



**MANYETİK NANOPARTİKÜL ARACILIĞIYLA
Pichia pastoris'e YENİ BİR GEN AKTARIM
YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Şeyda YILDIZ

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Gen Mühendisliği Bilim Dalı
Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER
2020
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MANYETİK NANOPARTİKÜL ARACILIĞIYLA
Pichia pastoris'e YENİ BİR GEN AKTARIM
YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Şeyda YILDIZ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI
Gen Mühendisliği Bilim Dalı

ERZURUM
2020
Her hakkı saklıdır



TEZ ONAY FORMU

**MANYETİK NANOPARTİKÜL ARACILIĞIYLA *Pichia pastoris*'e YENİ BİR GEN
AKTARIM YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER danışmanlığında, Şeyda YILDIZ tarafından hazırlanan bu çalışma, 07/01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Gen Mühendisliği Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (3./0)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Harun BUDAK

İmza :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **16.01./2020** tarih ve **...03.../...65...** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2018-6854

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MANYETİK NANOPARTİKÜL ARACILIĞIYLA *Pichia pastoris*'e YENİ BİR GEN AKTARIM YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Şeyda YILDIZ

Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Gen Mühendisliği Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER

Bu tez çalışmasında *Pichia pastoris* mayasına şimdiye kadar gerçekleştirilen gen aktarım yöntemlerinden (LiCl-ısı şoku veya elektroporasyon vb.) farklı olarak yeni bir gen aktarım yöntemi geliştirilmiştir. Bu doğrultuda, maya hücrelerine gen aktarımında aracı olarak kullanılan manyetik nanopartiküller ($Fe_3O_4@PEI$) sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin maya hücreleri üzerinde toksik etkisinin olmadığı görülmüştür. Gen aktarımının doğrulanması için kullanılan yeşil floresan protein raportör geninin (Green Fluorescent Protein; GFP) kodon optimizasyonu yapılmış ve bu gen dizisi, ticari olarak temin edilen sentetik DNA'dan amplifiye edilerek pGKB ekspresyon plazmitine yerleştirilmiştir. *E. coli* hücrelerinde klonlanarak elde edilen rekombinant DNA (pGKB-GFP) manyetik nanopartiküller ile bir araya getirilmiş, optimum şartlarda elde edilen manyetofektin miknatis aracılığıyla maya hücrelerine transfer edilmiştir. Antibiyotik seçilimi ve PCR reaksiyonu ile genomlarında GFP genini taşıyan maya transformantları doğrulanmış, GFP üreten hücreler konfokal mikroskopta görüntülenmiştir. Böylece rekombinant protein üretiminde sıklıkla kullanılan *P. pastoris* mayasına ilk defa manyetik nanopartikül aracılığıyla gen aktarımı gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemin, kolay bir şekilde uygulanabilir olması, ucuz olması, az miktarda DNA'ya gereksinim duyması, kompetent hücre hazırlanmasına gerek duymaması ve transformasyon işleminin kısa sürede gerçekleştirilmesi gibi birçok avantaja sahip olduğu söylenebilir.

2020, 107 sayfa

Anahtar Kelimeler: Manyetik nanopartikül, gen aktarımı, GFP (yeşil floresan protein), kodon optimizasyonu, *Pichia pastoris*

ABSTRACT

Master Thesis

IMPROVEMENT OF A NEW GENE TRANSFER METHOD TO *Pichia pastoris* WITH MAGNETIC NANOPARTICLE

Şeyda YILDIZ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics
Discipline of Gene Engineering

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Yağmur ÜNVER

In this thesis study, a new gene transfer method has been developed in contrast to the gene transfer methods (LiCl-heat shock or electroporation etc.) applied to *Pichia pastoris* yeast up to now. Accordingly, magnetic nanoparticles ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$), which are used as a mediator of gene transfer to yeast cells, have been synthesized and characterized. It was found that the synthesized magnetic nanoparticles had no toxic effect on yeast cells. The codons of the Green Fluorescent Protein reporter gene (GFP) used to confirm gene transfer was optimized and this gene sequence was amplified from commercially assured synthetic DNA and inserted into the expression plasmid pGKB. Recombinant DNA (pGKB-GFP) obtained by cloning in *E. coli* cells was combined with magnetic nanoparticles and the magnetofectin obtained under optimum conditions was transferred to yeast cells by means of magnet. Yeast transformants carrying GFP gene in their genomes were confirmed by antibiotic selection and PCR reaction, GFP producing cells were visualized on confocal microscope. Thus, gene transfer by means of magnetic nanoparticle, to *P. pastoris* yeast, which is frequently used in recombinant protein production was realized for the first time. It can be said that this method has many advantages such as being easy to apply, being inexpensive, requiring a small amount of DNA, not requiring a competent cell preparation and the transformation process being performed in a short time.

2020, 107 pages

Keywords: Magnetic nanoparticle, gene delivery, GFP (Green Fluorescent Protein), codon optimization, *Pichia pastoris*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde ve Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DAYTAM) yapılmıştır.

Çalışmalarım süresince görüş, bilgi birikimi ve engin tecrübelerinden yararlandığım çok kıymetli hocam, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER'e tüm sabrı ve samimi ilgisinin yanı sıra yaptığı tüm fedakârlıklar için minnettarım.

Laboratuvardaki ilk deneysel tecrübelerimi kazanmamda desteğini ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Melike YILDIZ'a da ayrıca çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın nanobiyoteknoloji alanıyla birlikte multidisipliner bir çalışma olmasına vesile olan değerli hocam, Sayın Prof. Dr. Ahmet MAVİ'ye ve benim için çok yeni olan nanobiyoteknoloji alanında tez çalışmalarım boyunca her konuda yardımcı olan, Sayın Kübra SOLAK'a tüm samimi yardım ve ilgilerinden ötürü teşekkür ederim.

İlk laboratuvar acemiliğini birlikte attığımız ekip arkadaşım, Sayın Melek ACAR'a, manevi olarak her zaman yanımda olan ve bana destek olan dostlarım Sayın Esra MESCI'ye ve Sayın Elif GÜNEŞ'e çok teşekkür ederim.

Alanımla ilgili bilgi ve birikimlerinden yararlandığım Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü ailesindeki çok kıymetli hocalarım başta olmak üzere umut verici fikirleriyle ufkumu açan çok kıymetli hocam, Sayın Prof. Dr. Mesut TAŞKIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmalarımı devam ettirmek ve araştırmalarımı rahatça yapabilmek için her türlü imkânı tanıyan saygıdeğer hocam, DAYTAM müdürü Sayın Prof. Dr. Hamdullah KILIÇ'a, tez düzenleme aşamasında samimi ilgi ve yardımı için kıymetli hocam, Sayın Öğr. Gör. Hasan CAN'a, stresli olduğum deney zamanlarında güler yüzünü ve iyi dileklerini eksik etmeyen kıymetli hocam, Sayın Öğr. Gör. Osman Nuri ASLAN başta

olmak üzere çok değerli DAYTAM ailesine, gösterdikleri samimi ilgi için ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım.

‘Hayatta en büyük mucize küçükken iyi bir öğretmene rastlamaktır’ sözünün bendeki karşılığı olan çok kıymetli ilkokul hocam, Sayın Uzm. Dr. Hatice ÇELİK’e, manevi olarak her zaman yanımda olduğu için minnettarım.

Hayatımın her döneminde özellikle de tez döneminde benim için hiçbir fedakrlıktan kaçınmayan, manevi olarak her zaman yanımda olan canım anneme, maddi destekçilerim olan canım babam ve abim başta olmak üzere YILDIZ ailesinin kıymetli üyelerine her şey için teşekkür ederim.

Bu alışmayı, FYL-2018-6854 no’lu proje ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi’ne teşekkür ederim.

eyda YILDIZ

Ocak, 2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Rekombinant Protein Üretiminde Kullanılan Ekspresyon Sistemleri.....	4
1.1.1. <i>Pichia pastoris</i> ekspresyon sistemi	6
1.2. Gen Aktarım Yöntemleri.....	9
1.2.1. Biyolojik yöntemler.....	12
1.2.2. Kimyasal yöntemler	13
1.2.3. Fiziksel yöntemler	13
1.2.3.1. Manyetofeksiyon	15
1.3. Mayalara Gen Aktarımı.....	20
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	25
2.1. Amaç	31
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	32
3.1. Materyal	32
3.1.1. Kullanılan cihazlar	32
3.1.2. Kullanılan kimyasallar ve kitler	33
3.1.3. Kullanılan mikroorganizmalar	33
3.1.4. Kullanılan primerler	33
3.1.5. Kullanılan besiyeri, tampon ve çözeltiler.....	35
3.2. Yöntem.....	36
3.2.1. Fe ₃ O ₄ @PEI MNP sentezi ve karakterizasyonu.....	36
3.2.2. MNP'lerin maya hücreleri tarafından alımının belirlenmesi	37
3.2.3. MNP'lerin maya hücreleri üzerindeki toksik etkisinin araştırılması.....	38

3.2.4. Manyetofektin hazırlama ve optimizasyonu	39
3.2.4.1. Süre optimizasyonu	39
3.2.4.2. N/P oranı optimizasyonu	40
3.2.4.3. MNP miktar optimizasyonu	41
3.2.5. pGKB-GFP plazmitinin elde edilmesi	41
3.2.5.1. pGKB plazmitinin doğrulanması.....	41
3.2.5.1.a. <i>E. coli</i> hücrelerinden plazmit izolasyonu	41
3.2.5.1.b. Vektöre ait primerlerle PCR reaksiyonu	43
3.2.5.1.c. pGKB plazmitinin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi	43
3.2.5.2. Yeşil floresan protein (GFP) geninin amplifikasyonu	43
3.2.5.2.a. PCR reaksiyonu.....	44
3.2.5.2.b. PCR ürününün agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi	44
3.2.5.2.c. PCR ürününün saflaştırılması	45
3.2.5.2.d. PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi	45
3.2.5.2.e. PCR ürünlerinin fenol-kloroform ekstraksiyonu.....	46
3.2.5.2.f. Vektör DNA (pGKB)'nın restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi...	46
3.2.5.2.g. Vektör DNA'nın jelden ekstraksiyonu.....	47
3.2.5.2.h. Ligasyon reaksiyonu	47
3.2.5.2.i. <i>E. coli</i> One Shot TOP10 hücrelerinin transformasyonu.....	48
3.2.5.2.j. GFP genine ve vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak ilgili sekansların koloni PCR ile amplifikasyonu	48
3.2.5.2.k. Muhtemel rekombinant vektörün sekans analizi ile doğrulanması.....	49
3.2.6. pGKB-GFP plazmitinin maya hücrelerine transferi.....	50
3.2.6.1. Manyetofektin hazırlama	50
3.2.6.2. Halkasal rekombinant plazmitin transfer edilmesi	50
3.2.6.3. Lineer rekombinant plazmitin transfer edilmesi.....	51
3.2.6.4. Pozitif maya transformantlarının doğrulanması	52
3.2.6.4.a. Koloni PCR	52
3.2.6.4.b. Genomik DNA izolasyonu ve çoklu kopya varlığının belirlenmesi	53
3.2.6.5. Pozitif maya transformantları ile GFP üretimi	54

4. ARAŞTIRMA BULGULARI	55
4.1. Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	55
4.2. MNP'lerin Hücresel Alımının Belirlenmesi	60
4.3. MNP'lerin Maya Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin Araştırılması	61
4.3.1. Proliferasyon testi	61
4.3.2. Işık mikroskopunda görüntüleme	62
4.3.3. Spotlama (Spotting) testi	63
4.4. Manyetofektin Hazırlama ve Optimizasyonu	64
4.4.1. Süre optimizasyonu	64
4.4.2. N/P oranı optimizasyonu	66
4.4.3. MNP miktar optimizasyonu	66
4.5. pGKB-GFP Plazmitinin Elde Edilmesi	68
4.5.1. pGKB plazmitinin doğrulanması	68
4.5.2. GFP geninin PCR ile amplifikasyonu	70
4.5.3. Genin ve vektör DNA (pGKB)'nın kesilmesi ve görüntülenmesi	70
4.5.4. Bakteri hücrelerinin transformasyonu ve koloni PCR	71
4.5.5. Muhtemel rekombinant vektörün sekans analizi	72
4.6. pGKB-GFP Plazmitinin Maya Hücrelerine Transferi	75
4.6.1. Manyetofektin hazırlama	75
4.6.2. Halkasal rekombinant plazmitin maya hücrelerine transfer edilmesi	77
4.6.3. Lineer rekombinant plazmitin maya hücrelerine transfer edilmesi	79
4.7. Pozitif Maya Transformantlarının Doğrulanması	80
4.7.1. Koloni PCR	80
4.7.2. Genomik DNA izolasyonu ve çoklu kopya varlığının belirlenmesi	80
4.8. Maya Transformantları ile GFP Üretiminin Görüntülenmesi	81
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	83
KAYNAKLAR	97
ÖZGEÇMİŞ	108

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat derece
g	Gram
g (RCF)	Göreceli santrifüj kuvveti (Relative centrifugal force)
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
R _h	Hidrodinamik boyut
rpm	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
V	Volt
λ	Dalga boyu
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
aFe ₃ O ₄ @PEI	Asit ile muamele edilmiş, PEI kaplı demir oksit MNP'ler
AOX	Alkol oksidaz
CIAP	Sığır bağırsak alkalin fosfataz (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)
dH ₂ O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
EtOH	Etanol
GAP	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
gDNA	Genomik deoksiribonükleik asit

GFP	Yeşil floresan protein (Green Fluorescent Protein)
LB	Luria Bertani
MNP	Manyetik nanopartikül
NA	Nükleik asit
NP	Nanopartikül
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PEI	Polietilenimin
rDNA	Rekombinant deoksiribonükleik asit
SOC Broth	Super Optimal Broth with Catabolite Repressor
TE	Tris EDTA
YPD	Maya ekstraktı pepton dekstrozu (Yeast Extract Peptone Dextrose)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Rekombinant DNA teknolojisinin çeşitli uygulamaları	3
Şekil 1.2. Nano boyuttaki yapılar	15
Şekil 1.3. PEI'nin avantajları	19
Şekil 3.1. pGKB vektörü.....	34
Şekil 3.2. Fe ₃ O ₄ @PEI ve aFe ₃ O ₄ @PEI MNP'lerin şematik gösterimi	36
Şekil 3.3. Plazmit taşıyan bakterilerin besiyerine transferi.....	42
Şekil 3.4. Manyetofektinin mıknatıs aracılığıyla <i>P. pastoris</i> 'e transferi	51
Şekil 4.1. Fe ₃ O ₄ @PEI MNP'lerine ait TEM görüntüsü ve XRD kırınım deseni	55
Şekil 4.2. aFe ₃ O ₄ @PEI MNP'lerine ait SEM ve TEM görüntüleri	55
Şekil 4.3. Fe ₃ O ₄ @PEI ve aFe ₃ O ₄ @PEI MNP'lerin mıknatısla toplanabilirliği	56
Şekil 4.4. DNA yüklenmiş Fe ₃ O ₄ @PEI ve DNA yüklenmiş aFe ₃ O ₄ @PEI.....	56
Şekil 4.5. MNP'lere ait titreşimli manyetometre karakterizasyon grafiği	57
Şekil 4.6. MNP'lerin farklı tampon ortamlarındaki zeta potansiyel değişimleri.....	58
Şekil 4.7. aFe ₃ O ₄ @PEI MNP'lere ait Hidrodinamik boyut ve Zeta potansiyeli sonuçları	59
Şekil 4.8. Sentezlenen MNP'lerin FTIR spektrumu	60
Şekil 4.9. Oregon Green ile etiketlenen MNP'lerin hücrel alımı	61
Şekil 4.10. aFe ₃ O ₄ @PEI MNP'lerin maya hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi ..	62
Şekil 4.11. Mayalara ait ışık mikroskop görüntüsü	63
Şekil 4.12. Spotlama testine ait maya görüntüleri	64
Şekil 4.13. DNA bağlanma için süre optimizasyonu	65
Şekil 4.14. PEI inkübasyonu için süre optimizasyonu.....	65
Şekil 4.15. N/P oranı optimizasyonu	66
Şekil 4.16. MNP miktar optimizasyonu.....	67
Şekil 4.17. pGKB plazmitine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü	68
Şekil 4.18. PCR reaksiyonuna ait agaroz jel elektroforez görüntüsü	69
Şekil 4.19. Kesilen pGKB plazmitinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	69
Şekil 4.20. PCR ürünlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü	70
Şekil 4.21. Kesilen vektör DNA'nın agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	71

