmaları; hedef genin izole edilerek uygun bir vektöre klonlanması, hedef geni taşıyan vektörlerin konakçı hücreye transfer edilmesi ve konakçı hücrelerden hedef proteinin eksprese edilmesi şeklinde üç önemli basamaktan oluşmaktadır ve temel amaç genellikle hedef protein üretim miktarının artırılmasıdır. Bu kapsamda her ne kadar rekombinant protein üretimi üç ana basamaktan oluşsa da proses boyunca hedef protein miktarını arttırmaya yönelik farklı kilit noktaların varlığı günümüze kadar yapılan çalışmalar neticesinde anlaşılmıştır. Bunlar; hedef proteinin hücre dışına salgılanmasını sağlayan sinyal sekans dizilimlerinin seçimi, yüksek aktiviteye sahip promotör kullanımı, konakçı hücrenin hedef protein degradasyonuna neden olan proteaz enzimlerinden arındırılmış olması, ekspresyon sıcaklığının optimum düzeyde tutulması ve benzeri şekilde sayılabilir.

Bu çalışmada *P. pastoris* ekspresyon sistemi kullanılarak *Solanum lycopersicum* (domates) kaynaklı ekspanzin proteinlerinin rekombinant üretimi gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında;

- *Lycopersicum esculentum* (domates) bitkilerinden ekspanzin proteinini kodlayan gen dizilimi (LeExp1) izole edilmiştir.
- LeExp1 geni pPIC9K ve pHIL-S1 vektörlerine uygun enzim vasıtasıyla klonlanmıştır ve vektörler *E.coli* JM109 hücrelerinde çoğaltılmıştır.
- Plazmidler SMD1168 ve GS115 konakçı suşlarına elektroporasyon yolu ile transfer edilmiştir.

- Polimeraz Zincir Reaksiyonu neticesinde toplam dört adet rekombinant protein üretimine hazır hale getirilmiş suş elde edilmiştir.
- Transgenik suşlardan fermentasyon ortamında rekombinant ekspanzin üretimi sağlanmıştır.
- Reverse transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile transgenik suşların hedef proteini üretme yeteneği incelenmiştir.
- SDS-PAGE ve Western-Blot analizleri doğrultusunda üretilen proteinin hedef ekspanzin proteini olduğunun doğrulanması yapılmıştır.
- Biyomass tayini ile rekombinant ekspanzin üretimi esnasında transgenik suşlara ait kuru hücre ağırlıkları belirlenmiştir.
- Bradford assay denemeleri ile transgenik suşların rekombinant protein üretim miktarları tespit edilmiştir.
- Elde edilen rekombinant ekspanzin proteinlerinin meyve suyu endüstrisinde kullanımının araştırılması amacıyla selülozik enzimlerle sinerjistik etkileri incelenmiştir.

Proteaz enzimleri inhibe edilmiş suş, AOX1 promotörü, optimum ekspresyon sıcaklık değeri, metanol kullanımına bağlı mikrobiyal kontaminasyonun minimum düzeylere indirilmesi ve ekstraselüler protein üretiminde yüksek verim sağlayan vektör kullanımı gibi faktörler ekspresyon süresi boyunca transgenik suşların maksimum düzeyde gelişim gösterebilmesi ve protein üretebilmesi için uygun koşulları oluşturmuştur.

Bu çalışma ile;

- İlk kez bitkisel bir kaynaktan izole edilen ekspanzin proteinlerinin rekombinant üretimi gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte *Pichia pastoris* ekspresyon sisteminde ilk kez ekspanzin proteini üretimi gerçekleştirilmiştir.
- İki farklı suş ve vektör kullanılarak genetik düzeyde optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda yüksek miktar ve aktiviteye sahip ekspanzin proteini üretebilen transgenik maya hücreleri elde edilmiştir.
- Alfa mating faktör sinyal sekans diziliminin asit fosfataz sinyal dizilimine göre

daha yüksek miktarda proteini hücre ortamına salgıladığı tespit edilmiştir.