Şekil 4.22. GFP koloni PCR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	71
Şekil 4.23. Koloni PCR reaksiyonu sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	72
Şekil 4.24. pGKB-GFP plazmit izolasyon ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü.....	73
Şekil 4.25. 8.koloniden saflaştırılan plazmite ait nükleotid sekansının blast sonucu	74
Şekil 4.26. 2. koloniden saflaştırılan plazmite ait nükleotid sekansının blast sonucu	75
Şekil 4.27. DLS sonuçları	76
Şekil 4.28. Hazırlanan manyetofektinin farklı sürelerdeki davranışına ait DLS analiz sonucu.....	77
Şekil 4.29. Farklı N/P oranlarının etkisinin floresan yoğunluk ölçümü ile karşılaştırılması	78
Şekil 4.30. Spotlama testine ait maya görüntüleri	78
Şekil 4.31. pGKB-GFP taşıyan <i>P. pastoris</i> transformantları.....	79
Şekil 4.32. Koloni PCR reaksiyonu sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	80
Şekil 4.33. Maya transformantlarına ait gDNA ile gerçekleştirilen PCR sonucu agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	81
Şekil 4.34. <i>P. pastoris</i> hücrelerine ait konfokal mikroskop görüntüsü.....	82
Şekil 5.1. Çalışmanın özeti	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Konakçı organizma olarak <i>Escherichia coli</i>	4
Çizelge 1.2. Konakçı organizma olarak mayalar	4
Çizelge 1.3. Konakçı olarak memeli hücreleri.....	5
Çizelge 1.4. Mayalarda rekombinant protein üretimi için kullanılan en yaygın promotörler	8
Çizelge 1.5. Gen aktarım sistemleri	11
Çizelge 1.6. LiAc, ısı şoku ve PEG'in sağlam hücrelerin ve sferoplastların transformasyonu üzerindeki etkileri	22
Çizelge 1.7. Gen aktarım yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları	24
Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar.....	32
Çizelge 3.2. GFP geninin amplifikasyonu için dizayn edilen primerler.....	33
Çizelge 3.3. pGKB vektörüne ait primerler	34
Çizelge 3.4. Kesim enzimlerinin tanıma sekansları ve kesim noktaları	34
Çizelge 3.5. Kullanılan besiyeri, tampon ve çözeltiler	35
Çizelge 3.6. Farklı N/P oranlarına göre hesaplanan ekstra PEI (enhansır) miktarları	40
Çizelge 3.7. PCR reaksiyon karışımı	44
Çizelge 3.8. PCR şartları.....	44
Çizelge 3.9. PCR ürünü kesim reaksiyonu karışım içeriği	45
Çizelge 3.10. Vektör DNA'nın kesim reaksiyonu karışım içeriği.....	46
Çizelge 3.12. Ligasyon reaksiyonu	48
Çizelge 3.13. Koloni PCR için reaksiyon karışım içeriği	49
Çizelge 3.14. PCR reaksiyon şartları	49

1. GİRİŞ

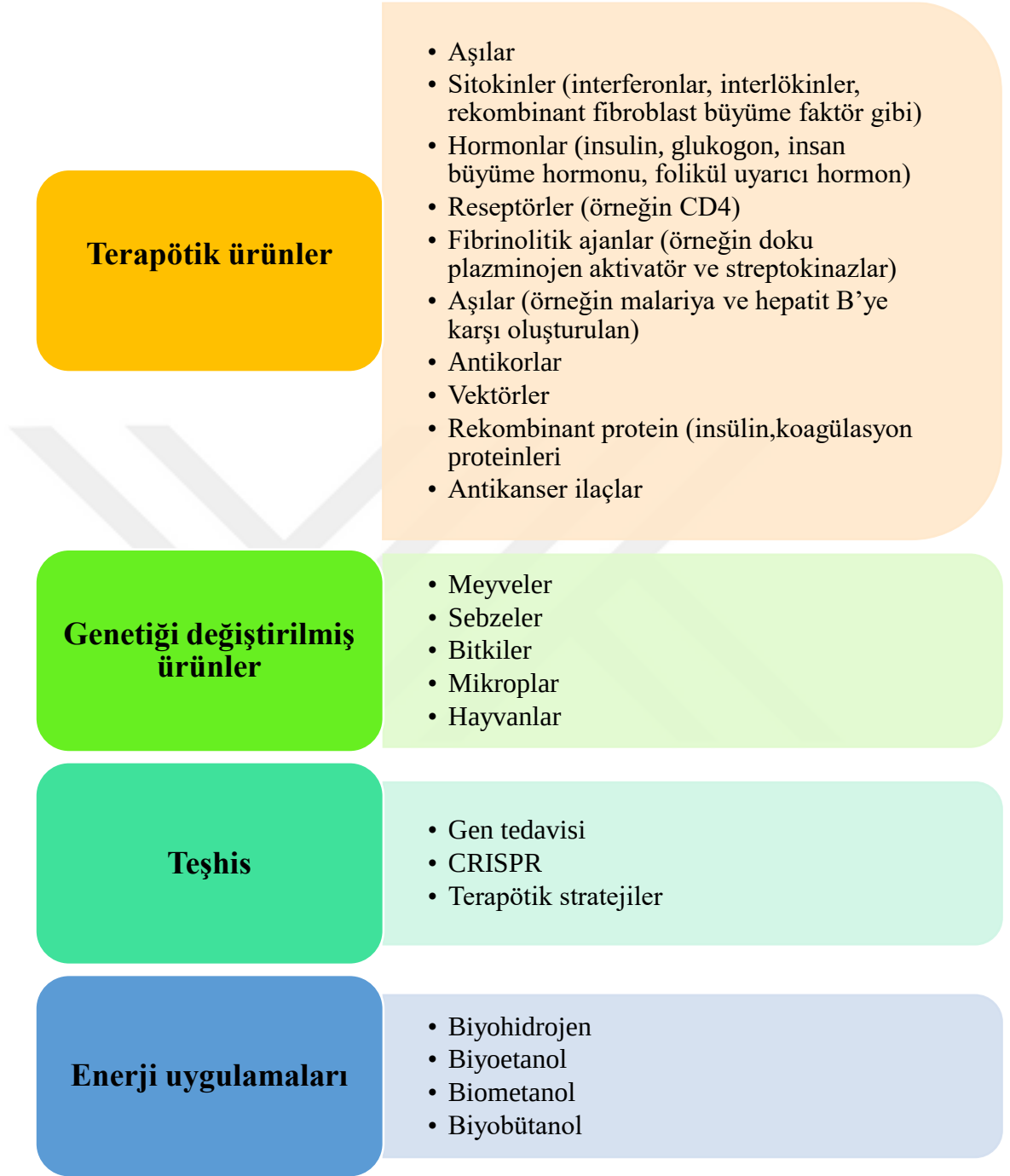
Moleküler biyoloji, günümüzde gelmiş olduğu konumun önemli bir kısmını hiç şüphesiz rekombinant DNA (rDNA) teknolojisine borçludur. rDNA, farklı kaynaklardan elde edilen genetik materyallerin genetik mühendisliği metotları kullanılarak bir araya getirilmesiyle elde edilir. rDNA moleküllerinin elde edilmesi için spesifik hedef DNA bölgeleri, restriksiyon enzimleri kullanılarak enzimatik olarak kesilir, istenen gen, aynı restriksiyon enzimleriyle kesilen ilgili vektöre yerleştirilir ve DNA ligaz ile fragmentler birleştirilir. Elde edilen rDNA'nın ifadesiyle üretilen protein 'rekombinant protein' olarak adlandırılmaktadır (Karaoğlu 2012; Khan *et al.* 2016).

Aktarılmak istenen DNA, genomik veya komplementer DNA (cDNA) olabilir. DNA örnekleri bakteri, virüs, bitki veya hayvan kaynaklı olmaktadır. rDNA başlıca iki kısımdan oluşmaktadır; birincisi; vektör plazmiti, ikincisi ise hedeflenen geni içeren DNA parçasıdır. Plazmitler, hücrelerin kromozomal DNA'larından ayrı olarak, halkasal ve çift zincirli yapıda bulunan DNA molekülleridir (Lodish *et al.* 2000). Vektörlerde ortak olarak bulunan temel elementler; i. antibiyotik direnç geni, ii. replikasyon orijini bölgesi ve iii. hedeflenen DNA bölgesinin eklenebileceği vektör bölgesidir (Pray 2008).

Rekombinasyonun temelleri, ilk kez 1928'de İngiliz Frederick Griffith tarafından atılmıştır. Griffith, Londra'daki zatürre salgınına sebep olan bakterilerle ilgili araştırma yaparken, genetik materyalin hücreler arasında aktarımının gerçekleşebileceğini gözlemlemiş ve bu olayı 'genetik transformasyon' olarak tanımlamıştır (Pray 2008). rDNA fikri ilk olarak Stanford Tıp Üniversitesi, Biyokimya Anabilim Dalı'nda görev yapmakta olan Prof. Dr. Dale Kaiser'in lisansüstünde öğrenim gören Peter Lobban adındaki öğrencisi tarafından ortaya atılmıştır. Moleküler biyoloji teknikleriyle rDNA'nın elde edilmesi ve onun hücre içindeki replikasyonunu gösteren ilk yayın 1972 ve 1973 yıllarında yapılmıştır (Jackson *et al.* 1972; Katartaş 2011). İlk rDNA moleküllerinin 1973 yılında, Stanford Üniversitesi ve California San Francisco Üniversitesi'nden Paul Berg, Herbert Boyer, Annie Chang ve Stanley Cohen tarafından

üretildiği bilinmektedir (Hughes 2001). Stanley Cohen ve Annie Chang, 1973 yılında rDNA teknolojisinin temelini oluşturan ilk *in vitro* plazmiti oluşturmuştur (Soydemir ve Aksoy 2017). Günümüzde ilk genetiği değiştirilmiş organizma olarak 1973 yılında üretilen bir bakteri kabul edilmektedir. *Salmonella* genlerinin *Escherichia coli* bakterisine gönderilmesiyle bakteriye daha önceden sahip olmadığı yeni özelliklerin kazandırıldığı gözlenmiştir (Bakırcı 2012; Altıntaş vd 2017). Bununla birlikte, 1980'lerin ortalarından bu yana, sağlığı iyileştirmek için sürekli olarak hormonlar, aşılar, terapötik ajanlar ve teşhis araçları gibi ürünlerin sayısı geliştirilmiştir (Bazan-Peregrino *et al.* 2013). 1998 yılında ise *Pichia pastoris* mayası kullanılarak ilk rekombinant insan serum albümini üretilmiştir ve yapılan çalışmalar sonucunda kullanımının klinik olarak güvenli olduğu ifade edilmiştir (Chen *et al.* 2013).

rDNA teknolojisinin ortaya çıkışı, biyoloji için devrim niteliğindedir ve bir dizi çarpıcı değişikliğe yol açmıştır. Mikroorganizmaları, hayvanları ve bitkileri değiştirerek tıbbi genetik ve biyotıpta etkili olan çok çeşitli terapötik ürünler elde etmede yeni fırsatlar sunmuştur (Galambos and Sturchio 1998; Steinberg and Raso 1998). Özellikle son yıllarda, kanser tedavisi ve genetik hastalıklar başta olmak üzere viral ve fungal direnç gibi bazı bitki hastalıkları ile mücadele etmede biyomedikal uygulamalar için stratejiler geliştirilmiştir. rDNA teknolojisinin çevreyi temiz hale getirmedeki rolü (bitki ıslahı ve mikrobiyal ıslah) ve bitkilerin farklı olumsuz etken faktörlere (kuraklık, zararlı böcekler ve tuz) artan direnç göstermedeki rolünün çok büyük olduğu kabul edilmiştir. Rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılan çeşitli uygulamalar Şekil 1.1'de verilmiştir (Khan *et al.* 2016; Altıntaş *et al.* 2017).



Şekil 1.1. Rekombinant DNA teknolojisinin çeşitli uygulamaları

1.1. Rekombinant Protein Üretiminde Kullanılan Ekspresyon Sistemleri

Rekombinant protein üretimi için bakteri, maya ve hayvan hücreleri olmak üzere üç çeşit konakçı kullanılmaktadır. Bu konakçıların avantajları ve bunlarla ilgili sorunlar, Çizelge 1.1, Çizelge 1.2 ve Çizelge 1.3'te sunulmuştur (Garnick *et al.* 1988; Hedayberdiyev ve Öner 1997). Konakçı organizmaların her birisi çeşitli avantajlara sahipken farklı açılardan problemlere de sahiptir. Çalışmalar, amaca en uygun konakçı seçilerek yürütülmektedir.

Çizelge 1.1. Konakçı organizma olarak *Escherichia coli*

Avantajları	Günümüzdeki problemler
1. Genetiği ve moleküler biyolojisi detaylı olarak incelenmiştir. 2. İyi konakçı/vektör sistemlerine sahiptir. 3. Ucuz besiyeri ortamında hızlı büyüme yeteneğine sahiptir.	1. Potansiyel olarak endotoksin kaynağıdır. 2. Salgıladığı proteinler çözünmez ve saflaştırma zordur. 3. İfade ettiği bazı proteinler N-terminal metiyonin artığı içerir. 4. Proteinler glikozillenmezler. 5. Proteinler genellikle ortama salınmaz.

Çizelge 1.2. Konakçı organizma olarak mayalar

Avantajları	Günümüzdeki problemler
1. Genetiği, moleküler biyolojisi ve fizyolojisi detaylı olarak araştırılmıştır. 2. Patojenik değildir ve gıda endüstrisi için oldukça uygundur. 3. Yüksek fermentasyon kapasitesine sahiptir. 4. İyi araştırılmış olan salım mekanizmasına sahiptir. 5. Bazı heterolog proteinler, hücre içinde çözünür şekilde birikim gösterir.	1. Düşük ekspresyon seviyesi gösterirler. 2. Glikolizasyon, yüksek ökaryotlardan farklılık gösterir. 3. Salgılanan peptitlerin hepsi uygun bir şekilde işlenemez. 4. Büyük molekül ağırlığına sahip proteinler az miktarda salgılanır. 5. Ekspresyon için ticari işlemlerin geliştirilmesi devam etmektedir.

Çizelge 1.3. Konakçı olarak memeli hücreleri

Avantajları	Günümüzdeki problemler
1. Doğal halde protein üretimi gerçekleştirir.	1. Hücreleri çoğaltmak oldukça pahalıdır.
2. İfade edilen ürün ortama salgılanır.	2. Moleküler biyolojisi üzerinde çalışmalar devam etmektedir.
3. Bazı hücre hatları için serum içermeyen besiyeri ortamı kullanılabilir.	3. Bazı hücre hatlarının uzun süreli stabilitesi belli değildir.
4. Yüksek miktarda ürün verimi gösterir.	4. Virüs kontaminasyonu gibi bazı konularda endişeler mevcuttur.
5. Translasyon sonrasında doğru modifikasyonlar gerçekleştirilir.	

Bakteriyel konakçı *E. coli*, yüksek verimde rekombinant protein üretimi için kullanılan en popüler ekspresyon sistemidir (Jana and Deb 2005; Shrivastava *et al.* 2013). Protein üretimi için kullanılan ifade konakçılarından biri olan *E. coli*, temel beslenme gereksiniminin yanında sağladığı kolay kullanım, arzu edilen genin bakteri genomuna kolay bir şekilde klonlanabilmesi gibi kolay genetik manipülasyonlara olanak vermesi, bakteriyel transformasyon ve ardından antibiyotik seçimi ile konakçıda sınırsız bir şekilde çoğaltılabilmesi gibi birçok avantaja sahiptir (Razzell and Khorana 1958; Pardee 1959). Yavaş bir ifade ve saflaştırma gelişimine yol açan translasyon sonrası mekanizmalarının olmaması ve *E. coli* tarafından üretilen rekombinant proteinler ile tedavi edilen hastalarda uygulanan ilaca karşı oluşan bağışıklık tepkisine yol açan endotoksinlerin varlığı gibi dezavantajlara da sahiptir (Sambrook *et al.* 1989; Mamat *et al.* 2015). Bu nedenle *E. coli*'den sonra ikinci ve üçüncü en uygun mikrobiyal sistemler sırasıyla bir ökaryotik mikroorganizma *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia pastoris*'tir. Her iki konakçı da insan proteinleri ile benzer bir şekilde katlanabilen ve translasyon sonrası modifikasyonu gerçekleştirmiş rekombinant proteinler üretme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle bu sistemler proteinin translasyon sonrası modifikasyonunun gerekli olduğu prokaryotlardan daha iyi olarak kabul edilmektedir (Dalton and Barton 2014; Gupta and Shukla 2017).

Ekspresyon konakçısı olarak *S. cerevisiae* (maya), translasyon sonrası modifikasyonların gerçekleşmesi, ürünü hücre dışı olarak salgılaması (Tyo *et al.* 2014; Tang *et al.* 2015), istenen genin konakçı genomuna stabil bir şekilde entegre edilebilmesi, yüksek gen kopyalarının entegrasyonuna ve gen ekspresyonunu arttırmak için tasarlanmış sentetik

promotörlerin aktarılmasına izin vermesi (Curran *et al.* 2014), ticari olarak büyük ölçekli protein üretimi için kararlı hücre hattı sağlaması, üretim reaktörlerinde daha büyük toplam protein üretimine izin vermesi (Boder and Witttrup 1997; Cregg *et al.* 2010) gibi avantajlara sahiptir. Rekombinant proteinin aşırı ekspresyonu, hücre içi birikime ve verimin düşmesine neden olması da dezavantajı olarak ortaya çıkmaktadır (Idiris *et al.* 2010; Tyo *et al.* 2014).

Diğer bir ekspresyon konakçısı olan *P. pastoris* (maya), birkaç translasyon sonrası modifikasyon ile yüksek ekspresyon için uygun konak olması, tanımlanan ortamda çok yüksek hücre yoğunluğu ile kolayca büyümesi, büyük ölçekli fermantasyonda kolay ölçeklendirme, memeli hücre kültürasyon sürecinden nispeten daha uygun maliyet süreci ve etkili ürün geliştirme, tek hücreli proteinin (SCP; Single Cell Protein) ticari üretimi ve hem hücre içi hem de hücre dışı rekombinant protein üretimi gerçekleştirmesi gibi birçok avantaja sahiptir. Rekombinant protein üretiminde konakçı olarak yaygın bir şekilde kullanılan *P. pastoris*'in transformasyonunda hem sferoplast hem de elektroporasyon yöntemleri kullanılabilir. Bu maya türünün transformasyonu için yöntem geliştirilmesinde Cregg *et al.* (1985) (sferoplast), Rosenfeld (1999) (elektroporasyon) ve Cregg ve Russell (1998) (sferoplast/elektroporasyon) yer almıştır (Gietz and Woods 2001).

Memeli ekspresyon sistemleri ise insan benzeri protein üretilmesine izin verdiği için rekombinant terapötik proteinlerin üretimi için çoğunlukla kullanılırken memeli hücrelerinin mikroorganizmalara göre daha zengin ortam ve beslenme gerektirmesi yanında büyüme koşullarının zahmetli ve uzun zaman almasından dolayı mümkün olduğunca tercih edilmemektedir (Birch and Racher 2006; Huang *et al.* 2010).

1.1.1. *Pichia pastoris* ekspresyon sistemi

Rekombinant protein ekspresyonu ile ilgili bilgidaki artış ve rekombinant proteinler için artan pazar talebi, heterolog olarak eksprese edilecek protein spektrumunu genişletmektedir (Juturu and Wu 2018). Konak organizmada protein üretimi yerine,

protein kodlayan ilgili genin klonlanması ve heterolog ekspresyonu alternatif teknoloji olarak bilinmektedir. Son zamanlarda heterolog protein ürünleri endüstriyel uygulamaların yaklaşık üçte birini oluşturmaktadır. Rekombinant protein üretimi için ökaryotik organizma olan mayalar sıklıkla kullanılmaktadır. Bu mikroorganizmalardan *P. pastoris*; 1-5 µm çapında, 5-30 µm uzunluğunda, oval şekilli, tek hücreli, karbon ve enerji kaynağı olarak metanolü kullanabilen, çeşitli rekombinant proteinlerin ekspresyonu için genetik olarak tasarlanabilen ve sıklıkla kullanılan metilotrofik bir maya türüdür (Higgins and Cregg 1998; Ünver 2014).

P. pastoris, yaklaşık 10 yıl önce yapılan gen dizilerinin filogenetik analizini takiben *Komagataella* cinsine atanmıştır (Kurtzman 2009; Mendonça Bahia *et al.* 2018). *P. pastoris* (*Komagataella phaffii*) ekspresyon sisteminde herhangi bir yabancı genin ifadesinin gerçekleştirilmesi;

- I. Genin, bir ekspresyon vektörüne entegrasyonu,
- II. Ekspresyon vektörünün konak hücreye transferi ve
- III. Yabancı geni eksprese eden suşların test edilmesi olmak üzere üç temel basamaktan oluşur (Macauley-Patrick *et al.* 2005).

Metilotrofik bir maya olan *P. pastoris*, özellikle toz formundaki enzimler ve biyofarmasötik endüstrisi sektöründe başarılı bir protein üretim konakçısı olarak oldukça ilgi görmektedir. 2009 yılından beri 500'den fazla farmasötik protein ve 1000'den fazla rekombinant protein üretimi için "Genel olarak güvenli" (GRAS) mikroorganizması olarak kullanılmaktadır (Fickers 2014; Yang and Zhang 2018).

Maya ekspresyon sistemi, rekombinant olarak eksprese edilen proteinlerin salgılanması esnasında istenen proteinin hücre içerisindeki yabancı toksik proteinlerden korunması, hücreyi parçalamaya gerek kalmadan kolay bir şekilde saflaştırılması ve fermentasyon teknolojisi kullanılarak doğal proteinin yüksek seviyede elde edilmesi gibi bazı avantajlar sunmaktadır (Sharma *et al.* 2009). Ayrıca *P. pastoris* ekspresyonunda herhangi bir toksik protein ekstrasellüler besiyerine salgılanmadığından bu durum farmasötik kullanım için

büyük bir avantaj olarak görülmektedir (Kaymak 2008). Diğer avantajları arasında, yüksek üretim yeteneğinden dolayı yüksek miktarda verim sağlaması ve gereksinim duyduğu besiyerlerinin kimyasal olarak tanımlanmış ve maliyet olarak uygun olması bulunmaktadır. Küçük ve büyük ölçekli üretimlerinin yanında büyük ölçekli sürekli fermentörlerin olumsuz şartlarına dayanacak ve beklenmedik parçalanmalara karşı canlı kalabilecek kadar da dayanıklıdır. Hem hücre içi hem de hücre dışı üretimlerini yüksek seviyede gerçekleştirmektedir. Ekspresyon kasetinin kopya sayısının arttırılmasına ve dolayısıyla ifade edilecek olan protein miktarının arttırılmasına olanak sağlayan bir yapıya sahiptir. Ökaryotik post-translasyonel modifikasyon yapmaktadır ve memeli hücrelerinde olduğu gibi translasyon sonucu elde edilen ürünleri işleyebilmektedir. Bunun yanında ürün saflaştırma işlemleri düşük maliyet gerektirmektedir. pH değeri 3 ile 7 aralığında yaşayabilen stabil üretim suşlarına sahiptir. Endotoksin üretmez ve patojen değildir (Gupta and Shukla 2017).

P. pastoris, yukarıda sayılan birçok yararlı özelliğinin yanında birkaç dezavantaja da sahiptir. Kültüre edilme süresi, bakteri kültür süresinden uzun olmaktadır. Sahip olduğu yapısal bir promotör olan alkol oksidaz (AOX1) promotörünü indüklemek için kültüvasyon süresi boyunca ara ara metanol ilavesi gerektirmektedir. Bu işlem boyunca da metanol varlığını izlemek zordur. Ayrıca metanol, petrokimyasal bir madde olduğundan gıda sektöründe kullanımı pek tercih edilmezken yanıcı özelliğinden dolayı da endüstriyel ölçekte depolanması istenmemektedir. Proteolizis ve doğal olmayan glikolizasyonun yanı sıra hiperglikolizasyon potansiyeline de sahiptir (Gupta and Shukla 2017). Mayalarda en çok kullanılan promotörler Çizelge 1.4'te listelenmiştir (Mendonça Bahia *et al.* 2018).

Çizelge 1.4. Mayalarda rekombinant protein üretimi için kullanılan en yaygın promotörler

Konak	Yapısal promotörler	İndüklenebilir promotörler
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ADH1, GAPDH, PGK1, TPI, PYK1, TEF	GAL1-10, CUP1, ADH2
<i>Komagataella phaffii</i>	GAP, TEF, PGK, YPT1	AOX1, FLD1, PEX8
<i>Kluyveromyces lactis</i>	PGK	LAC4, ADH4
<i>Yarrowia lipolytica</i>	TEF, RPS7, XPR2/hp4d	POX2, POT1, ICL1

Metanolün metabolizmasını düzenleyerek metanolü, formaldehite dönüştüren ilk metanol asimilasyon aşamasını katalize eden indüklenebilir promotörlerden biri AOX1 promotörüdür (P_{AOX1}) (Yang and Zhang 2018). Bu promotörün sıkı regülasyonu ve tek karbon kaynağı olarak metanol kullanıldığında güçlü uyarılabilirliği nedeniyle yüksek seviyelerde rekombinant protein ekspresyonu elde edilmektedir (Blount *et al.* 2012).

GAP geni, tetramerleri oluşturan bir NAD-bağımlı gliseraldehid 3-fosfat dehidrojenazı kodlamaktadır. GAP promotörü (P_{GAP}), glikoz, gliserol, etanol ve oleik asit dahil olmak üzere tüm karbon kaynakları üzerinde sürekli olarak proteinleri eksprese eden bir yapısal promotördür (Juturu and Wu 2018). P_{GAP} , gıda endüstrisi gibi alanlarda metanolün toksisitesine duyulan endişeden dolayı P_{AOX1} 'e alternatif olarak kullanılmaktadır (Yang and Zhang 2018). P_{GAP} , metanol içermeyen protein ifadesi gerçekleştirmesi ve kültür ortamını bir karbon kaynağından diğerine değiştirerek induksiyona gerek duymaması nedeniyle oldukça avantajlı olmaktadır. Bunun yanında, heterolog toksik proteinlerin sürekli olarak üretilmesi, maya hücreleri için toksik olabilmekte ve hatta hücre ölümüne sebep olabilmektedir (Waterham *et al.* 1997).

Diğer alternatif promotörler arasında; güçlü bir metanol induksiyonu ve yüksek seviyede bir derepresyon gösteren ayrıca reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı savunmada yer alan P_{CAT1} (Yang and Zhang 2018), P_{AOX1} ile aynı veya daha yüksek seviyelerde heterolog proteinler üretebilen yüksek oranda düzenlenmiş bir promotör olan P_{FLD1} , glikoz varlığında baskılanırken glikoz yokluğunda veya etanol varlığında indüklenerek yabancı genlerin ekspresyonu için geleneksel P_{AOX1} promotörüne karşı ilgi çekici bir alternatif olarak kabul edilen P_{ICL1} , P_{PEX8} , P_{YPT1} , P_{PGK1} , P_{NPS} , P_{G1} ve daha birçok yapısal ve indüklenebilir promotörler bulunmaktadır (Xu *et al.* 2017; Juturu and Wu 2018).

1.2. Gen Aktarım Yöntemleri

Genler, hücrelerin ve dolayısıyla da hücrelerden oluşan canlıların kalıtsal karakterlerinin, canlılıklarını devam ettirebilmeleri için gerekli olan proteinlerin (enzim, hormon vb.) kodlarını taşıyan, kromozom üzerinde lokalize olmuş, kodladığı proteinin büyüklüğüne

göre farklı uzunluklarda bulunan nükleotid (DNA) dizileridir. Genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak belirli uzunlukta bulunan ilgili bir genin, hedef DNA molekülünün yapısına aktarılması işlemine gen aktarımı denmektedir (Arslan ve Akyüz 2009).

Gen aktarımının mümkün olabildiğini gösteren ilk deneysel çalışma, 1928 yılında Griffith tarafından yapılmıştır. Griffith'in yapmış olduğu deneysel çalışmada patojen olmayan pnömokok bakterilerinin, ısı etkisi ile öldürülmüş patojen pnömokoklar ile aynı ortamda bulundurulduğunda patojenik özellik kazandığı gözlemlenmiş ve dolayısıyla da genetik materyal aktarımının mümkün olduğu fikri, ilk kez ortaya atılmıştır (Griffith 1928).

Moleküler biyoloji teknikleri ile elde edilen rDNA, konakçı hücrelere kimyasal veya fiziksel yöntemlerle gönderilmekte ve bu olaya transformasyon adı verilmektedir. Eğer konakçı hücre ökaryot ise bu işleme transfeksiyon denmektedir (Griffiths *et al.* 2000; Soydemir ve Aksoy 2017). rDNA'nın hücreye girişi virüsler aracılığıyla gerçekleştiriliyorsa bu işleme de transdüksiyon adı verilmektedir (Holmes 1996). Transfeksiyon, transformasyon ya da transdüksiyon uygulanmış hücrelere ise transgenik hücre adı verilmektedir (Lodish *et al.* 2000).

Gen aktarım teknikleri ile kodlanmış proteinin uygun bir konakçı veya konakçı hücrede ifade edilmesi için ilgili genin verimli bir şekilde aktarılması gerekmektedir. Günümüzde, nükleik asit elektroporasyonu, nükleik asit transfeksiyonu ve retrovirüsler ve adenovirüslerin kullanıldığı viral vektörler olmak üzere üç adet birincil gen aktarım sistemi bulunmaktadır. Bu sistemlerin etkinlik bakımından gösterdiği farklılıklar Çizelge 1.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 1.5. Gen aktarım sistemleri

	Ekspresyon tipi	Etkinlik	Hücre yaşayabilirliği	Güvenilirlik
Virus *	Kararlı veya geçici	80–90%	80–90%	Düşük
Elektroporasyon	Geçici	50–70%	40–50%	Yüksek
Transfeksiyon reaktifi**	Geçici	20–30%	80–90%	Yüksek

* Adenovirüs (geçici), retrovirüs (kararlı) ve lentivirüs (kararlı) içeren virüs;

** TF reaktifi, PEI, FuGENE HD ve Lipofectamine 2000 dahil transfeksiyon reaktifleri

Viral vektörler tarafından gen aktarılması, oldukça verimli olabilmekte (%80-90), ancak viral vektörler, nükleik asit sekanslarını konakçı genomuna yerleştirerek zararlı genlerin uygun olmayan şekilde ekspresyonu gibi istenmeyen etkilere neden olabilmektedir (Kami *et al.* 2011).

Elektroporasyon, elektrik akımları ile hücre zarında geçici olarak gözenekler oluşturan ve makromoleküllerin bu gözeneklerden hücreye girişine izin veren oldukça etkili (%50-70) bir tekniktir. Bununla birlikte, elektriksel uyarım nedeniyle alıcı hücrelerin hemen hemen yarısı ölmektedir (Potter 1993; Gietz and Woods 2001).

Transfeksiyon, ökaryotik hücreleri genetik olarak modifiye etmek için yabancı nükleik asitlerin hücrelere gönderildiği bir prosedürdür. Transfeksiyon reaktifleri (maddeleri), nükleik asitleri hücrelere verimli bir şekilde gönderememekte (%20-30) fakat bununla birlikte, hücre canlılığı büyük ölçüde korunmaktadır ve yöntem klinik kullanım için yeterince güvenlidir (Kami *et al.* 2011).

Şimdiye kadar, birçok transfeksiyon yöntemi geliştirilmiştir ve her yöntemin kendine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenle optimum yöntem, deneysel tasarıma ve hedefe bağlı olarak seçilmelidir. Her yöntemde, uygulama yapılacak hücre tipine ve deneyin kullanım amacına bağlı olarak farklı yaklaşımlar kullanılmaktadır. En ideal yöntem; transfeksiyon veriminin yüksek, hücre toksisitesinin düşük, alıcı hücre üzerindeki olumsuz etkinin minimum olduğu, bununla birlikte yöntemin kullanımının kolay ve tekrarlanabilir olduğu yöntemdir (Kim and Eberwine 2010). Transfeksiyon

yöntemleri; biyolojik, kimyasal ve fiziksel olmak üzere genel olarak üç gruba ayrılmaktadır.