- SMD1168 suşları ile GS115 suşlarına göre 1.4 kat daha fazla rekombinant ekspanzin proteini üretilmiştir.
- Literatürde de yer aldığı gibi ekspanzin proteinlerinin tek başına selülozik aktiviteye sahip olmadığı ancak diğer selülozik enzimlerle sinerjistik etkiye sahip olduğu yapılan uygulamalarla ortaya konulmuştur.
- Rekombinant ekspanzin üretim çalışmaları sonucunda maksimum miktarda ekspanzin proteini proteaz genleri inhibe edilmiş SMD1168 suşu ile pPIC9K vektörünün kombinasyonu olan SMD1168-pPIC9K-Exp1 transgenik suşundan üretilmiştir ve protein miktarı 283 mg/L olarak hesaplanmıştır.
- Uygulamalarda elde edilen sonuçlara göre rekombinant ekspanzin proteinlerinin literatürde de yer aldığı gibi selülozik etkilerinin olduğu, bitkisel dokularda sinerjistik etkiyle hidrolizi artırdığı, aynı zamanda selülozik ticari enzimlerle paralel olarak da kullanılabileceği ortaya konulmuştur.
- *P. pastoris* ekspresyon sisteminde proteaz enzimleri inhibe edilmiş suş ve α -mating faktör sinyal sekansına sahip pPIC9K vektör kullanımının rekombinant protein üretim miktarını arttırdığı tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- AHMAD., M., HIRZ, M., PİCHLER., H., and SCHWAB, H., 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(12): 5301–5317.
- ASSİRİ, A.S., EL-GAMAL, B.A., and HAFEZ, E.E., 2014. Production of recombinant streptokinase from *Streptococcus pyogenes* isolate and its potential for thrombolytic therapy. *Saudi Med Journal*, 35 (12): 1482–1488.
- BEY, M., BERRİN, J.-G., POİDEVİN, L., and SİGOİLLOT, J.-C., 2011. Heterologous expression of *Pycnopus cinnabarinus* cellobiose dehydrogenase in *Pichia pastoris* and involvement in saccharification processes. *Microbiology Cell Fact*, 10 (113): 1-15.
- BİESZKE, J.A., SPUDİCH, E.N., SCOTT, K.L., BORKOVİCH, K.A, and SPUDİCH, J.L., 1999. A eukaryotic protein. NOP-1. binds retinal to form an archaeal rhodopsin-like photochemically reactive pigment. *Biochemistry*, 38: 14138–14145.
- BORODİNA, I., JENSEN, B.M., WAGNER, T., HACHEM, M.A., SONDERGAARD, I., POULSEN, L.K, and HERRERA-ESTRELLA, A., 2011. Expression of enzymatically inactive wasp venom phospholipase A1 in *Pichia pastoris*. *PLoS One*, 6 (6): 21267.
- BRAKE, A.J., MERRYWEATHER, J.P., COİT, D.G., HEBERLEİN, U.A., MASİARZ, F.R., MULLENBACH, G.T., URDEA, M.S., VALENZUELA, P., and BARR, P.J., 1984. Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Science*, 81: 4642–4646.
- BRUMMELL, D.A., HARPSTER, M.H., CİVELLO, P.M., PALYS, J.M., BENNETT, A.B, and DUNSMUIR, P., 1999. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell*, 11: 2203–2216.
- BYRNE, B., 2015. *Pichia pastoris* as an expression host for membrane protein structural biology. *Current Opinion in Structural Biology*, 32: 9-17.
- CEREĞHİNO, J.L, and CREGG, J.M., 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev*, 24: 45–66.
- CEREĞHİNO, G. P. L., SUNGA, A. J., CEREĞHİNO, J. L., and CREGG, J. M., 2001. Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Genetic Engineering*, 23: 157-169.
- CEREĞHİNO, G.P.L., CEREĞHİNO, J.L., ILGEN, C., and CREGG, J.M., 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 329-332.
- CHAHAL, S., WEİ, P., MOUA, P., PARK, S.P.J., KWON, J., PATEL, A., VU, A. T., CATOLİCO, J.A., TSAİ, Y.F.T., SHAHEEN, N., CHU, T.T., TAM, V., KHAN, Z., JOO, H.H., XUE, L., CEREĞHİNO, J.L., TSAİ, J.W., and CEREĞHİNO, G.P.L., 2017. Structural characterization of the α -mating factor prepro-peptide for secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Gene*, 598: 50-62.

- CHATANI, E., TANIMIZU, N., UENO, H., and HAYASHI, R., 2000. Expression of soluble bovine pancreatic ribonuclease A in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. *Bioscientists Biotechnology Biochemistry*, 64 (11): 2437–2444.
- CHEN, L., ZHOU, X., FAN, W., and ZHANG, Y., 2008. Expression, purification and characterization of a recombinant *Lipomyces starkey* dextranase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression Purification*, 58 (1): 87–93.
- CHEN, X.A., ISHIDA, N., TODAKA, N., NAKAMURA, R., and MARUYAMA, J., 2010. Promotion of efficient saccharification of crystalline cellulose by *Aspergillus fumigatus* Sw01. *Applied Environment Microbiology*, 76: 2556–2561.
- CHEN, P., FU, X., NG, T.B., and YE, X.-Y., 2011. Expression of a secretory α -glucosidase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and its characterization. *Biotechnology Letters*, 33 (12): 2475–2479.
- CHEN, X., MENG, K., SHI, P., BAI, Y., LUO, H., HUANG, H., YUAN, T., YANG, P., and YAO, B., 2012. High-level expression of a novel *Penicillium* endo-1,3(4)- β -D-glucanase with high specific activity in *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 39 (6): 869–876.
- CHOI, J.H., and LEE, S.Y., 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 64: 625–35.
- CHOU, C.P., 2007. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 76: 521–32.
- CLARE, J.J., ROMANOS, M.A., RAYMENT, F.B., ROWEDDER, J.E., SMITH, M.A., PAYNE, M.M., SREEKRISHNA, K., and HENWOOD, C.A., 1991. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene*, 105: 205–212.
- COSGROVE, D.J., 1998. Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiology*, 118: 333–339.
- COSGROVE, D.J., 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407: 321–326.
- CREGG, J.M., VEDVICK, T.S., and RASCHKE, W.C., 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *BioTechnology*, 11: 905–10.
- CREGG, J.M., CEREGHINO, J.L., SHI, J., and HIGGINS, D.R., 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 16: 23–52.
- DALE, C., ALLEN, A., and FOGARTY, S., 1999. *Pichia pastoris*: a eukaryotic system for the large-scale production of biopharmaceuticals. *Biopharm*, 12(11): 36–42.
- DELROÏSSE, J.-M., DANNAU, M., GILSOUL, J.-J., EL MEJDOUB, T., DESTAIN, J., PORTETELLE, D., THONART, P., HAUBRUGE, E., and VANDENBOL, M., 2005. Expression of a synthetic gene encoding a *Tribolium castaneum* carboxylesterase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression Purification*, 42 (2): 286–294.
- DEMAIN, A.L., and VAISHNAV, P., 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27 (3): 297–306.
- DUFOUR, E., TAM, W., NÄGLER, D.K., STORER, A.C., and MÉNARD R., 1998.