1.2.1. Biyolojik yöntemler

Klinik araştırmalarda transdüksiyon olarak da bilinen virüs aracılı transfeksiyon, en yaygın olarak kullanılan yöntemdir (Pfeifer and Verma 2001). Virüs aracılı transfeksiyon oldukça etkilidir ve konakçı genomuna entegrasyonundan dolayı *in vivo* olarak sürdürülebilir (Kim and Eberwine 2010). Virüsler içerisinde en çok tercih edilen viral vektör, genetik materyali RNA olan retrovirüslerdir (Wall 1996). Retrovirüsleri ideal taşıyıcı yapan özellikleri hiç şüphesiz, entegrasyon kabiliyetlerinin yüksek olması ve taşıdıkları genetik materyalin hedef genoma tek kopya olarak entegre olma başarısının yüksek olmasıdır. Genetik materyali RNA olan rekombinant retrovirüsler, hedefe gönderildiğinde virüsün kendi yapısında bulunan revers (ters) trinskriptaz enzimi aktifleşir ve RNA formundaki genetik materyalini DNA'ya dönüştürerek genoma entegre olmasını sağlar (Schmotzer *et al.* 2003; Arslan ve Akyüz 2009).

Virüs aracılı transfeksiyonun başlıca dezavantajları arasında immünojeniklik ve sitotoksikite bulunmaktadır. Viral vektörler konakçı genomuna rastgele şekilde entegre olduğu için enflamatuvar bir reaksiyona ve ek bir mutasyona neden olabilir, tümör baskılayıcı genleri bozabilir, onkogenleri aktive edebilir veya gerekli genleri kesebilir (Woods *et al.* 2003). Bir diğer dezavantajları ise aktarılmak istenen geni taşıyan retrovirüslerin hazırlanması için yüksek teknolojik laboratuvarların gerekli olması ve yöntemin maliyetinin oldukça yüksek olmasıdır (Arslan ve Akyüz 2009). Bu nedenlerden dolayı, virüs aracılı transfeksiyonun oldukça etkili ve kullanımının kolay olmasına rağmen, viral olmayan transfeksiyon metotlarının geliştirilmesi için çok çaba gösterilmiştir (Kim and Eberwine 2010).

1.2.2. Kimyasal yöntemler

Kimyasal transfeksiyon, modern araştırmalarda en yaygın kullanılan ve yabancı genleri memeli hücrelerine aktarmak için ilk kullanılan yöntemdir. Kimyasal yöntemlerde genellikle katyonik polimer, kalsiyum fosfat, katyonik lipid ve katyonik amino asit kullanılmaktadır (Washbourne and Mcallister 2002). Pozitif yüke sahip olan kimyasallar, negatif yüklü nükleik asitler ile kompleks oluşturarak pozitif yüke sahip olmakta ve negatif yüklü hücre zarına doğru hareket ettirilmektedir. Sonuçta elde edilen bu komplekslerin hücre zarından geçiş mekanizması bilinmemektedir ancak endositoz ve fagositozun bu sürece dahil olduğu düşünülmektedir. Hücre tarafından alınan DNA, ekspresyonun gerçekleşmesi için çekirdeğe ulaşmaktadır ancak çekirdeğe translokasyon mekanizmasının nasıl olduğu ise henüz bilinmemektedir.

Kimyasal yöntemlerin transfeksiyon etkinliği büyük ölçüde nükleik asit/kimyasal oranına, çözelti pH değerine ve hücre zarı koşulları gibi faktörlere bağlıdır. Bu yüzden yöntem, virüs aracılı diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında, özellikle *in vivo* olarak düşük transfeksiyon verimi ile sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte, bu yöntemlerin sitotoksik etkisi düşüktür, ekstra taşıyıcı DNA gerektirmez ve aktarılmak istenen nükleik asit için boyut sınırlaması yoktur. Kimyasal transfeksiyon etkinliği de hücre tipine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Kim and Eberwine 2010).

1.2.3. Fiziksel yöntemler

En yeni yöntemlerden biri olan fiziksel transfeksiyon yöntemi, nükleik asitleri hücrelere aktarmak için çeşitli fiziksel araçları kullanmaktadır. Doğrudan mikro-enjeksiyon, biyolojik partikül aktarımı, elektroporasyon ve lazer aracılı transfeksiyon fiziksel yöntemler arasında bulunmaktadır (Mehier-Humbert and Guy 2005). Mikro-enjeksiyon yönteminde, aktarılmak istenen gen hücre sitoplazmasına veya çekirdeğine doğrudan enjekte edilmektedir (Ikeda *et al.* 1995). Bu yöntemde, nükleik asitler hücrelere aktarılmakta ancak yöntemin tecrübe gerektirmesi ve zahmetli olmasının yanı sıra sıklıkla

hücre ölümüne de neden olmaktadır (Kim and Eberwine 2010). İşlemin başarısını etkileyen diğer önemli bir parametre ise ortam ısısıdır (Arslan ve Akyüz 2009).

Fiziksel yöntemlerden biri olan biyolistik parçacık ile gen aktarım yönteminde, nükleik asitlerle konjuge edilen altın partikülleri kullanılmaktadır (Brien and Lummis 2009). Hazırlanan nükleik asit/partikül konjugatları daha sonra yüksek hızda (gen tabancası aracılığı ile) alıcı hücrelere ateşlenmektedir. Bu yöntemin, basit ve güvenilir olması gibi avantajlarının yanında hem pahalı aletler gerektirmesi hem de örneklerde fiziksel hasara sebep olmasından dolayı da dezavantajları bulunmaktadır (Kim and Eberwine 2010).

En yaygın kullanılan fiziksel yöntem ise elektroporasyon yöntemidir. Mekanizması kesin olarak bilinmemekle beraber, yöntemde hücrelere kısa bir elektrik akımı verilerek hücre zarında nükleik asitlerin, içinden geçebileceği küçük porların oluşturulduğu tahmin edilmektedir (Inoue and Krumlauf 2001). Elektroporasyon yöntemi kolay ve hızlı olduğu için optimum elektroporasyon koşulları belirlendiğinde çok sayıda hücre, kısa sürede transfekte edilebilmektedir. Fakat hücreler yüksek elektrik akımına maruz bırakıldığında hücre zarının bozulması gibi de dezavantajı bulunmaktadır (Kim and Eberwine 2010).

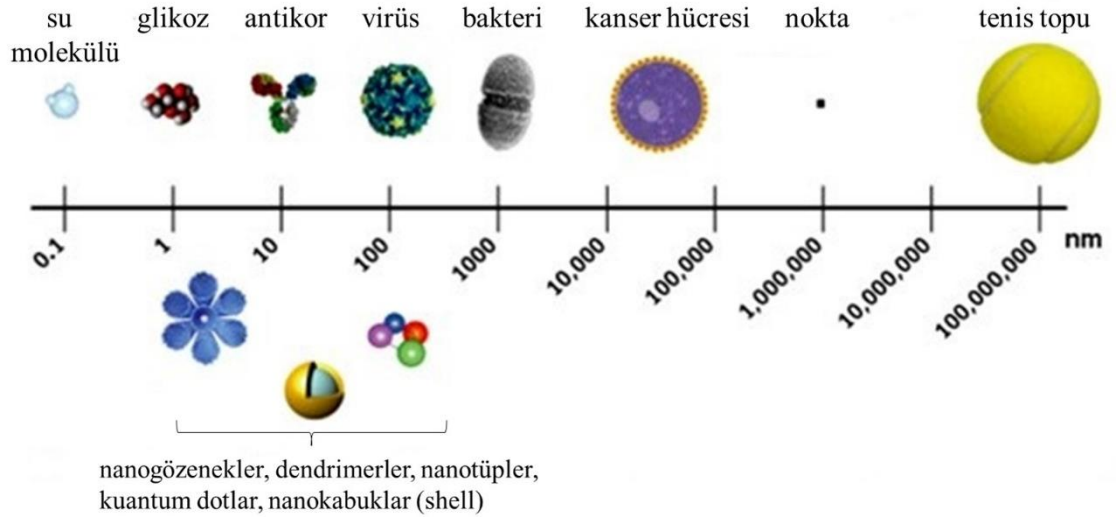
Optoporasyon veya fototransfeksiyon olarak da bilinen lazer aracılı transfeksiyon yönteminde, hücre zarında geçici bir gözenek oluşturmak için bir “puls lazeri” ile ışınlama yapılmaktadır (Schneckenburger *et al.* 2002). Lazer, hücre zarında gözenek oluşturduğunda ortamda bulunan nükleik asitler, ortam ile sitozol arasındaki ozmotik farktan dolayı hücre içine aktarılmaktadır. Bu yöntem ile çok küçük hücrelere gen aktarımı yapılabilmesi gibi avantajına karşın pahalı bir lazer mikroskop sistemi gerektirmesi gibi de dezavantajı bulunmaktadır (Kim and Eberwine 2010).

Bahsedilen bu yöntemlerin yanında, sonoporasyon olarak da bilinen ultrason ve manyetik alan (manyetofeksiyon) kullanılan başka fiziksel yöntemler de bulunmaktadır (Dobson 2006; Lo *et al.* 2014). Bu yöntemlerden manyetik alan yardımıyla gen aktarımı, bu tez çalışmasının konusu olup ayrıntılı olarak anlatılacaktır.

1.2.3.1. Manyetofeksiyon

Daha önce de bahsedildiği gibi viral vektörlerin transfeksiyon etkinliği yüksek olmasına rağmen immün yanıt riskinin yüksek olması, onkojenik etkilere sebep olması ve büyük ölçekli üretimine ilişkin zorluklar gibi dezavantajları bulunmaktadır. Viral olmayan vektörlerin çeşitli avantajlara sahip olması nedeniyle gen aktarımında kullanımına yönelik ilgi giderek artmaktadır. Viral olmayan gen vektörlerinin transfeksiyon verimleri genellikle viral vektörlerden daha düşük olmaktadır. Nonviral vektörlerin düşük olan etkinliğini ve hedeflenmesini arttırmak için “manyetofeksiyon” adı verilen yeni bir teknoloji geliştirilmiştir (Wang *et al.* 2009).

Hayatımızdaki birçok önemli gelişmeye öncülük eden nanoteknoloji, “maddenin 1 ile 100 nanometre (nm) boyutlarındaki davranışlarını anlama ve kontrol etme bilimi” olarak tanımlanırken nano kelimesi, “fiziksel bir büyüklüğün milyarda biri” olarak tanımlanmaktadır (Buzea *et al.* 2007).



Şekil 1.2. Nano boyuttaki yapılar (Anonim, 2019)

Nanopartiküller (NP’ler), boyutları 1 ile 100 nm arasında değişen ve üç boyutlu bir yapıya sahip olan yapılardır (Buzea *et al.* 2007). Keşfedildiğinden beri NP’ler, moleküler bilim ve biyomedikal alanları dahil birçok alanda kullanılmaktadır. NP’ler, dolaşım sistemini

ve hücreleri içeren vücudun hemen hemen tüm bölgelerine girebilecek kadar küçük boyutta olduklarından dolayı temel biyomedikal araştırmaların yanı sıra klinik tanı ve tedavi uygulamaları için de kullanılmaya adaydır (Chanda and Mohanta 2016). Örneğin NP'ler, DNA'nın dokulara ve hücrelere hedefli olarak iletilmesini kolaylaştırarak gen terapisinin daha etkili bir şekilde gerçekleştirilmesi ve daha başarılı sonuçların elde edilmesi konusunda büyük umut vaat etmektedir (Mykhaylyk *et al.* 2007). Özellikle, belirli hücrelere, organlara ve dokulara hedeflenebilecek ajanlar olarak NP'lerin tıbbi kullanım için geliştirilmesi hususunda çalışmalar yoğun olarak devam etmektedir.

MNP'lerin tümörlü dokuları normal dokulardan ayırt edebilmesini sağlayan pasif ve aktif olmak üzere iki çeşit hedefleme mekanizması bulunmaktadır.

- I. Pasif Hedefleme; tümör dokularının genellikle düşük pH ortamına sahip olma özelliğinden dolayı, tümörlü ve normal dokular arasındaki anatomik ve fizyolojik farklılıklara bağlı olarak yapılmaktadır.
- II. Aktif Hedeflemede; tümör hücresi yüzeyindeki spesifik işaretleri tanıması için MNP yüzeyine çeşitli ligandların konjuge edilmesiyle tümörlü hücreleri tanıma işlemi yapılmaktadır.

Bu hedefler doğrultusunda MNP'ler, farklı ajanla fonksiyonelleştirilip etiketlendikten sonra belirlenen amaç doğrultusunda hedef hücreye ve organizmaya gönderilmektedir (Jin *et al.* 2014; Erdogan 2018). Ayrıca, manyetik nanopartiküller (MNP), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) için de ajan olarak kullanılmaya başlanmıştır (Kami *et al.* 2011; Schlorf *et al.* 2011). Ucuz ve kolay bir yol olduğundan dolayı demir oksit MNP sentezinde, ferrik ve ferrus klorürün bazik ortamda birlikte çöktürüldüğü yöntem sıklıkla kullanılmaktadır (Steitz *et al.* 2007).

Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin (MNP) gen kompleksleri ile birleştirildikten sonra geçici olarak uygulanan bir manyetik alan altında nükleik asitlerin (DNA veya RNA) hedef hücrelere basit ve yüksek verimli bir şekilde aktarılmasını sağlayan yöntemle “manyetofeksiyon” adı verilmektedir (Arsianti *et al.* 2010b).

Manyetofeksiyon yönteminde, hücreye aktarılmak istenen yabancı bir gen, MNP ile bir araya getirilir, tuz-indüklü çökelme ve elektrostatik etkileşimle MNP/DNA kompleksi yani, taşıyıcı vektör elde edilir. Nükleik asit taşıyan MNP'ler, manyetofektin olarak tanımlanır. PEI'nın nitrojeni ile DNA'nın fosfat gruplarının DNA yükleme oranı, manyetofektin hazırlanmasında kullanılmakta ve ayrıca transfeksiyon başarısını da etkilemektedir. Bu oran, kısaca N/P olarak gösterilmektedir (Hinnen *et al.* 1978). Daha sonra elde edilen vektör, hedef hücreler ile bir araya getirilerek manyetik kuvvet uygulanmaktadır. Manyetik kuvvet, vektör dozunun hücreler üzerinde hızlı bir şekilde konsantre olmasını sağlayarak bu kompleksleri hedef hücrelere doğru hareket ettirmektedir (Plank *et al.* 2011). NP boyutunun küçük olması endositoz mekanizmasını hızlandırmaktadır (Rejman *et al.* 2004). Bu şekilde hızlı ve yüksek etkinlikte nükleik asit aktarımı gerçekleştirilmektedir (Wang *et al.* 2009; Arsianti *et al.* 2010). Bu yöntemde, diğer viral olmayan vektörlere kıyasla oldukça kısa sürede ve düşük DNA miktarı (10 ile 100 kat daha az nükleik asit kullanımı) ile uygulama yapılmaktadır. Transfeksiyon/transdüksiyon etkinliği en yüksek olan metot olarak bilinen bu yöntemin, transfeksiyonu zor olan hücreler ve birincil hücreler üzerinde güçlü etki gösterdiği bilinmektedir (Smolders *et al.* 2018).

MNP'nin manyetofeksiyon işlemlerinde kullanılabilmesi için;

- I. MNP'ler, nükleik asit (NA) veya vektör DNA ile etkileşim kurabilecek özellikte olmalı ve bu etkileşim NA veya vektörde herhangi bir değişikliğe sebep olmamalıdır.
- II. MNP'lerin manyetik özellikleri, makul manyetik alan etkisi ile nükleik asit veya vektörün hücre içerisine geçmesini sağlamalıdır. Makul manyetik alan, hücrelere zarar vermeyecek ölçü anlamına gelmektedir.
- III. MNP'lerin fiziksel ve kimyasal kararlılık süreleri 6 aydan uzun olmalıdır.
- IV. Hem MNP'ler hem de yapılan yüzey kaplamaları biyouyumlu olmalıdır (Mykhaylyk *et al.* 2007).

Manyetofeksiyon işlemi dahil diğer biyomedikal uygulamalarda MNP'lerin kullanılabilmesi için partikül yüzeyini amaca uygun hale getirmek çok önemlidir. Bu

amaçla seçilecek olan molekül, DNA ile yüksek oranda etkileşmeli, hücre içinde DNA'dan kolayca ayrılmalı ve canlı için çok düşük toksik etkiye sahip olmalıdır (Akinc *et al.* 2005; Varkouhi *et al.* 2011; Benjaminsen *et al.* 2013; Yang *et al.* 2015). Bu nedenle, MNP'nin yüzey özellikleri, doğal polimerler (proteinler ve karbonhidratlar), sentetik polimerler (polietilenimin, polietilen glikol, polivinil alkol, poli-L-laktik asit), silika ve altın gibi inorganik materyaller, anyonik yüzey aktif maddeleri (oleik asit), iyonik olmayan suda çözünür bir yüzey aktif maddesi, proteinler (serum albümin, streptavidin), transfeksiyon reaktifi ve virüsler (adenovirüs, retrovirüs) kullanılıp fonksiyonelleştirilerek istenilen özellikleri taşıyan yapılar geliştirilmektedir (Hashimoto and Hisano 2011; Kami *et al.* 2011; Baeza *et al.* 2012; Cui *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2015).

Manyetofeksiyon işleminde, nükleik asitlerin yapısındaki fosfat gruplarından dolayı negatif yüklü olması nedeniyle pozitif yüzeye sahip olan MNP'ler hazırlanmaktadır. Ayrıca nükleik asitlerin, MNP'ye bağlanma oranını arttıran ve transfeksiyon başarısını güçlendiren yardımcı yapılar (enhansır) da kullanılmaktadır (Mykhaylyk *et al.* 2007). Yukarıda verilen kaplama ajanlarından yüksek transfeksiyon etkinliğine sahip olduğu bilinen katyonik bir gen taşıyıcısı olan polietilenimin (PEI), MNP'ler ile birlikte kullanılmaktadır (Akinc *et al.* 2005; Varkouhi *et al.* 2011; Benjaminsen *et al.* 2013). PEI, dallanmış uzun zincirli forma sahip olduğundan sağladığı ekstra boş alanlara yeni moleküllerin bağlanabilmesine olanak sağlaması gibi avantajlarından dolayı moleküler modifikasyonda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca PEI, yapısındaki amin gruplarından dolayı floresan işaret gibi farklı moleküllerle modifiye edilmektedir (Steitz *et al.* 2007). PEI, NP'lere elektrostatik kuvvetler veya Van der Waals etkileşimleri ile bağlanmaktadır. Elde edilen polietilenimin kaplı NP boyutu ne kadar küçük ve biyolojik sıvılarda dağılımı ne kadar iyi olursa artan yüzey alanı nedeniyle DNA bağlama kapasitesi de o kadar fazla olmaktadır. Böylece daha yüksek transfeksiyon etkinliği elde edilebilmektedir (Steitz *et al.* 2007).

Verimli gen aktarımı, terapötik DNA'yı hücre içinde bozulmadan koruyabilen uygun bir taşıyıcı gerektirir. Gen aktarımı için en kapsamlı olarak incelenen polimerler arasında hem farklılaşmış hem de farklılaşmamış hücrelerde yüksek transfeksiyon etkinliği

gösteren PEI (Şekil 1.3), gen transferi çalışmalarında *in vitro* ve *in vivo* uygulamalarda büyük ölçüde kullanılmaktadır (Aravindan *et al.* 2009). PEI, Yüksek pozitif yüzey yüküne sahip olduğu için negatif hücre zarıyla kolay bir şekilde etkileşime girip hücre alımı arttırdığı da bilinmektedir (Schillinger *et al.* 2005; Hoskins *et al.* 2012). Endositoz yoluyla hücreler tarafından kolaylıkla alınmakta ve endozomdaki PEI polipeksleri, PEI polimer zincirindeki sekonder ve tersiyer amin gruplarının protonlanması yoluyla proton süngeri olarak hareket etmektedir. Protonların endozomdaki karşı iyonları ile birlikte birikmesi, endozom içindeki yüksek ozmotik basıncı dengelemek için sitozolden suyun girişini uyarmakta ve PEI varlığında endozomun şişmesi sonucu patlayarak PEI polipekslerinin sitozole salınmasına yol açmaktadır (El-sayed *et al.* 2009). “Proton sünger etkisi” adı verilen bu mekanizma ile DNA’nın endozomal degradasyondan kaçarak sitoplazmaya geçişini sağlamaktadır (Akinc *et al.* 2005; Aravindan *et al.* 2009; Varkouhi *et al.* 2011; Benjaminsen *et al.* 2013). PEI’nin avantajları Şekil 1.3’te verilmiştir.



Şekil 1.3. PEI’nin avantajları

1.3. Mayalara Gen Aktarımı

Transformasyon terimi, *Pneumococcus*'un bazı özelliklerinde kalıtsal değişiklikleri tanımlamak için ilk önce Griffith tarafından kullanılmıştır ve günümüzde fenotipte gözlenen değişiklikler ile tespit edilen hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda DNA alımını ifade etmek için de kullanılmaktadır (Gietz and Woods 2001). Her bir mikrogram DNA için transformant sayısını ifade etmek için “transformasyon etkinliği” terimi kullanılırken, canlı hücre sayısı başına düşen transformasyon etkinliğini ifade etmek için ise “transformasyon sıklığı” terimi kullanılmaktadır (Kawai *et al.* 2010).

Transformasyon, ekzojen (yabancı/dış kaynaklı) DNA'nın bir hücrenin içine girmesiyle genetik modifikasyona neden olan önemli bir tekniktir. Tomurcuklanan maya olan *Saccharomyces cerevisiae*'nin sferoplastları, ilk kez 1978'de başarıyla transforme edilmiştir (Hinnen *et al.* 1978). Şimdiye kadar lityum, elektroporasyon, biyolistik ve cam boncuk yöntemleri ile hücreleri transforme etmek için çeşitli yöntemler geliştirilmiş ve her yöntemin etkinliği belirlenmiştir (Ito *et al.* 1983; Hashimoto *et al.* 1985; Costanzo and Fox 1988; Johnston *et al.* 1988; Delorme 1989; Armaleo *et al.* 1990; Gietz and Woods 2002; Yoshiyuki *et al.* 2002; Suga and Hatakeyama 2003). Bu yöntemlerin *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* ve *Pichia pastoris* mayalarında olduğu gibi diğer filamentli mantarların (örn., *Aspergillus* türleri) transformasyonu için de kullanılabilir olduğu (Cregg *et al.* 1985; Okazaki *et al.* 1990; Sánchez and Aguirre 1996; Barcellos *et al.* 1998; Thompson *et al.* 1998; De Backer *et al.* 1999; Gouka *et al.* 1999; Suga and Hatakeyama 2003; Wu and Letchworth 2004), ancak bu mantarların transformasyon verimliliğinin genel olarak *S. cerevisiae*'ninkinden daha düşük olduğu bildirilmiştir (Kawai *et al.* 2010). Mantar transformasyonunun başarılı olması için ekzojen DNA, hücre duvarı ve plazma zarından geçmeli ve sitozole kavuşturulduktan sonra çekirdeğe ulaştırılmalıdır. Bunun için şimdiye kadar literatürde mantarlara gen aktarımı için çeşitli transformasyon yöntemleri denenmiştir. Bu yöntemlerden ekzojen DNA'nın hücre duvarından geçmesine gerek duymayan sferoplastların transformasyonu yönteminde, protoplast elde etmek için maya hücresi duvarının enzimatik yolla parçalanması, ilk olarak 1957'de Eddy ve Williamson tarafından rapor edilmiştir (Hinnen

et al. 1978). Bu yöntemde, öncelikle hücre duvarının enzimatik (litikaz enzimi ile) olarak yıkımı gerçekleştirilir (Gietz and Woods 2001). İşlem sonrası elde edilen sferoplastlar toplanır ve toplanan sferoplastlara gen aktarımı yapılabilir. Bunun için sorbitol, Tris-HCl ve CaCl_2 içeren bir tampon ortamına, geni içeren plazmiti genoma ulaştıracak taşıyıcı bir DNA'ya ve bu işleme yardımcı olacak polietilen glikol (PEG800) gibi kimyasal bir ajana ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yöntemle yapılan bir çalışmada transformasyon etkinliği, 30-50 stabil transformant/ μg DNA olarak belirlenmiştir (Hinnen *et al.* 1978).

Maya hücrelerine gen aktarımı için geliştirilen lityum metodu, 1983 yılında yayınlanmıştır. Önemli bulgular arasında Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , özellikle Li^+ gibi tek değerlikli kationların ve Ca^{+2} (*E. coli* transformasyonu için etkili olan) gibi iki değerlikli kationların *S. cerevisiae* hücrelerinin transformasyon verimliliğini arttırdığı bulunmuştur (Ito *et al.* 1983). Bu tek değerlikli kationların etkili olmasının nedeni, transformasyon sırasında hafif kaotropik etkilere atfedilebilir. Yapılan bir çalışmada, lityum asetatın (LiAc), lityum klorürden (LiCl) 1,7 kat daha etkili olduğu bulunmuştur.

Lityum kullanılarak maya hücrelerinin transformasyonu için geliştirilen bu protokolda;

- I. Hücrelerin polietilen glikol (PEG) ile inkübasyonunun ve plazmit DNA'nın transformasyon için gerekli olduğu,
- II. Plazmit DNA ilave edilen hücre solüsyonunun 42 °C'de (ısı şoku) inkübasyonunun transformasyon verimliliğini arttırdığı,
- III. Hücrelerin transformasyonunun orta logaritmik (mid-log) fazında en verimli olduğu ve bu yöntemin etkinliğinin yaklaşık 450 transformant/ μg plazmit DNA olduğu bildirilmiştir.
- IV. Sferoplast yönteminden daha hızlı, daha basit ve daha kolay olduğundan ve özel ekipmana ihtiyaç duymadığından popüler hale geldiği bildirilmiştir.

Gen aktarım yöntemlerinden LiAc, ısı şoku ve PEG'in sağlam hücrelerin ve sferoplastların transformasyonu üzerindeki etkileri Çizelge 1.6'da verilmiştir (Kawai *et al.* 2010).

Çizelge 1.6. LiAc, ısı şoku ve PEG'in sağlam hücrelerin ve sferoplastların transformasyonu üzerindeki etkileri

YÖNTEM	SAĞLAM HÜCRELER	SFEROPLASTLAR
LiAc	-Transformasyon verimliliğini ve sıklığını artırır (zorunlu olmasa da). -Sağlam hücrelerin geçirgenliğini artırır.	Transformasyon sıklığı üzerinde etkisi yoktur.
ISI ŞOKU	-Transformasyon verimliliğini artırır (zorunlu olmasa da). -Sağlam hücrelerin geçirgenliğini artırır.	Transformasyon etkinliği üzerinde etkisi yoktur.
PEG	-Transformasyon verimliliği için zorunludur. -Ön inkübasyon, transformasyon verimliliğini ve sıklığını artırır. -Sağlam hücrelerin geçirgenliğini artırır. -DNA bağlanması için zorunludur.	-Transformasyon sıklığı için zorunlu olmasa da frekansı artırır. -DNA bağlanması için zorunludur.

Elektroporasyon yöntemi, ilk olarak Neumann ve arkadaşları tarafından fare hücrelerine DNA alımını uyarmak ve transformasyonu gerçekleştirmek için kullanılmıştır (Neumann *et al.* 1982). Bu yöntem günümüzde hayvan ve bitki hücrelerinin transformasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır ve birçok laboratuvar da bakteri transformasyonunda da sıklıkla kullanılan standart bir prosedürdür (Potter *et al.* 1984; Miller *et al.* 1988). Elektrik akımının, hücre zarında geçici olarak gözenek oluşturduğunu ve makromoleküllerin bu gözeneklerden girişine izin verdiği düşünülmektedir (Potter 1993). Elektroporasyon, ilk olarak Karube ve arkadaşları tarafından maya sferoplastlarına, Hashimoto ve arkadaşları tarafından ise işlem görmemiş (sağlam) maya hücrelerine uygulanmıştır (Hashimoto *et al.* 1985; Karube *et al.* 1985). Rech ve arkadaşları, hem halkasal hem de lineer maya yapay kromozomlarının, elektroporasyon yöntemiyle maya hücrelerine gen aktarımı yapılabildiğini ve transfeksiyon etkinliğinin ise 325 transformant/ μ g olduğunu bildirmiştir (Rech *et al.* 1989). Elektroporasyon, LiAc/ssDNA/PEG veya sferoplast transformasyon yöntemlerinden daha az zaman almaktadır, ancak başlangıç maliyeti daha yüksektir (Gietz and Woods 2001).

Cam boncuk yönteminde ise *S. cerevisiae* hücrelerinin taşıyıcı DNA ve plazmit DNA'nın varlığında cam boncuklar ile karıştırılarak düşük verimlilikte (yaklaşık 300 transformant/ μ g plazmit DNA) transforme edilebileceği bildirilmiştir (Costanzo and Fox 1988). Bu yöntem, elektroporasyona göre daha az zaman gerektirdiği için iyi bir alternatif

olmakla birlikte mevcut kullanımdakilere göre düşük etkinlik göstermektedir (Gietz and Woods 2001).

Biyolistik (bombardıman) yöntemi ile de maya hücrelerine gen aktarımı yapılabilmektedir. Bu yöntemde, lityum ve sferoplast yöntemlerinden farklı olarak hücrelerin orta-durağan fazda en etkili olduğu bildirilmiştir. DNA'yı kaplamak için test edilen metaller (W, Pt, Fe, Au ve Ir) arasında tungsten (W) en fazla etkili olandır. Kararlı nükleer transformantlar, 0,5–0,65 µm çapındaki tek bir partikülün penetrasyonu ile elde edilir. Bu yöntemde tungsten kaplamak için plazmit DNA'ya uygun miktarda CaCl₂ ve spermidin eklenmesi önemlidir. Bununla birlikte, optimal koşullar, 10⁸ hücreden sadece 500 transformant/µg plazmit DNA'sı vermektedir. Yani transformasyon etkinliği oldukça düşüktür (Armaleo *et al.* 1990).

Transformasyon yöntemlerinden olan sferoplast, lityum katyonu ve elektroporasyon birçok farklı maya türüne başarılı bir şekilde uygulanmıştır. *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces spp*, *Yamadazyma ohmeri* ve *Schwanniomyces occidentalis* de bunlar arasında bulunmaktadır (Gietz and Woods 2001). Mayalara gen aktarımında kullanılan yöntemlerin avantaj ve dezavantajları Çizelge 1.7'de verilmiştir.

Çizelge 1.7. Gen aktarım yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları

YÖNTEM	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
SFEROPLAST	•YAC'lar gibi büyük DNA yapılarının verimli transformasyonu gerçekleştirilir. •Özel ekipman gerektirmez. •Düşük maliyetlidir.	•Hücreler gece boyunca büyütülmelidir. •Hücre ozmotik olarak nötr destekleyici ortamda kaplanmalıdır. •Transformasyon etkinliklerinde türe özgü varyasyon gözlenir. •Optimize etmek zordur. •Uzun protokol içerir.
LiAc/ssDNA/PEG	•En verimli prosedürdür (Büyük DNA yapıları hariç) •Özel ekipman gerektirmez. •Basit protokol içerir. •Kolayca optimize edilebilir. •Dondurulmuş hücreler kullanılabilir. •Düşük maliyetlidir.	•Hücreler gece boyunca büyütülmelidir (Eğer dondurulmuş hücre yoksa). •Transformasyonda suşa özgü varyasyon gözlenir.
ELEKTROPORASYON	•Verimli prosedürdür (Büyük DNA yapıları hariç) •Kısa protokoldür. •Kolayca optimize edilebilir. •Dondurulmuş hücreler kullanılabilir.	•Önemli kurulum maliyeti gerektirir. •Hücreler gece boyunca büyütülmelidir (Eğer dondurulmuş hücre yoksa) •Transformasyon etkinliklerinde türe özgü varyasyon gözlenir.
CAM BONCUK METODU	•Basit protokol içerir. •Düşük maliyetlidir.	•Düşük verimde transformasyon gözlenir. •Hücreler ozmotik desteğe ihtiyaç duyar.
BİYOLİSTİK TRANSFORMASYON	•Transformasyon nispeten verimli gerçekleşir. •Mitokondri transforme edilebilir.	•Yüksek kurulum maliyeti gerektirir. •Verimliliği belirlemek zordur. •Kullanılacak mermilerin hazırlanması gerekmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bu tez çalışmasının konu kapsamına giren ve literatürde yer almış olan çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Zupan *et al.* (2004), yaptıkları çalışmada deniz anası GFP (Green Fluorescent Protein; yeşil floresan protein) genini, sferoplast yöntemiyle uygun protokolü takip ederek *P. pastoris* X-33 genomuna entegre etmiş ve bu maya hücrelerinde GFP'nin ekspresyonunu gerçekleştirmiştir.

Abdelmoula-Souissi *et al.* (2007), tümör baskılamada anahtar bir protein olan insan tümör supresörü P53 genini taşıyan rekombinant vektörü elektroporasyon metodu ile maya hücrelerine göndermiş, metanolla uyarılabilen AOX1 promotörü arkasına yerleştirdiği genin, *P. pastoris* tarafından intrasellüler ve ekstrasellüler ekspresyonunu bildirmiştir.