- Synthesis of amidrazones using an engineered papain nitrile hydratase. *FEBS Lettuce*, 433 (1-2):78–82.
- DURAND, H., and CLANET, M., 1988. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. *Enzyme Microb Technology*, 10: 341–6.
- FALCH, E., 1991. Industrial enzymes developments in production and application. *Biotechnology Advances*, 9: 643–58.
- FERRARA, M.A., SEVERINO, N.M., MANSURE, J.J., MARTINS, A.S., OLIVEIRA, E.M., SIANI, A.C., PEREIRA, N., TORRES, F.A., and BON, E.P., 2006. Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. *Enzyme Microbiology Technology*, 39 (7): 1457–1463.
- FIEROBE, H.P., MİRGORODSKAYA, E., FRANDSEN, T.P., ROEPSTORFF, P., and SVENSSON, B., 1997. Overexpression and characterization of *Aspergillus awamori* wild-type and mutant glucoamylase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: comparison with wild-type recombinant glucoamylase produced using *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger* as hosts. *Protein Expression Purification*, 9 (2):159–170.
- FİRİDİN, Ş., 2010. Rekombinant DNA Teknolojisi. *Yunus Araştırma Bülteni*, 10 (3).
- GAO, Z., MAUROSSET, L., LEMOİNE, R., YOO, S-D., VAN NOCKER, S. and LOESCHER, W., 2003. Cloning. expression. and characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues. *Plant Physiology*, 131:1566–1575.
- GASSER, B., SALOHEIMO, M., RINAS, U., DRAGOSITS, M., RODRÍGUEZ-CARMONA, E., and BAUMANN, K., 2008. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microbiology Cell Fact*, 7: 11–29.
- GELLISON, G., JANOWICZ, Z.A., WEYDEMANN, U., MELBER, K., STRASSER, A.W.M., and HOLLENBERG, C.P., 1992. High-level expression of foreign genes in *Hansenula polymorpha*. *Biotechnology Advances*, 10: 179–89.
- GERNGROSS, TU., 2004. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nat Biotechnol*, 22: 1409–14.
- GERSTORFEROVÁ, D., FLIEDROVÁ, B., HALADA, P., MARHOL, P., KREN, V., and WEIGNEROVÁ, L., 2012. Recombinant-l-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* in selective trimming of rutin. *Process Biochemistry*, 47 (5): 828–835.
- GLEESON, M.A., WHITE, C.E., MEININGER, D.P., and KOMIVES, E.A., 1998. Generation of protease-deficient strains and their use in heterologous protein expression. *Methods Molecular Biology*, 103: 81–94.
- GLICK, B.R., 1995. Metabolic load and heterologous gene-expression. *Biotechnology Advances*, 13: 247–261.
- GOODRICK, J.C., XU, M., FINNEGAN, R., SCHILLING, B.M., SCHIAVI, S., HOPPE, H., and WAN, N.C., 2001. High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system. *Biotechnology Bioengineering*, 74 (6): 492–497.
- GUO, J.-P., and MA, Y., 2008. High-level expression. purification and characterization of recombinant *Aspergillus oryzae* alkaline protease in *Pichia*

- pastoris*. Protein Expression Purification, 58 (2): 301–308.
- HAMILTON, S.R., BOBROWICZ, P., BOBROWICZ, B., DAVIDSON, T.C., and LI, H., 2006. Production of complex human glycoproteins in yeast. Science, 301: 1244–1246.
- HARRISON, P.E., MCQUEEN-MASON, S.J., and MANNING, K., 2001. Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. Journal of Exp Bot, 52: 1437–1446.
- HE, M., WU, D., WU, J., and CHEN, J., 2014. Enhanced expression of endoinulinase from *Aspergillus niger* by codon optimization in *Pichia pastoris* and its application in inulooligosaccharide production. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, 41 (1): 105–114.
- HEYLAND, J., FU, J.A., BLANK, L.M., and SCHMID, A., 2011. Carbon metabolism limits recombinant protein production in *Pichia pastoris*. Biotechnology Bioengineering, 108: 1942–1953.
- HIGGINS, D. R., and CREGG, J. M., 1998. Introduction to *Pichia pastoris*. *Pichia* Protocols of the series Methods in Molecular Biology, 103: 1- 15.
- HODGSON, J., 1994. The changing bulk biocatalyst market. BioTechnology, 12: 789–90.
- HUY, N.D., THIYAGARAJAN, S., CHOI, Y.-E., KIM, D.-H., and PARK, S.-M., 2013. Cloning and characterization of a thermostable endo-arabinanase from *Phanerochaete chrysosporium* and its synergistic action with endo-xylanase. Bioprocess Biosystematic Engineering, 36 (6): 677–685.
- JEZ, J. M., 2016. Revisiting protein structure. function. and evolution in the genomic era. Journal of Invertebrate Pathology, 142 (2017): 11-15.
- JIANG, X., CHEN, P., YIN, M., and YANG, Q., 2013. Constitutive expression. purification and characterisation of pectin methylesterase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* for potential application in the fruit juice industry. J. Science of Food Agriculture, 93 (2): 375–381.
- JOYE, I.J., BELIËN, T., BRIJS, K., PROOST, P., SOETAERT, W., and DELCOUR, J.A., 2010. Characterisation of the first wheat (*Triticum aestivum* L.) nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase resembling mammalian counterparts. Journal of Cereal Scientists, 51 (3): 326–336.
- JUNGO, C., MARISON, I., and VON STOCKAR, U., 2007. Regulation of alcohol oxidase of a recombinant *Pichia pastoris* Mut⁺ strain in transient continuous cultures. Journal of Biotechnology, 130: 236–246.
- KAEMMUANGMOON, J., KILASO, M., LEARTSAKULPANICH, U., KIMURA, K., KIMURA, A., and CHANCHAO, C., 2013. Expression of a secretory -glucosidase II from *Apis cerana indica* in *Pichia pastoris* and its characterization. BMC Biotechnology, 13 (1): 16-22.
- KANG, H.K., YUN, S.I., LIM, T.Y., XIA, Y.-M., and KIM, D., 2011. Cloning of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* and its expression in *Pichia pastoris*. Food Science Biotechnology, 20 (1): 277–281.
- KATROLIA, P., YAN, Q., JIA, H., LI, Y., JIANG, Z., and SONG, C., 2011. Molecular cloning and high-level expression of a-galactosidase gene from *Paecilomyces aeruginus* in *Pichia pastoris*. Journal of Molecular Catalyse, 69 (3-4): 112–119.
- KELLE, S., ZELENKA, K., and KRINGS, U., 2014. Expression of soluble recombinant lipoxygenase from *Pleurotus sapidus* in *Pichia pastoris*. Protein