Li *et al.* (2011), büyüme faktörü olan insan interlökin-3 (IL-3) genini pPICZaA vektörüne klonlamış, elde ettikleri rekombinant vektörü maya hücrelerine elektroporasyon ile göndermiş ve dört gün boyunca gerçekleştirilen metanol indüksiyonunun ardından yüksek seviyede rekombinant IL-3 üretimini gerçekleştirmiştir.

Chen *et al.* (2012), *Aspergillus fumigates*'in kitosanaz üretimi ile ilgili genini, bir maya ekspresyon vektörü olan pHBM905A'ya klonlamış ve elde ettiği rekombinant vektörü LiCl metodu ile maya genomuna entegre etmiştir.

Jia *et al.* (2012), hipertermofilik *Thermotoga maritima*'daki ikinci ksilanaz geninde (*xynB*) %10'dan daha az kullanıma sahip olan TCG (Ser), CTC (Leu), AGC (Ser) ve GCG (Ala) kodonlarını, *P. pastoris*'in kodon kullanımına göre sıkça kullanılanlarla yer değiştirerek optimize etmiş ve kodon optimizasyonu sonucu doğal gen dizisinin %77,8'inin korunduğunu ve G+C içeriğinin %42,7'den 43,1'e değiştiğini ifade etmiştir. Kodon optimize edilmiş geni (*xynBop*), pPIC9K plazmitine klonlamış ve rekombinant

plazmiti GS115 suşuna elektroporasyon yöntemi ile transfer etmiştir. 5 L'lik bir fermentörde gerçekleştirilen 228 saatlik bir metanol indüklemesinden sonra, kültür sıvısındaki ksilanaz konsantrasyonunun, 10,1 g/L'lik toplam protein konsantrasyonu ile aktivitenin 40020 U/mL'ye ulaştığını göstermiştir. Sonuç olarak, doğal protein ifadesine kıyasla, optimize edilmiş protein ifadesinin 2,8 kat arttığını bildirmiştir.

Pickard *et al.* (2012), nöral hücre transplantasyon tedavilerinde kullanılmak üzere çok modlu MR-floresan görüntüleme ve transfeksiyon yeteneğine sahip manyetik NP'leri geliştirmek amacıyla Fe₃O₄-PEI NP'lerinin serbest amin gruplarını, hücre etiketleme uygulamaları için yaygın olarak kullanılan Rhodamine B floresan boya (RITC) ile etiketleyerek Fe₃O₄-PEI-RITC NP'leri elde etmiştir. Bu partiküllerin hücre etiketleme ve transfeksiyon yeteneklerini değerlendirmek için birincil kültürlerden türetilen astrositleri kullanmış ve hazırladıkları kompleksi manyetofeksiyon yöntemiyle astrositlere göndermiştir. Yapılan analizler sonucunda Fe₃O₄-PEI-RITC NP'lerin astrositlerde (≤ 6 günde) akut toksik etki göstermediğini, hücrelerin %100'e kadar hücresel etiketleme ile hızlı ve geniş partikül alımı gösterdiğini, partiküllerin iki modlu MR-floresans görüntülemede kullanım potansiyeline sahip olduğunu ve ek olarak, partiküllerin düşük verimde de olsa, raportör proteini kodlayan plazmitleri (yaklaşık 4 kb) astrositlere aktarabildiklerini ifade etmiştir.

Lim *et al.* (2013), bir protein kodlama geni olan RGS14 (G protein sinyalleme 14'ün düzenleyicisi)'ün ifadesini susturmak için manyetofeksiyon yöntemiyle fare makrofaj J774.A1 hücrelerine siRNA göndermiş ve etkisini gözlemlemek için transfekte hücrelerden lizat hazırlayarak Western blot analizi yapmıştır. RGS14 genine kontrol olarak FAK (fokal adezyon kinaz) proteinini kullanmış ve sonuçları karşılaştırdıklarında RGS14'ün ekspresyonunda azalma gözlemlendiğini ifade etmiştir.

Zhang *et al.* (2014), tarafından yapılan bir çalışmada, PEI kaplı olan MNP'lere DNA yüklendikten sonra PEI'nin enhansır olarak kullanılmasıyla hücrelere gönderilmesinin ardından bu uygulamanın manyetofeksiyon başarısını arttırdığını ve gönderilen plazmitin, PEI aracılığıyla çekirdeğe ulaştığı gösterilmiştir.

Wang *et al.* (2014), *Bacillus licheniformis* α -amilaz geninin *P. pastoris* kodon kullanımına göre kodon optimizasyonunu gerçekleştirmiş ve geni taşıyan rekombinant vektörü elektroporasyon yöntemi ile maya genomuna aktarmış, sonuç olarak kodon optimizasyonu işleminin gen ekspresyon seviyesini önemli düzeyde arttırdığını bildirmiştir.

Ünver vd (2015), insan paraoksonaz 1 enzimine ait geni pPICZ α A vektörüne yerleştirerek rekombinant plazmiti elde etmiş (pPICZ α A-hPON1) ve elde edilen bu plazmiti *PmeI* enzimi ile lineer hale getirerek LiCl metodu ile kompetent hale getirdikleri *P. pastoris*'e transfer etmiştir. Metanolla uyarılabilen AOX1 promotörü arkasına yerleştirdikleri genin ifadesini sağlamak için her 24 saatte bir metanol ilavesiyle indüklemeye yapmış ve hücre dışına salgılanan enzimin moleküler ağırlığını ve aktivitesini belirlemek amacıyla kültür ortamındaki süpernatantı alarak Western blot analizi ve enzim aktivite tayini yapmıştır.

Zhou *et al.* (2015), *P. pastoris*'teki *Yarrowia lipolytica* lipaz geninin üst düzey ekspresyonunu gerçekleştirmek için LIP2 geni için kodon optimizasyonu yapmış ve geni taşıyan rekombinant vektörü elektroporasyon yöntemi ile maya genomuna aktarmıştır. Yaptıkları fermentasyon çalışmaları sonrasında AOX1 promotorünün kontrolü altındaki kodon optimize edilmiş lipaz genini taşıyan rekombinant hücrelerin, diğer rekombinant hücrelere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek bir lipaz üretim kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir.

Lu *et al.* (2016), yaptıkları çalışmada *Bacillus pumilus* HBP8'e ait mutant ksilanaz geninin kodon optimizasyonunu yapıp *P. pastoris*'te ekspresyonunu gerçekleştirmiştir. Kodon optimize geni içeren rekombinant vektörü maya hücrelerine elektroporasyon yöntemi ile göndermiştir. Mutant gen ile kodon optimize geni, bu mayada eksprese ettirmiş, ürünleri verim olarak kıyaslandıklarında kodon optimizasyonu yapılan gen ürününün (ksilanaz enzimi) aktivitesinin ve gen kopya sayısının daha fazla olduğunu görmüştür.

Tu *et al.* (2016), önemli bir antiviral sitokin olan ve aynı zamanda çok çeşitli immün modüle edici özelliği bulunan bovin interferon- α (bIFN- α) genini kodon optimize etmiş (opti-bIFN- α) ve yabancı bIFN- α geni ile ekspresyon seviyelerini karşılaştırmak için elektroporasyon ile *P. pastoris* GS115 hücrelerine göndermiştir. Rekombinant suşları seçtikten sonra 72 saatlik üretime tabi tutmuştur. Sonuçları incelediklerinde hücre dışında çözünür formda bulunan opti-bIFN- α ifadesinde yabancı tipe göre yaklaşık iki kat artış gözlemlenmiş yani yabancı bIFN- α 'nın üç katı kadar eksprese edildiği, SDS-PAGE analizi ile göstermiştir. Sonuç olarak, kodon optimizasyonunun *P. pastoris*'teki protein ifadesinin kayda değer şekilde artmasında önemli bir rol oynadığını göstermiştir.

Kaishima *et al.* (2016), yaptıkları çalışmada *S. cerevisiae* hücrelerinde denizanası GFP geninin kodon optimizasyonunu yapmış ve GFP ekspresyonunu, kodon optimizasyonunu gerçekleştirmediği hücrelerle karşılaştırmıştır. Sonuçta kodon optimizasyonunun, GFP'nin ekspresyon seviyesini önemli ölçüde arttırdığını ve hücrelerin floresan yoğunluğunun, maksimum 101 kat arttığını rapor etmiştir.

Yin *et al.* (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, mezenşimal kök hücrelerine manyetofeksiyon ile gen aktarımı yapılmış ve yöntemin kök hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşma özelliklerine etki etmediği gözlenmiştir.

Yin *et al.* (2016), adipoz türevli mezenkimal kök hücrelerde (AD-MSC) TNF ile ilişkili apoptoz indükleyen ligand (TRAIL-(TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand)) kodlayan bir ısı ile indüklenebilir gen vektörünün aktarılması ve aktive edilmesi amacıyla manyetik çekirdek kabuk NP'lerini kullanmıştır. Hasarlı dokuda, doku tamirini sağlama esasına dayanarak yapılan bu çalışmada tasarlanan AD-MSC'lerin hafif manyetik hipertermiye maruz bırakılmasıyla TRAIL'in seçici ifadesi sağlamış ve sonunda, *in vitro* ve *in vivo* olarak over kanser hücresi ölümüne neden olduğunu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, sıcaklıkla indüklenebilir bir promotörü (HSP70B' ısı şok promotörü), apoptozu doğrudan etkinleştiren terapötik bir molekül olan TRAIL'i kodlayan geni ve TRAIL ile füzyon olarak salgılanan GFP protein genini taşıyan bir plazmit elde etmiş, plazmiti göndermek için taşıyıcı olarak kullanacakları manyetik NP'leri (MNP) de

sentezlendikten sonra biyo-uyumlu hale gelmeleri için partikülleri SiO₂ (silika) ile kaplamıştır. Daha sonra negatif yüklü DNA (hazırlanan plazmit) ile elektrostatik olarak etkileşmesi için silika kaplı MNP'leri, PEI (polietilenimin) ile fonksiyonelleştirerek pozitif yüzey sağlamış ve negatif yüklü DNA (plazmit) ile bir araya getirerek taşıyıcı vektörü elde etmiştir. Hazırladıkları taşıyıcı vektörü, manyetofeksiyon yöntemiyle manyetik alan etkisi altında AD-MSC hücrelerine göndermiş ve elde edilen tasarlanmış MSC'leri de önceden tümör oluşturulmuş farelerde terapi amacıyla kullanmıştır. Tasarlanmış AD-MSC'lerden seçici olarak TRAIL ekspresyonu sağlanmış ve sonuç olarak *in vivo* ve *in vitro* olarak ovaryen kanser hücrelerinin ölümü önemli ölçüde uyarılmıştır.

Zhao *et al.* (2017), mevcut genetik modifikasyon yöntemlerinden olan elektroporasyon, partikül bombardımanı, sonikasyon, *Agrobacterium* enfeksiyonu veya polen tüpü aracılı transfeksiyona alternatif olarak yeni bir yöntem olan manyetofeksiyon ile polenlere ekzojen gen aktarmaya çalışmışlardır. Pamuk polenin zar boyunca ekzojen genleri polen içine iletmeyi mümkün kılan açık yapılara sahip olduğunu teyit etmişler ve daha sonra MNP-DNA komplekslerini oluşturmuşlar ve bunları DNA taşıyıcıları olarak kullanmışlardır. MNP-DNA komplekslerini polen ile karıştırdıktan sonra, tozlaşma öncesi MNP-DNA komplekslerini, polen açıklıklarından polen içerisine yönlendirmek için bir manyetik alan uygulamışlardır. Manyetofeksiyonun ekzojen DNA'yı polene aktarıp aktarmayacağını araştırmak için MNP'lerin, konfokal mikroskop ve TEM ile polen içindeki varlığını mekansal olarak izlemişler ve MNP'lerin polen tanelerinin ve tüplerinin içinde bulunduğunu göstermişlerdir. Ekzojen genlerin manyetofeksiyon yoluyla aktarıldıktan sonra ifade edilip edilemeyeceğini test etmek için, β -Glucuronidase proteinini (GUS proteini) kodlayan bir raportör gen olan *GUS* genini içeren plazmiti (pBI121 *GUS*), MNP'ler aracılığıyla pamuk polenine göndermişlerdir. *GUS* geninin başarılı bir şekilde transfer edilmesi durumunda, *GUS* proteininin ifade edileceğini ve bu proteinin daha sonra X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid) solüsyonu ile maviye boyanabileceğini bildirmişlerdir. Optik mikroskop ile incelediklerinde, polen tanelerinin ve polen tüplerinin X-gluc ile mavi renkte boyanmış olduğu gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak, MNP-DNA komplekslerinin DNA

fonksiyonunu inhibe etmediğini ve GUS geninin gerçekten başarılı bir şekilde ifade edildiği göstermişlerdir.

Ünver vd (2018), insan telomeraz inhibitör 1 (PinX1) genini taşıyan rekombinant plazmidi (pPICZαA-hPinX1) elde ettikten sonra *PmeI* enzimi ile lineer hale getirerek LiCl metodu ile kompetent hale getirdikleri *P. pastoris*'e transfer etmişlerdir. Transformasyonun başarıyla gerçekleştirildiği kolonileri, antibiyotik içeren seçim besiyerinden alarak üreme kültür ortamına inoküle etmişler ve 48 saat boyunca metanol indüksiyonuyla hPinX1 proteinin ifadesini sağlamışlardır. Hücre içi olarak ifade edilen proteinin molekül ağırlığını Western blot analizi ile belirlemişlerdir.

Smolders *et al.* (2018), tarafından yapılan çalışmada, transfeksiyona dirençli olan merkezi sinir sistemi makrofajları olarak bilinen mikroglia (fagositik hücre) hücrelerine manyetofeksiyon yöntemiyle %34,95 etkinlikte gen aktarılmıştır.

Hu *et al.* (2019), *Thermotoga reesei*'nin ksilanaz (*xynB*) geninin ifadesini arttırmak amacıyla nadir kullanılan kodonları *P. pastoris*'in kodon kullanımına göre sıkça kullanılanlarla yer değiştirerek optimize etmişlerdir. Kodon optimize geni (*optiXynB*), güçlü bir AOX1 promotörü ile pPICZαA vektörü üzerindeki transkripsiyon sonlandırıcısı arasına yerleştirmişler ve elektroporasyon yöntemi ile *P. pastoris* X-33'e transfer etmişlerdir. Ekspresyonun ardından saflaştırılmış *optiXynB*'nin moleküler ağırlığının, önceki çalışmalarla benzer şekilde çıktığını SDS-PAGE analizi ile göstermişlerdir. Elde edilen bu sonuç, *optiXynB*'nin rekombinant *P. pastoris* tarafından başarıyla ifade edildiğini ve salgılandığını göstermiştir. *P. pastoris* pPICZαA-*optiXynB* tarafından üretilen ksilanaz aktivitesinin, *T. reesei*, *S. cerevisiae* Y294, *P. pastoris* pPICZαA-*XynB* ve benzer ksilanazlardan daha yüksek olduğu ifade etmişlerdir. Ayrıca, rekombinant *optiXynB*'nin de indüklenen kültür ortamında ana protein olduğunu göstermişlerdir.

2.1. Amaç

Bu tez çalışmasında, mayalara gen aktarımında şimdiye kadar kullanılan yöntemlere alternatif olarak, yeni bir gen aktarım yönteminin geliştirilmesi hedeflendi. Bu doğrultuda, rekombinant protein üretiminde sıklıkla kullanılan *P. pastoris* mayasına ilk defa manyetik nanopartikül aracılığıyla gen aktarımının gerçekleştirilmesi amaçlandı.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan tüm cihazlar Çizelge 3.1’de sunuldu.