- Expression Purification, 95: 233–239.
- KERFF, F., AMOROSO, A., HERMAN, R., SAUVAGE, E., and PETRELLA, S., 2008. Crystal structure and activity of *Bacillus subtilis* YoaJ (EXLX1). a bacterial expansin that promotes root colonization. *Proc Natl Acad Science*, 105: 16876–16881.
- KİM, E.S., LEE, H.J., BANG, W.G., CHOİ, I.G., and KİM, K.H., 2009. Functional characterization of a bacterial expansin from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 102: 1342–1353.
- KİM, I.J., KO, H.J., KİM, T.W., NAM, K.H., and CHOİ, I.G., 2013. Binding characteristics of a bacterial expansin (BsEXLX1) for various types of pretreated lignocellulose. *Applied Microbiology Biotechnology*, 97: 5381–5388.
- KİTTL, R., MUEANGTOOM, K., GONAUS, C., KHAZANEH, S.T., SYGMUND, C., HALTRICH, D., and LUDWIG, R., 2012. A chloride tolerant laccase from the plant pathogen ascomycete *Botrytis aclada* expressed at high levels in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnology*, 157 (2): 304–314.
- KOBAYASHI, K., KUWAE, S., OHYA, T., OHDA, T., OHYAMA, M., and TOMOMITSU, K., 2000. High level secretion of recombinant human serum albumin by fed-batch fermentation of the methylotrophic yeast. *Pichia pastoris*. based on optimal methanol feeding strategy. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 90: 280–288.
- KURTZMAN, C.P., 2009. Biotechnological strains of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 36: 1435–1438.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- Lİ, H., ZHANG, L., CUI, Y., LUO, X., XUE, C., and WANG, S., 2013a. Expression of soluble recombinant transglutaminase from *Zea mays* in *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 29 (5): 939–947.
- Lİ, Y., ZHANG, L., DİNG, Z., and SHİ, G., 2013b. Constitutive expression of a novel isoamylase from *Bacillus lentus* in *Pichia pastoris* for starch processing. *Process Biochemistry*, 48 (9): 1303–1310.
- LİN, H., SHEN, Q., ZHAN, J-M., WANG, Q., and ZHAO, Y-H., 2013. Evaluation of Bacterial Expansin EXLX1 as a Cellulase Synergist for the Saccharification of Lignocellulosic Agro-Industrial Wastes. *PlosOne*, 8: 1-8.
- LİNG, Z., MA, T., Lİ, J., DU, G., KANG, Z., and CHEN, J., 2012. Functional expression of trypsin from *Streptomyces griseus* by *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 39 (11): 1651–1662.
- LİU, Z.W., YİN, H.X., Yİ, X.P., ZHANG, A.L., LUO, J.X., ZHANG, T.Y., FU, C.Y., ZHANG, Z.H., SHEN, J.C., and CHEN, L.P., 2012. Constitutive expression of barley -amylase in *Pichia pastoris* by high-density cell culture. *Mol. Biol. Rep*, 39 (5): 5805–5810.
- LİU, M-Q., DAI, X-J., BAI, L-F., and XU, X., 2014. Cloning, expression of *Aspergillus niger* JL-15 endo-polygalacturonase A gene in *Pichia pastoris* and oligo-galacturonates production. *Protein Expression Purification*, 94: 53–59.
- MALDONADO, LMTP., 2007. Optimization of culture conditions for a synthetic

- gene expression in *Escherichia coli* using response surface methodology: the case of human interferon beta. *Biomolecular Engineering*, 24: 217–222.
- MCQUEEN-MASON, S.J., DURACHKO, D.M., and COSGROVE, D.J., 1992. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell*, 4: 1425–1433.
- MELLITZER, A., WEIS, R., GLIEDER, A., and FLICKER, K., 2012. Expression of lignocellulolytic enzymes in *Pichia pastoris*. *Microb. Cell Fact*, 11. 61.
- MENG, Y., ZHAO, M., YANG, M., ZHANG, Q., HAO, J., and MENG, Y., 2014. Production and characterization of recombinant glucose oxidase from *Aspergillus niger* expressed in *Pichia pastoris*. *Lettuce Applied Microbiology*, 58 (4): 393–400.
- MERGULHAO, F.J.M., SUMMERS, D.K., and MONTEIRO, G.A., 2005. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*, 23: 177–202.
- MERTENS, J.A., and BOWMAN, M.J., 2011. Expression and characterization of fifteen *Rhizopus oryzae* 99-880 polygalacturonase enzymes in *Pichia pastoris*. *Current Microbiology*, 62 (4): 1173–1178.
- MİNNİNG, S., SCHMİDT-DANNERT, C., and SCHMİD, R.D., 1998. Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. *Journal of Biotechnology*, 66 (2-3): 147–156.
- MORROW, JR KJ., 2007. Improving protein production processes. *Gen Eng News*, 27(5): 50–41.
- MUELLER, R., LUNIAK, N., and ESCHMANN, K., 2009. Recombinant Preparation of Selected Bromelain Fractions, (WO2009033536 A1).
- LODHI, M.A., YE, G.N., WEEDEN, N.F., and REISCH, B.I., 1994. A Simple and Efficient Method for DNA Extraction from Grapevine Cultivars and Vitis Species. *Plant Molecular Biology*, 12 (1): 6-13.
- OKA, C., TANAKA, M., MURAKI, M., HARATA, K., SUZUKI, K., and JIGAMI, Y., 1999. Human lysozyme secretion increased by alpha-factor pro-sequence in *Pichia pastoris*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 63: 1977–1983.
- OLEDZKA, G., DABROWSKI, S., and KUR, J., 2003. High-level expression, secretion, and purification of the thermostable aqualysin I from *Thermus aquaticus* YT-1 in *Pichia pastoris*. *Protein Expression Purification*, 29 (2): 223–229.
- PÉREZ-FUENTES, C., CRISTINA RAVANAL, M., and EYZAGUIRRE, J., 2014. Heterologous expression of a *Penicillium purpurogenum* pectin lyase in *Pichia pastoris* and its characterization. *Fungal Biology*, 118 (5-6): 507–515.
- QIU, Z., GUO, Y., BAO, X., HAO, J., SUN, G., PENG, B., and BI, W., 2016. Expression of *Aspergillus niger* glucose oxidase in yeast *Pichia pastoris* SMD1168. *Protein Expression Purification*, 998-1005.
- QUIROZ-CASTANEDA, R.E., MARTÍNEZ-ANAYA, C., CUERVO-SOTO, L.I., SEGOVIA, L., and FOLCH-MALLOL, J.L., 2011. Loosenin, a novel protein with cellulose-disrupting activity from *Bjerkandera adusta*. *Microb Cell Fact*, 10: 8.
- RAEMAEKERS, R.J., DE MURO, L., GATEHOUSE, J.A., and FORDHAM-SKELTON, A.P., 1999. Functional phytohemagglutinin (PHA) and *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) expressed in *Pichia pastoris* correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E

- signal peptide. *Eur J Biochemistry*, 265: 394–403.
- ROMANOS, M., 1995. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high level gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*, 6: 527–533.
- ROSE, J.K.C., LEE, H.H., and BENNETT, A.B., 1997. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening regulated. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 5955–5960.
- ROSE, J.K.C., COSGROVE, D.J., ALBERSHEIM, P., DARVILL, A.G., and BENNETT, A.B., 2000. Detection of expansin proteins and activity during tomato fruit ontogeny. *Plant Physiol*, 123: 1583–1592.
- SALAMÍN, K., SRIRANGANADANE, D., LÉCHENNE, B., JOUSSON, O., and MONOD, M., 2010. Secretion of an endogenous subtilisin by *Pichia pastoris* strains GS115 and KM71. *Appl. Environ. Microbiology*, 76 (13): 4269–4276.
- SALOVOURI, I., MAKAROW, M., RAUVALA, H., KNOWLES, J., and KÄÄRIÄINEN, L., 1987. Low molecular weight high-mannose type glycans in a secreted protein of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *BioTechnology*, 5: 152–6.
- SCORER, C.A., CLARE, J.J., MCCOMBIE, W.R., ROMANOS, M.A., and SREEKRISHNA, K., 1994. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Biotechnology*, 12: 181–184.
- SHI, X. L., MEI-QING, F., JIAN, S., ZHI-HUI, S., JIANG, Z., and PEI, Z., 2007. High-level expression and purification of recombinant human catalase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression Purification*, 54 (1): 24–29.
- SHI, B., ZENG, L., SONG, H., SHI, Q., and WU, S., 2010. Cloning and expression of *Aspergillus tamarii* FS132 lipase gene in *Pichia pastoris*. *Int. Journal of Molecular Science*, 11 (6): 2373–2382.
- SHILOACH, J., and FASS, R., 2005. Growing *E. coli* to a high cell density a historical perspective on method development. *Biotechnol Advances*, 23: 345–57.
- SLÁMOVÁ, K., BOJAROVÁ, P., GERSTORFEROVÁ, D., FLIEDROVÁ, B., HOFMEISTEROVÁ, J., FIALA, M., POMPACH, P., and KREN, V., 2012. Sequencing, cloning and high-yield expression of a fungal -N-acetylhexosaminidase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression Purification*, 82 (1): 212–217.
- SPADIUT, O., ROSSETTI, L., DIETZSCH, C., and HERWIG, C., 2012. Purification of a recombinant plant peroxidase produced in *Pichia pastoris* by a simple 2-step strategy. *Protein Expression Purification*, 86 (2): 89–97.
- SPOHNER, S.C., MULLER, H., QUITMANN, H., and CZERMAK, P., 2015. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 202: 118–134.
- SUWANNARANGSEE, S., BUNTERNGSOOK, B., ARNTHONG, J., PAEMANEE, A., and THAMCHAIPENET, A., 2012. Optimisation of synergistic biomass-degrading enzyme systems for efficient rice straw hydrolysis using an experimental mixture design. *Bioresour Technology*, 119: 252–261.
- SWARTZ, JR., 1996. *Escherichia coli* recombinant DNA technology. In: Neidhardt FC. editor. *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* American Society of Microbiology Press, (2): 1693–711.

- SWARTZ, JR., 2001. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Current Opinion Biotechnology*, 12: 195–201.
- TERPE, K., 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology Biotechnology*, 72: 211–23.
- THILL, G.P., DAVIS, G.R., STILLMAN, C., HOLTZ, G., BRIERLY, R., ENGEL, M., BUCKHOLTZ, R., KENNEY, J., PROVOW, S., VEDVICK, T., and SIEGEL, R.S., 1990. Positive and negative effects of multicopy integrated expression vectors on protein expression in *Pichia pastoris*. In: *Proceedings of the Sixth International Symposium on the Genetics of Microorganisms*, 2: 477–490.
- TSCHOPP, J.F., SVERLOW, G., KOSSON, R., CRAIG, W., and GRINNA, L., 1987. High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast. *Pichia Pastoris*. *National Biotechnology*, 5 (12): 1305–1308.
- TUNCER, M., 2008. Protein Saflaştırma 1: Kromatografik Teknikler. Mersin Üniversitesi Yayınları. Yayın No:14.
- UDAKA, S., and YAMAGATA, H., 1994. Extremely efficient protein secretion system in *Bacillus brevis*. *Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications*, 71–9.
- WANG, Y., LIANG, Z.H., ZHANG, Y.S., YAO, S.Y., and XU, Y.G., 2001. Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotechnology Bioengineering*, 73: 74–9.
- WANG, Y., TANG, R., TAO, J., GAO, G., and WANG, X., 2011. Quantitative investigation of non-hydrolytic disruptive activity on crystalline cellulose and application to recombinant swollenin. *Applied Microbiology Biotechnology*, 91: 1353–1363.
- WANG, S., LI, P., and SU, J., 2014. Characterization and expression of glucosamine-6-phosphate synthase from *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*, 36(10): 2023–2028.
- WARD, P.P., PIDDLINGTON, C.S., CUNNINGHAM, G.A., ZHOU, X., WYATT, R.D., and CONNEELY, O.M., 1995. A system for production of commercial quantities of human lactoferrin: a broad spectrum natural antibiotic. *Biotechnology*, 13: 498–503.
- WARD, O.P., QIN, W.M., HANJOON, J.D., and SINGH, E., 2006. Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Adv Appl Microbiology*, 58: 1–75.
- WERTEN, M.W.T., VAN DEN BOSCH, T.J., WIND, R.D., MOOIBROEK, H., and DE WOLF, F.A., 1999. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeasts*, 15: 1087–96.
- WONG, M.S., WU, S., CAUSEY, T.B., BENNETT, G.N., and SAN, K.Y., 2008. Reduction of acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures for increased recombinant protein production. *Metab Engineering*, 10: 97–108.
- WU, K.Y., HUANG, S.H., DING, S., ZHANG, Y.K., CHEN, G.G., and LIANG, Z.Q., 2010. Expression, purification and characterization of recombinant-glucosidase in *Pichia pastoris*. *Folia Microbiology*, 55 (6): 582–587.
- XIONG, A.S., YAO, Q.H., PENG, R.H., HAN, P.L., CHENG, Z.M., and LI, Y., 2005. High level expression of a recombinant acid phytase gene in *Pichia pastoris*. *Journal of Applied Microbiology*, 98 (2): 418–428.