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar

Kullanılan cihaz	Markası
Derin Dondurucular (-80)	Nuaire
Elektroforez Güç Kaynağı	Bio Rad
Elisa Plate Okuyucu (Mikroplaka Okuyucu)	Biotek-Epoch
Evaporatör	Heidolph - Hei-VAP(EU)
Floresans spektrofotometre	Agilent
FTIR (Bruker Vertex)	BRUKER
Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)	Hitachi HighTech HT7700
Hassas terazi	Shimadzu ATX224
Isıticılı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
Isıtmalı-Soğutmalı Çalkalamalı Karıştırıcı (İnkübatör)	JSR
Jel Görüntüleme (Chemidoc Touch)	Bio Rad
Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop	Zeiss LSM710
Mikrobiyoloji Güvenlik Kabini (Class I)	ESCO
Mikrobiyoloji Biyogüvenlik Kabini (Class II)	ESCO Class II BSC
Otoklav	Hirayama HV-50 L
PCR cihazı	Proflex-Applied Biosystems
pH metre	Mettler Toledo
Santrifüj	Hettich Rotofix 32A
Su Banyosu	Memmert
Tarama Elektron Mikroskop (SEM)	Carl Zeiss
X-Işını Difraksiyon Cihazı	Malvern Panalytical Empyrean
Zetasizer Cihazı	Malvern Zetasizer Nano Zs

3.1.2. Kullanılan kimyasallar ve kitler

Çalışmada kullanılan partiküllerin sentez aşamasında kullanılan kimyasallar, maya ve bakterilerin büyütülmesinde kullanılan besiyerler, genomik DNA ve plazmit izolasyon kiti, enzimler, DNA belirteci (Markır) ile diğer tüm kimyasallar, Invitrogen, Sigma, ThermoFisher Scientific, Intron, Fluka ve Merck firmalarından tedarik edildi.

3.1.3. Kullanılan mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılan *Escherichia coli* One Shot TOP10 bakterisi ve *Pichia pastoris* X-33 mayası, Invitrogen firmasından temin edildi.

3.1.4. Kullanılan primerler

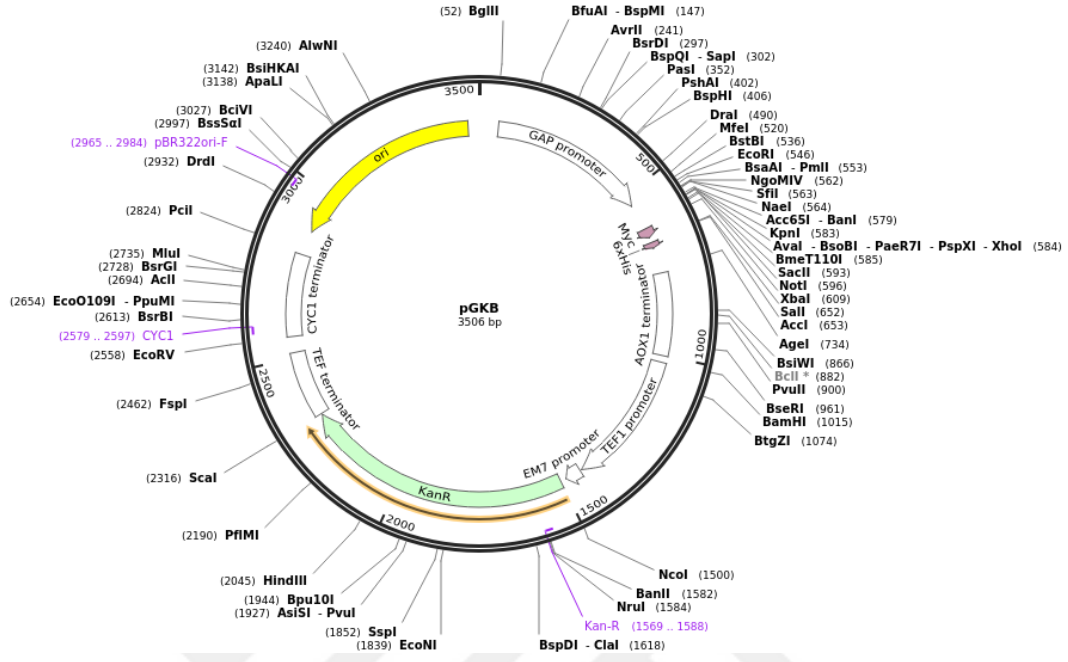
Kodon optimizasyonu yapılan *Aequorea victoria* (denizanası) yeşil floresan proteinine ait (Green Fluorescent Protein; GFP) geni, amplifiye etmek için T_m Calculator programı (www.thermofisher.com) kullanılarak dizayn edilen primerler, Çizelge 3.2’de verildi.

Çizelge 3.2. GFP geninin amplifikasyonu için dizayn edilen primerler

Primer Adı	Sekansı	T _m (°C)		%GC	Uzunluk (bp)
		Taq polimeraz	HF polimeraz		
<i>EcoRI</i> -GFP-F primer	CGC GAATTC ATGTCTAAAGGTGAAGA	57.7	60	42.31	26
<i>KpnI</i> -GFP-R primer	GG GGTACC TTTGTACAATTCATCCAT	57.2	60	42.31	26

*Altı çizili kısımlar, restriksiyon enzim tanıma bölgesini gösterir.

Çalışmada kullanılan pGKB vektör DNA’sı Addgene’den (USA, <https://www.addgene.org/85077/>) temin edildi (Şekil 3.1). Vektör DNA’ya ait primerler, Çizelge 3.3’te verildi.



Şekil 3.1. pGKB vektörü (Addgene)

Çizelge 3.3. pGKB vektörüne ait primerler

Primer Adı	Sekansı
pGAP Forward	5'-GTCCCTATTTCAATCAATTGAA-3'
3' AOX1 Reverse	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

Vektöre yerleştirilecek GFP genini kesmediği www.restrictionmapper.org adresinden tespit edilen, klonlamada ve rekombinant plazmidi lineer hale getirmede kullanılan *EcoRI*, *KpnI* ve *PagI* (*BspHI*) enzimleri ile pGKB vektör DNA'sını doğrulamak için kullanılan *HindIII* enziminin tanıma sekansları ve kesim noktaları, Çizelge 3.4'te verildi.

Çizelge 3.4. Kesim enzimlerinin tanıma sekansları ve kesim noktaları

Enzim	Hedef bölge
<i>EcoRI</i>	5'-G [^] AATTC-3'
<i>KpnI</i>	5'-GGTAC [^] C-3'
<i>PagI</i> (<i>BspHI</i>)	5'-T [^] CATGA-3'
<i>HindIII</i>	5'-A [^] AGCTT-3'

3.1.5. Kullanılan besiyeri, tampon ve çözeltiler

Transformasyon sonrası *E. coli* hücrelerinin inkübasyonu için SOC besiyeri, inkübasyonun ardından transforme edilen hücrelerin seçilimi ve çoğaltılması için kanamisin antibiyotiği içeren LB agar ve sıvı besiyeri, rekombinant vektörün *P. pastoris*'e transformasyonunun ardından hücrelerin seçilimi için genetisin antibiyotiği içeren YPD agar besiyeri ve GFP geninin ekspresyonu için YPD sıvı besiyeri kullanıldı (Invitrogen 2010). Çalışma boyunca kullanılan tüm besiyeri, tampon, çözelti ve bileşenleri, Çizelge 3.5'te verildi.

Çizelge 3.5. Kullanılan besiyeri, tampon ve çözeltiler

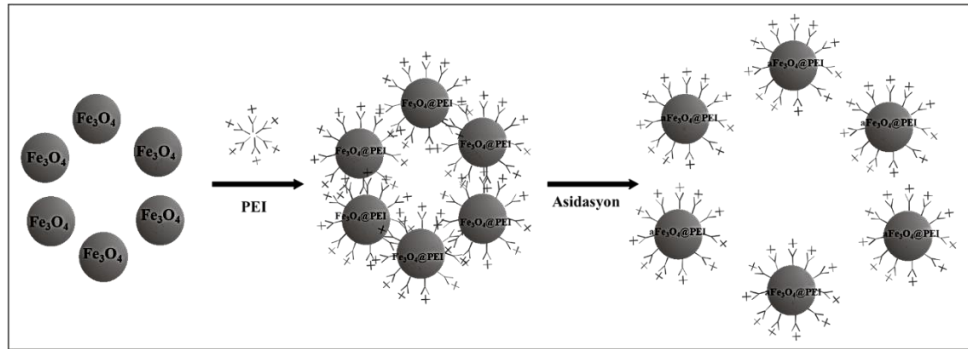
	Bileşenler
Fosfat tamponu	0,1 M KH_2PO_4 , 1 mM EDTA ve %1 glikoz
LB agar besiyeri	%1 tripton, %0,5 NaCl, %0,5 maya ekstraktı ve %1,5 agar
LB sıvı besiyeri	%1 tripton, %0,5 NaCl ve %0,5 maya ekstraktı
Maya lizis tamponu	5 mg/mL zimoliyaz, 1 M sorbitol ve 0,1 M EDTA
Parçalama (Breaking) tamponu	50 mM sodyum fosfat (pH 7,4), 1 mM PMSF (fenilmetilsülfonil florür), 1 mM EDTA ve %5 gliserol
SCED tamponu	1 M sorbitol, 10 mM sodyum sitrat (pH 7,5), 10 mM EDTA ve 10 mM DTT
SOC besiyeri	%2 tripton, %0,5 maya ekstraktı, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 ve 20 mM glikoz
YPD agar besiyeri	%1 maya ekstraktı, %2 pepton, %2 glikoz ve %2 agar
YPD sıvı besiyeri	%1 maya ekstraktı, %2 pepton ve %2 glikoz

3.2. Yöntem

3.2.1. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ MNP sentezi ve karakterizasyonu

İki boyunlu reaksiyon balonu içerisinde 2,4 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Demir III tuzu) ve 1,0 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Demir II tuzu), 30 mL deiyonize suda çözüldü ve inert atmosfer altında, en az 15 dakika bekletildi. Elde edilen karışım, inert atmosfer altında 30 dakika boyunca kuvvetlice karıştırılarak karışımın sıcaklığı 80°C 'ye çıkarıldı. Daha sonra, hızlı bir şekilde 6 mL amonyak çözeltisi (%25) ve ardından 20 mL PEI (polietileniminin; Mw ~25000, %5) çözeltisi ilave edildi. Karışım, 80°C 'de 3 saat karıştırıldı ve ardından karışımın oda sıcaklığına gelene kadar soğuması beklendi. Çöken partiküller, bir mıknatıs ile toplandı ve deiyonize su ile birkaç kez yıkandı. Yıkama işlemi, 9000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek yapıldı. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ (PEI kaplı) MNP'ler, inert atmosferde, 20 mL PBS'te (Phosphate Buffered Saline; Tamponlanmış fosfat tuz çözeltisi; pH 6,0) saklandı (Jiang *et al.* 2017).

PEI, dallı yapıya sahip olduğundan partikülleri kümeler halinde sarabilmekte ve bu durum DNA yükleme oranını düşürmektedir (Zhang *et al.* 2014). Şekil 3.2'de şematik olarak sunulan bu problem, asidasyon işlemi ile geri dönüşümsüz olarak çözülmektedir. Asidasyon ile kararlı bir MNP solüsyonu elde edilmektedir. Dolayısıyla, dallı yapının açılmasıyla ve pozitif yük sayısının artmasıyla daha fazla DNA tutabileceğinden manyetofektin hazırlamada asitleme yapılmış PEI kaplı MNP'ler ($\text{aFe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$) kullanıldı.



Şekil 3.2. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ ve $\text{aFe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ MNP'lerin şematik gösterimi

Asidasyon işlemi için 100 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ MNP, 15 mL su içerisinde dağıtıldı. pH değeri, 0,5 M HCl ile 2'ye ayarlandı ve 10 dakika boyunca karıştırıldı. Daha sonra karışımın pH değeri, 0,5 M NaOH ile 7'ye ayarlandı. Son hacmi 25 mL olan karışımdan 4 mg/mL konsantrasyonda $\text{aFe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ MNP elde edildi. Ardından, $\text{aFe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ MNP'nin şekil ve boyut gözlemi için SEM (Scanning Electron Microscopy; Taramalı Elektron Mikroskobu) ve TEM (Transmission Electron Microscopy; Geçirimli Elektron Mikroskobu) kullanıldı. MNP'lerin kristal yapısının belirlenebilmesi için XRD (X-ray Diffraction; X Işını Difraksiyonu) analizinden faydalanıldı. Bunun için örnek, XRD cihazında $\text{Cu K}\alpha \lambda=1,54 \text{ }^\circ\text{A}$ dalga boyundaki X ışınları ile 45 kV ve 40 mA koşullarında, 0,026 adımlar ile 2θ değerinin $10\text{-}90^\circ$ olduğu aralıkta tarandı. Üretilen $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ MNP'lerin suda dağılımı ve yüzey yükünün belirlenmesi için DLS (Dynamic Light Scattering; Dinamik Işık Saçılımı), fonksiyonel grupların belirlenmesi için FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy; Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) ve son olarak manyetik özelliklerinin belirlenmesi için ise VSM (Vibrating-Sample Magnetometer; Titreşimli Numune Manyetometresi) analizi kullanıldı.

3.2.2. MNP'lerin maya hücreleri tarafından alınmasının belirlenmesi

Üretilen $\text{aFe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ MNP'lerin *P. pastoris* X-33 hücreleri tarafından alınabilirliğini doğrulamak amacıyla, floresan etiket (Oregon Green™ 488 Carboxylic Acid, Succinimidyl Ester, 6-isomer, Thermo) ile işaretlenmiş MNP'ler hazırlandı. Bunun için üretici firmanın önerdiği protokol, modifiye edilerek takip edildi. Öncelikle, 1 mL $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ (12,1 mg/mL), 10000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi. Elde edilen pelet, 4 mL sodyum bikarbonat (0,1 M NaHCO_3 ; pH 8,3) tamponunda çözüldü. Üzerine dimetilformamid (100 μL) içinde çözülen Oregon Green™ 488 (1 mg), damla damla eklendi. 1 saat boyunca karanlıkta karıştırıldıktan sonra, 10304 g'de 40 dakika boyunca santrifüjlendi. Saf su ile yıkandıktan sonra bir kez de etanol ile yıkama yapıldı (10304 g'de 40 dakika). Kapağı açık bir şekilde karanlıkta kurumaya bırakıldı. Toz halindeki boyalı partiküller, inert atmosfer altında, karanlıkta ve $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

Hazırlanan partiküllerin maya hücreleri tarafından alımının doğrulanması için YPD sıvı besiyerinde büyütülen OD₆₀₀ değeri 0,7'ye ulaşan *P. pastoris* X-33 kültür sıvısından 1 mL alınarak 10000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi. Elde edilen hücre peleti, steril fosfat tamponu (%0,1 glikoz ve 1 mM EDTA içeren 100 mM fosfat buffer; pH 7,0) ile yıkanarak 10000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi (Mirek and Tecza 2014). Hücre peleti, 164 µL fosfat tamponu ile süspanse edildi. Hücre süspansiyonu, mıknatıs (NdFeB) üzerine yerleştirilen steril kuyulu plağa (well plate) alındı. Hazırlanan MNP, hücre süspansiyonuna damla damla eklendi. Plak, 15 dakika boyunca mıknatıs üzerinde bekletildi. Süre sonunda, hücreler toplanarak ependorf tüpe alındı ve 28 °C'de 180 rpm'de 2 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra floresan etiketli manyetik NP'lerin hücre içindeki varlığı, floresan mikroskopta görüntülendi.

3.2.3. MNP'lerin maya hücreleri üzerindeki toksik etkisinin araştırılması

Sentezlenen MNP'lerin hücre alımının doğrulanmasının ardından, nanopartiküllerin *P. pastoris* hücreleri üzerindeki toksisitesini incelemek amacıyla proliferasyon ve spotlama (spotting) testleri yapıldı.

Mıknatıs (NdFeB) ile hücre içerisine gönderilen MNP'lerin, maya proliferasyonu (büyümesi) üzerine etkisini gözlemlemek amacıyla 0-100 µg/mL aralığında değişen konsantrasyonlarda aFe₃O₄@PEI NP'ler, maya kültür (10⁸ hücre/mL) ortamına eklendi ve 15 dakika mıknatıs tutulduktan sonra 28 °C'de 180 rpm'de inkübasyona bırakıldı. 1, 24 ve 48 saatlik inkübasyonun ardından her bir gruptan 200'er µL alınarak spektrofotometrede (OD₆₀₀) optik dansite ölçüldü. Hücreler üzerine 200 µL YPD sıvı besiyeri eklenerek bir sonraki ölçüme kadar inkübasyona devam edildi. Mayaların şekil, büyüklük ve büyüme davranışı üzerindeki etkisini gözlemlemek amacıyla uygulama yapılmış maya hücrelerini içeren kültür sıvılarından 10'ar µL alınarak ışık mikroskopunda incelendi. Diğer yandan, proliferasyon testinde olduğu gibi nanopartikül uygulaması yapılan maya hücrelerinin büyümesini incelemek amacıyla "Spotlama testi" yapıldı (Mirek and Tecza 2014). 1, 24 ve 48 saatlik inkübasyonun ardından kültür

sıvılarından 4'er µL alınarak YPD katı besiyerine transfer edildi ve 30 °C'de inkübasyona bırakıldı.