- XU, B., YANG, Y.J., and HUANG, Z.X., 2006A. Cloning and overexpression of gene encoding the pullulanase from *Bacillus naganoensis* in *Pichia pastoris*. Journal of Microbiology Biotechnology, 16(8): 1185–1191.
- XU, X., KASHIMA, O., SAITO, A., AZAKAMI, H., and KATO, A., 2014. Structural and functional properties of chicken lysozyme fused serine-rich heptapeptides at the C-terminus. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 68(6): 1273–1278.
- YOSHIMASU, M.A., AHN, J.-K., TANAKA, T., and YADA, R.Y., 2002. Soluble expression and purification of porcine pepsinogen from *Pichia pastoris*. Protein Expression Purification, 25 (2): 229–236.
- ZHANG, J., WU, D., LI, Z., CHEN, S., CHEN, J., and WU, J., 2009. Expression of *Paenibacillus macerans* cyclodextrin glycosyltransferase in *Pichia pastoris* and *Bacillus subtilis*. Journal Biotechnology. 25 (12): 1948–1954.
- ZHANG, C., YAO, J., ZHOU, C., MAO, L., ZHANG, G., and MA, Y., 2013. The alkaline pectate lyase PEL168 of *Bacillus subtilis* heterologously expressed in *Pichia pastoris* is more stable and efficient for degumming ramie fiber. BMC Biotechnology, 13: 26.
- ZHONG, X., PENG, L., ZHENG, S., SUN, Z., REN, Y., DONG, M., and XU, A., 2004. Secretion, purification, and characterization of a recombinant *Aspergillus oryzae* tannase in *Pichia pastoris*. Protein Expression Purification, 36 (2): 165–169.
- ZHOU, X., YU, Y., and TAO, J., 2014. Production of LYZL6, a novel human c-type lysozyme, in recombinant *Pichia pastoris* employing high cell density fed-batch fermentation. Journal of Bioscience Bioengineering, 118(4): 420–425.
- ZHU, A., MONAHAN, C., ZHANG, Z., HURST, R., LENG, L., and GOLDSTEIN, J., 1995. High-level expression and purification of coffee bean alpha-galactosidase produced in the yeast *Pichia pastoris*. Arch Biochemistry Biophys, 324 (1): 65–70.
- ZHU, S.S., 2008. Cloning and characterization of two lipases and a lysophospholipase from *Aspergillus niger*. Masters thesis. Concordia University.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Asliye KARAASLAN
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi: Suruç / 25.09.1987
Telefon : 0554 941 95 31
e-mail : asliyegumus@harran.edu.tr

EĞİTİM

Derece Adı, İlçe,İl, Bitirme Yılı

Lise: Özel Murat Lisesi, Şanlıurfa, 2005

Üniversite: Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Şanlıurfa, 2010

Yüksek Lisans: Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği ABD, Şanlıurfa, 2012

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2012-	Harran Üniversitesi	Öğretim Görevlisi

UZMANLIK ALANI

Gıda Mikrobiyolojisi

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

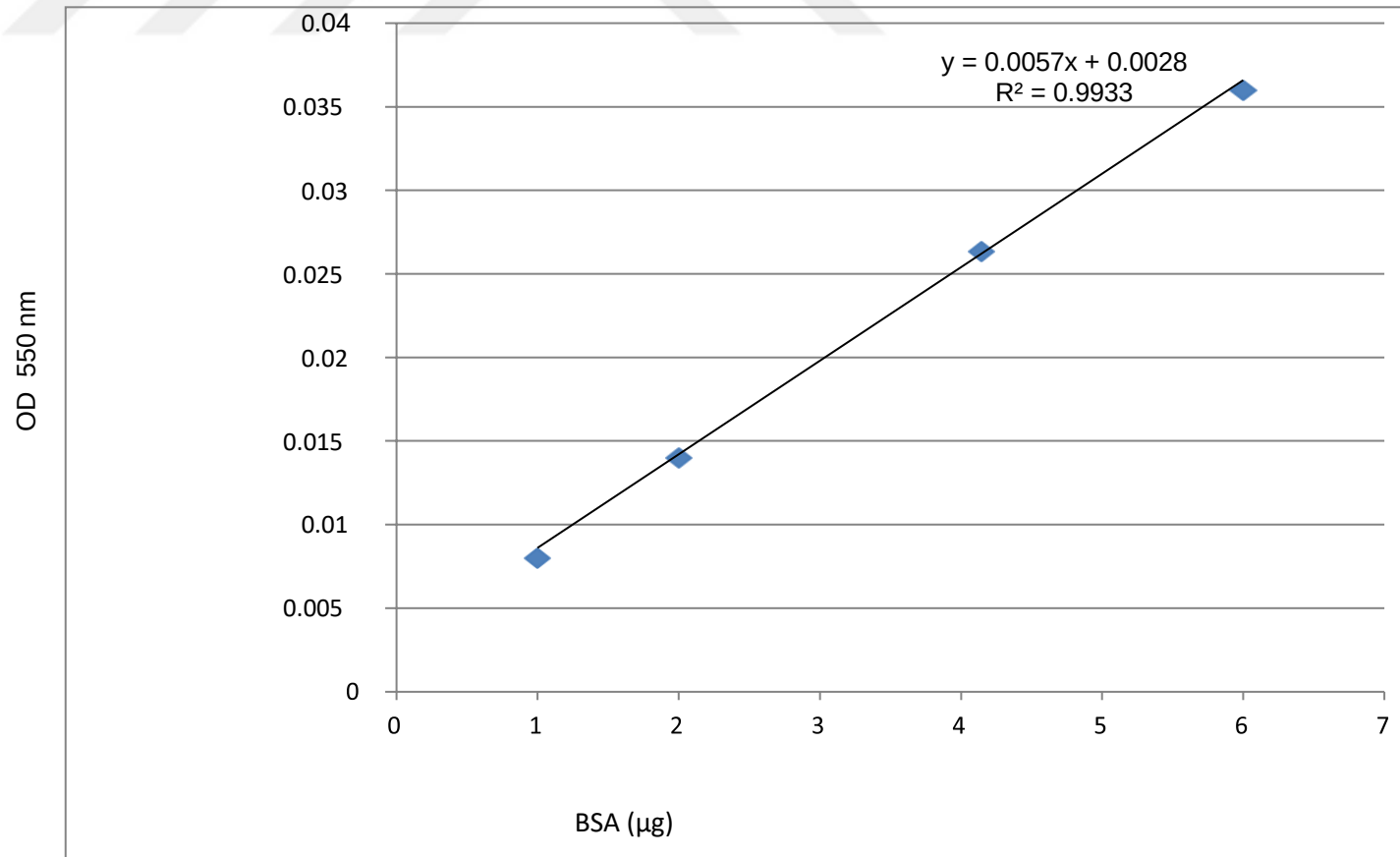
HAYOĞLU, İ., İZOL, G., GÜMÜŞ, A., GÖNCÜ, B., ÇEVİK, G.B., 2010. Menengicin Şekerleme Üretiminde Kullanım Olanakları. Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 14(4): 57-62.

KARAASLAN, M., YILMAZ, F.M., KARAASLAN, A., VARDİN, H., 2016. Synthesis and Accumulation of Anthocyanins in Sour Cherries during Ripening in Accordance with Antioxidant Capacity Development and Chalcone Synthase Expression. European Food Research and Technology, 242(2): 189–198.

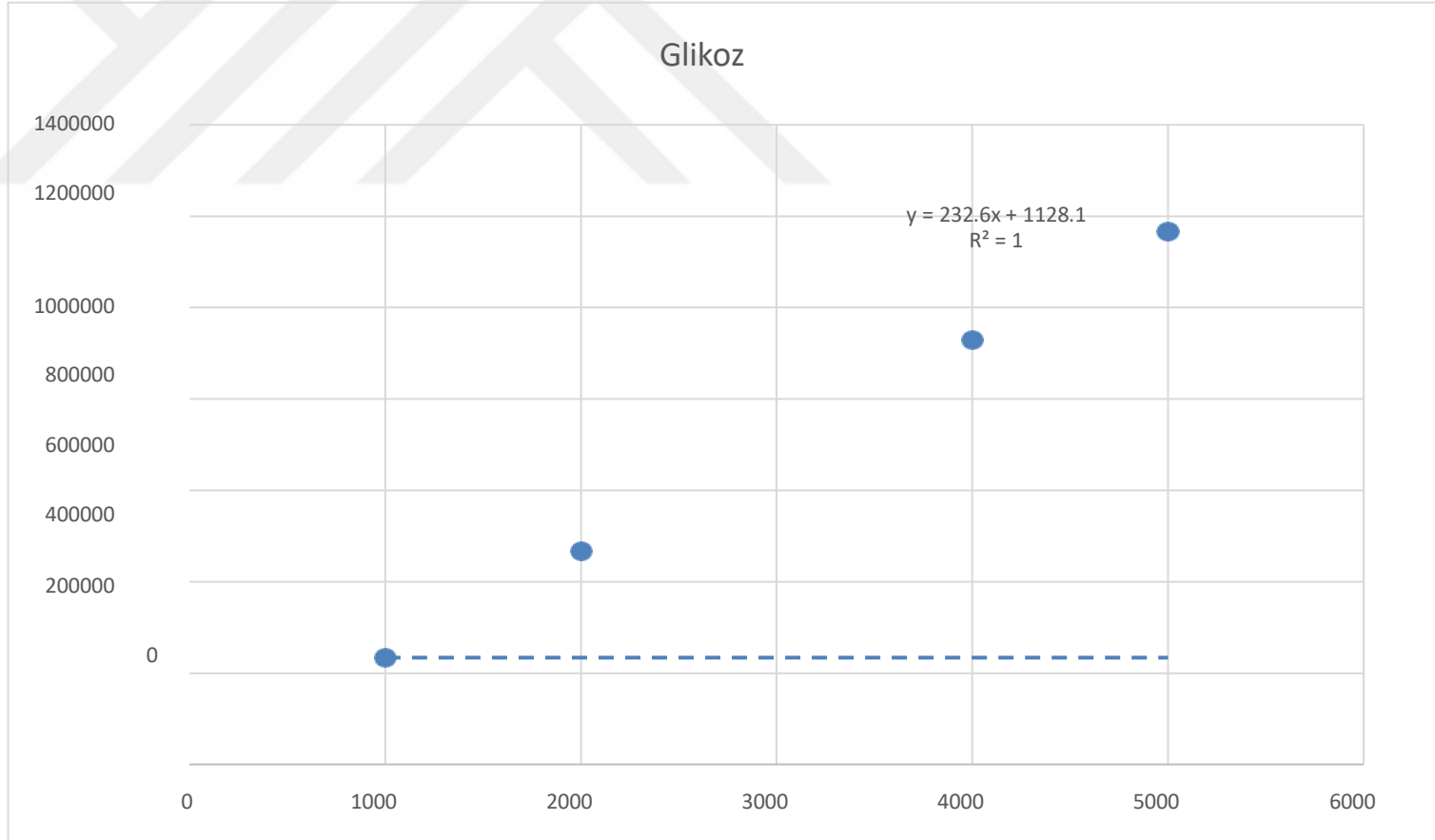
KARAASLAN, A., KARAASLAN, M., VARDİN, H., 2017. *Solanum lycopersicum* Ekspanzin (LeExp1) Geni İçeren Rekombinant *Pichia pastoris* Protein Ekspresyon Vektörünün Dizaynı ve Oluşturulması. Harran Üniversitesi Mühendislik Dergisi Cilt 2, Sayı 1.

EKLER

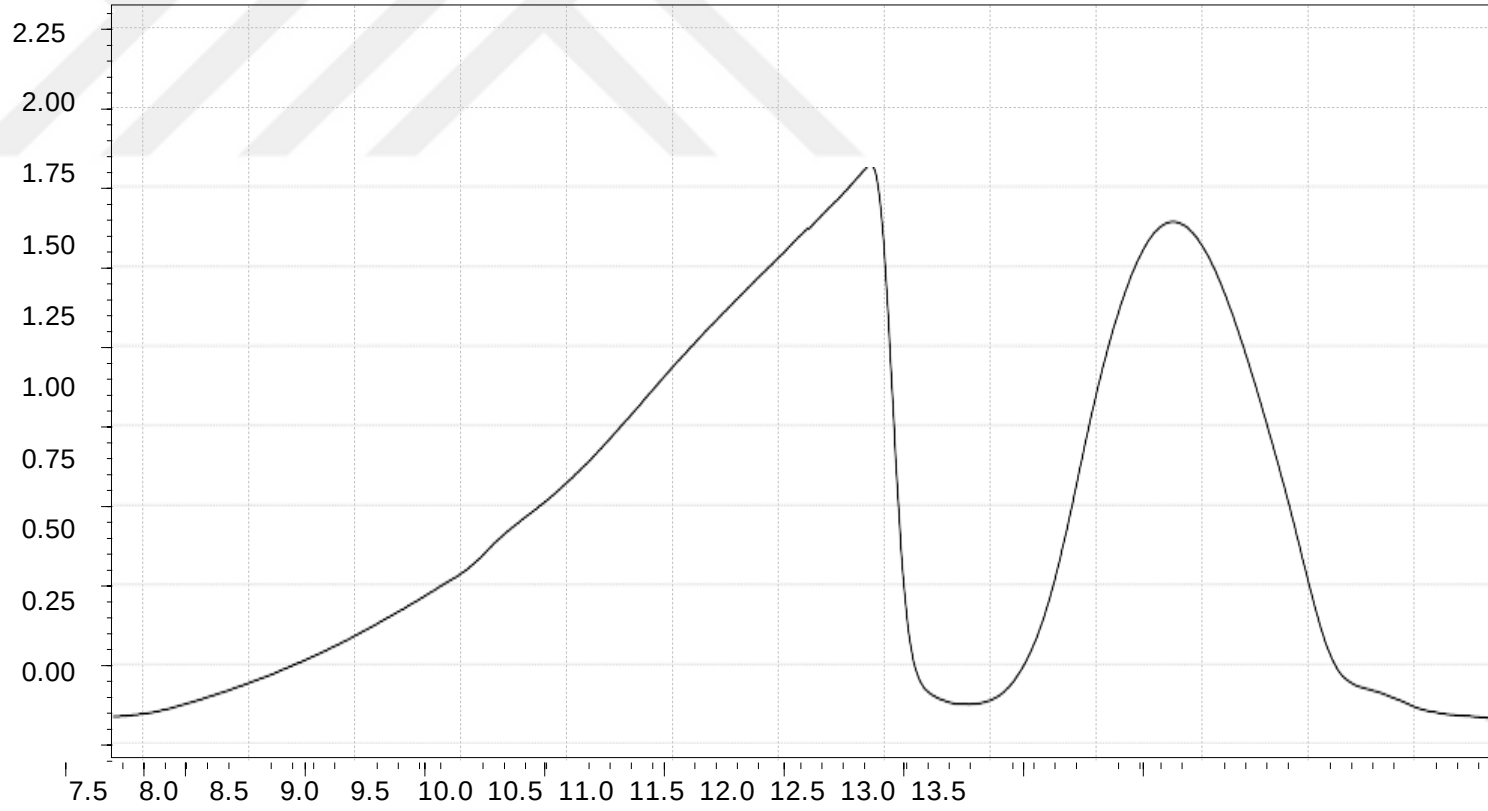
EK 1. Bradford Denemesi BSA Protein Standardı



EK 2: Glikoz Standartına Ait Kalibrasyon Eğrisi



EK 3: Sellobioz-Glikoz Kromatogramı



EK 4: İstatistiksel Analiz Sonuçları

Transgenik Suş	Zaman (Saat)	Örnek No				
		1	2	3	4	5
SMD1168- pPIC9K- Exp1	24	55±0.6	62±0.4	24±1.1	58±1.4	47±0.5
	48	96 ±0.8	84±0.5	66±0.7	75±2.1	50±0.6
	72	192±1.2	161±0.8	184±0.9	206±3.4	164±0.9
	96	279±1.6 ^a	216±1.8 ^b	265±4.5 ^a	283±3.5 ^a	214±3.1 ^a
SMD1168- pHIL-S1- Exp1	24	24±0.6	36±1.1	04±0.01	35±1.6	46±0.6
	48	78±0.8	65±1.2	54±0.8	40±1.5	62±0.8
	72	183±1.6	194±1.9	89±1.4	81±1.8	71±1.7
	96	216±1.1 ^b	252±1.6 ^a	192±1.9 ^b	184±2.6 ^b	154±4.5 ^b
GS115- pPIC9K- Exp1	24	42±1.2	33±0.8	16±2.6	25±1	18±1.3
	48	56±2.5	41±0.7	28±1.7	54±2.5	29±1.9
	72	92±3.4	86±1.9	67±1.9	77±2.9	64±0.6
	96	101±3.4 ^c	97±2.3 ^c	76±2.6 ^c	213±1.9 ^a	84±1.6 ^c
GS115- pHIL-S1- Exp1	24	32±0.6	24±1.2	14±0.7	19±1.1	21±0.9
	48	31±0.9	34±2.6	24±0.9	54±2.1	43±1.5
	72	56±1.6	61±3.4	65±1.4	77±1.9	81±1.9
	96	88±1.1 ^c	91±1.6 ^c	189±2.9b	86±1.2 ^c	92±2.3 ^c