3.2.4. Manyetofektin hazırlama ve optimizasyonu

Maya hücrelerine gen transferi için araç olarak kullanılan MNP'lere DNA bağlamak üzere süre, N/P oranı (PEI'nin yapısındaki nitrojenin (N), 1 µg DNA'nın yapısındaki fosfat gruplarına (P) olan oranı) ve MNP miktar optimizasyonu yapıldı. DNA olarak, yüksek konsantrasyonundan (10 mg/mL) dolayı salmon sperm DNA'sı (Invitrogen™) kullanılarak manyetofektin optimizasyon deneyleri yapıldı. Öncelikle, süre ve miktar optimizasyonu çalışıldı. Bunun için oluşturulan deney gruplarında eşit hacimde (12 µL) MNP, DNA ve PEI kullanıldı. Optimizasyon deneylerinde, 1 µg DNA kullanıldı. 1 µg DNA'nın 3 nmol fosfat, 43 ng PEI (1 nmol C₂H₅N tekrar birimleri) ve 0,25 nmol primer amin azotu içerdiği göz önünde bulundurularak aşağıda verilen formüle göre N/P oranı hesaplandı (Wang *et al.* 2011). Üç tekrar halinde yapılan tüm gruplarda DNA bağlayan MNP'ler, 15 dakika mıknatıs tutularak toplandı ve MNP'ler tarafından tutulmayan (bağlanmayan) DNA konsantrasyonunu belirlemek üzere, ELISA plak okuyucu (Elisa Reader; BioTek) ile ölçüm yapıldı.

N/P oranı hesaplama formülü:

$$\text{N/P oranı} \times 43,1 / 330 = \text{PEI miktarı (}\mu\text{g)} \times 1 \mu\text{g DNA}$$

3.2.4.1. Süre optimizasyonu

Optimum DNA bağlanma şartlarının belirlenmesi için öncelikle, MNP ve DNA inkübasyon süresi optimize edildi. İlk olarak, 12 µL aFe₃O₄@PEI MNP (1 µg) ve 12 µL salmon sperm DNA (1 µg) karıştırıldıktan sonra karışım, 0, 5, 10, 15, 20 ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Her bir MNP/DNA kompleksine, N/P 8 olacak şekilde eşit hacimde (12 µL) PEI solüsyonu eklendi ve pipetaj yapıldıktan sonra karışım, 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Artan inkübasyon süresi ile bağlanan DNA

miktarları karşılaştırılarak daha yüksek DNA bağlanması için gerekli olan optimum süre belirlendi.

Süre optimizasyonu ardından, eklenen PEI inkübasyon süresini tespit etmek için optimizasyon çalışması şu şekilde yapıldı; 12 μL $\text{aFe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ MNP (1 μg) ve 12 μL salmon sperm DNA (1 μg) karıştırıldıktan sonra karışım, 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Her bir MNP/DNA kompleksine, N/P 8 olacak şekilde eşit hacimde (12 μL) PEI solüsyonu eklendi ve pipetaj yapıldıktan sonra karışım, 0, 10, 15, 20 ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. PEI eklenmesinin ardından, artan inkübasyon süresi ile bağlanan DNA miktarları karşılaştırıldı ve daha yüksek DNA bağlanması için gerekli olan optimum süre belirlendi.

3.2.4.2. N/P oranı optimizasyonu

MNP'lerin, daha fazla DNA'yı bağlayabilmesi için ortama, ekstra PEI eklemek gerekmektedir (Zhang *et al.* 2014). Bunun için, 12 μL $\text{aFe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ MNP (1 μg) ve 12 μL salmon sperm DNA (1 μg) karıştırıldıktan sonra 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Eşit hacimde (12 μL) farklı oranlarda hazırlanan PEI solüsyonu (N/P oranı; 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 ve 30 olacak şekilde) MNP/DNA kompleksine eklendi ve pipetaj yapıldıktan sonra 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 3.2.4'te verilen formüle göre hesaplanan farklı N/P oranlarına göre eklenen ekstra PEI miktarları, Çizelge 3.6'da verildi (Al-Deen *et al.* 2011).

Çizelge 3.6. Farklı N/P oranlarına göre hesaplanan ekstra PEI (enhansır) miktarları

N/P	PEI (μg)
2	0,261
4	0,522
6	0,784
8	1,045
10	1,305
15	1,957
20	2,610
30	3,915

3.2.4.3. MNP miktar optimizasyonu

Manyetofektin hazırlamada son olarak, optimum MNP miktarı için optimizasyon çalışması şu şekilde yapıldı; 12 µL MNP (1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 25 µg) ve 12 µL salmon sperm DNA (1 µg) karıştırıldıktan sonra 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Her bir karışıma N/P oranı 4 olacak şekilde eşit hacimde (12 µL) PEI solüsyonu, MNP/DNA kompleksine eklendi ve pipetaj yapıldıktan sonra 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek bağlanan DNA miktarları karşılaştırıldı.

3.2.5. pGKB-GFP plazmitinin elde edilmesi

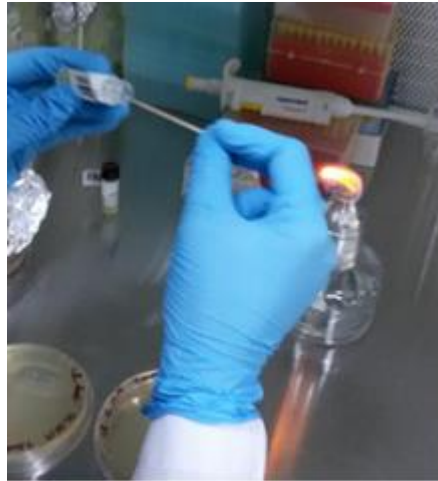
3.2.5.1. pGKB plazmitinin doğrulanması

Addgene'den temin edilen pGKB plazmitinin doğruluğunu teyit etmek amacıyla plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra hem vektöre ait primerlerle PCR reaksiyonu gerçekleştirildi, hem de vektöre ait tüm nükleotid dizisinden yola çıkılarak belirlenen farklı restriksiyon endonükleaz enzimleri ile vektör kesim reaksiyonu gerçekleştirildi.

3.2.5.1.a. *E. coli* hücrelerinden plazmit izolasyonu

Katı besiyerinde büyütülerek gönderilen pGKB plazmitini taşıyan *E. coli* hücreleri, kanamisin antibiyotiği içeren LB agar besiyerine transfer edildikten sonra (Şekil 3.3) 37 °C'de gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından bakteri hücreleri öze ile toplanarak plazmit izolasyonu için 10 mL LB sıvı besiyerine inoküle edildi ve 37 °C'de gece boyu çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. PureLink-Hi-Pure plazmit DNA saflaştırma kiti (Invitrogen) kullanılarak üretici protokolüne göre plazmit izolasyonu özetle şu şekilde yapıldı; çoğaltılan bakteri hücrelerinin OD₆₀₀ değeri 2,0 olduğunda bir mikrosantrifüj tüpüne bir gecelik kültürden 4,5 mL alınıp 4000 g'de 8 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 0,4 mL RNase içeren resüspansiyon tamponu eklenerek hücreler, homojen oluncaya kadar süspanse edildi. Üzerine 0,4 mL lizis tamponu ilave edilen lizat karışımı, yavaşça ters çevrilerek

tamamen homojen oluncaya kadar karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. 0,4 mL presipitasyon tamponu ilave edilip tüpler ters çevrilerek tamamen homojen oluncaya kadar karıştırıldı. Lizat, 16000 g'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edildi. Bu sırada kolonu hazırlamak için 2 mL dengeleme tamponu, kolona ilave edildi. Elde edilen süpernatant, dengelenen kolona yüklendikten sonra kolondaki solüsyonun yerçekimi ile akıp kuruması beklendi. Kolon 2,5 mL yıkama tamponu ile iki kez yıkandı ve her yıkamadan sonra kolondaki solüsyonun akması beklendi. Solüsyon tamamen uzaklaştıktan sonra alttaki sıvı atıldı. Kolonun altına steril bir elüsyon tüpü yerleştirildi ve kolona, 0,9 mL elüsyon tamponu eklendi. Solüsyonun kolondan tamamen akmasını bekledikten sonra kolon uzaklaştırılarak elüsyon tüpüne 0,63 mL izopropanol ilave edilip kuvvetlice karıştırıldı. Daha sonra örneğin, 16000 rpm'de 4 °C'de 30 dakika santrifüj edilmesinin ardından süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. DNA peleti, 1 mL %70'lik etanol ile süspanse edildi. 16000 g'de 4 °C'de 5 dakika santrifüj edilmesinin ardından süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. 10 dakika boyunca oda sıcaklığında kurutulan DNA peleti, 50 µL nükleaz içermeyen su ile süspanse edildi.



Şekil 3.3. Plazmit taşıyan bakterilerin besiyerine transferi

İzolasyon sonrası elde edilen plazmit DNA'ların doğruluğunu teyit etmek amacıyla jel elektroforezinde yürütülmesi için %1'lik agaroz jel hazırlandı. Jel hazırlamak için 0,8 gr tartılan agaroz, 80 mL 1xTAE içerisine alınarak mikrodalga fırında eritildi. Karışım, 35-40 °C'ye kadar soğutulduktan sonra karışıma son konsantrasyon 0,4 µg/mL olacak

şekilde RedSafe™ nükleik asit boyama tamponu (20,000x; Intron) eklenip jel katılaşmaya bırakıldı. Jelin katılaşmasını takiben plazmit, DNA yükleme boyası ile karıştırıldı ve jel kuyucuklarına yüklenerek 60 V’de 1,5 saat yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandığında bantlar, UV görüntüleme cihazı (BIO-RAD Gel Doc™ XR+) ile görüntülendi (Sambrook and Russell 2001).

3.2.5.1.b. Vektöre ait primerlerle PCR reaksiyonu

pGKB vektörünü doğrulamak için Çizelge 3.3’te verilen vektöre ait primerler (pGAP Forward ve 3’ AOX1 Reverse) kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Farklı bağlanma sıcaklığına sahip primerlerin optimum bağlanma sıcaklığını belirlemek için gradiyent PCR (48, 52 ve 56 °C) yapıldı. Gradiyent PCR reaksiyonu sonucu elde edilen ürünler, %1’lik agaroz jelde 60 V’de 1,5 saat yürütülerek görüntülendi.

3.2.5.1.c. pGKB plazmitinin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi

pGKB vektörünün doğruluğunu teyit etmek için iki ayrı kesim enzimi (*EcoRI* ve *HindIII*) kullanıldı. Kesim reaksiyonu 37 °C’de 15 dakika inkübe edilip, 80 °C’de 15 dakika inaktivasyon gerçekleştirildi. Kesilmemiş ve kesilmiş plazmitler, %1’lik agaroz jelde 60 V’de 80 dakika yürütülerek görüntülendi.

3.2.5.2. Yeşil floresan protein (GFP) geninin amplifikasyonu

Öncelikle, manyetik NP aracılığıyla *P. pastoris* hücrelerine gönderilmesi planlanan *A. victoria*’ya ait GFP genini kodlayan sekansa (GenBank: L29345.1), NCBI’den (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ulaşıldı. “Codon optimization tool” programı (<https://eu.idtdna.com/codonopt>) kullanılarak *P. pastoris*’in kodon kullanım eğilimleri tespit edildi ve optimizasyondan önceki ve sonraki kodon adaptasyon indeksi (Codon Adaptation Index; CAI) “GenScript Rare Codon Analysis Tool” programı (<https://www.genscript.com/tools/rare-codon-analysis>) kullanılarak belirlendi. Daha

sonra kodon optimizasyonu sonucu elde edilen GFP genine ait nükleotid sekansı, Sentebiolab firmasından (Ankara) sentetik olarak temin edildi.

3.2.5.2.a. PCR reaksiyonu

Elde edilen kodon optimize sekansa göre Çizelge 3.2'deki gibi dizayn edilen primerler (*EcoRI*-GFP-F ve *KpnI*-GFP-R) ile Çizelge 3.8'deki uygun PCR protokolü kullanılarak GFP geni amplifiye edildi.

Çizelge 3.7. PCR reaksiyon karışımı

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar	Miktar
Kalıp DNA (sentetik gen)	2 µL (~4,6 ng)	2 µL (~4,6 ng)
dNTP mix (40 mM)	1,6 µL	1,6 µL
MgCl ₂ (50mM)	0,3 µL	-
<i>EcoRI</i> -GFP-F primer (10 pmol/µL)	1 µL	1 µL
<i>KpnI</i> -GFP-R primer (10 pmol/µL)	1 µL	1 µL
5X füzyon HF tamponu	4 µL	4 µL
ddH ₂ O	9,9 µL	10,2 µL
*HF polimeraz	0,2 µL	0,2 µL
Toplam hacim	20 µL	20 µL

* Phusion High-Fidelity (HF) DNA Polymerase

Çizelge 3.8. PCR şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)
1	98	30
35	98	10
	60	30
	72	30
1	72	300
1	4	∞

3.2.5.2.b. PCR ürününün agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi

Elde edilen PCR ürünleri yükleme boyası ile karıştırılarak agaroz jelde 80 V'de 30 dakika yürütülerek görüntülendi.

3.2.5.2.c. PCR ürününün saflaştırılması

Restriksiyon enzimleri ile kesim öncesinde PCR ile amplifiye edilen GFP geninin saflaştırılması için MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA Purification Kiti (Intron) kullanıldı. Saflaştırma işlemi şu şekilde yapıldı; PCR reaksiyonu sonucu elde edilen PCR ürünleri, steril bir ependorf tüpte toplandı ve üzerine ürün hacminin 5 katı kadar BNL tamponu eklenerek vortekslendi. Elde edilen karışım, kolonun tam ortasına bırakıldı. Kolon, 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildikten sonra toplama tüpündeki sıvı atıldı. Aynı tüp, tekrar kolonun altına yerleştirildikten sonra kolona, 700 µL yıkama solüsyonu eklenerek 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldı ve toplama tüpündeki sıvı atıldı. Aynı tüp, tekrar kolonun altına yerleştirildi ve kolon bu kez boş olarak tekrar santrifüj edildikten sonra toplama tüpü atıldı. 1,5 mL’lik steril ependorf, kolonun altına yerleştirilerek kolonun tam ortasına 30 µL elüsyon tamponu bırakılıp, 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra kolon atıldı. Elüe edilen DNA, kullanılıncaya kadar +4 °C’de bekletildi. Saflaştırma sonucunda nanodrop spektrofotometrede ölçüm yapılan PCR ürünü, kesim için kullanıldı.

3.2.5.2.d. PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi

Kesim enzimlerinin tanıma sekanslarını içeren GFP genine ait PCR ürünü, saflaştırıldıktan sonra www.restrictionmapper.org adresinden kodon optimize geni kesmediği tespit edilen *EcoRI* ve *KpnI* enzimleri ile kesildi. PCR ürünü kesim reaksiyonu karışım içeriği Çizelge 3.9’da verildi.

Çizelge 3.9. PCR ürünü kesim reaksiyonu karışım içeriği

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar
ddH ₂ O	16 µL
10xFast Digest tamponu	2 µL
DNA (PCR ürünü)	10 µL (~200 ng)
Fast Digest <i>EcoRI</i>	1 µL
Fast Digest <i>KpnI</i>	1 µL
Toplam hacim	30 µL

Hazırlanan karışım, 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi ve 80 °C’de 5 dakika enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi.

3.2.5.2.e. PCR ürünlerinin fenol-kloroform ekstraksiyonu

EcoRI ve *KpnI* enzimleri ile kesilen DNA solüsyonu, nükleaz içermeyen su ile 100 µL’ye tamamlanıp üzerine yarım hacim fenol/kloroform/izoamil alkol (25/24/1) ilave edilerek 20 sn vortekslenip, 14500 rpm’de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edildi. Ardından üst faz, temiz bir tüpe alınarak alınan fazın 1/10 hacmi kadar 3 M sodyum asetat ve 2,5 hacim saf etanol eklendi. Vorteksleme işleminin ardından, 14500 rpm’de 5 dakika santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak elde edilen pelet, TE (Tris EDTA) tamponunda çözüldü (Kaymak 2008).

3.2.5.2.f. Vektör DNA (pGKB)’nın restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi

Rekombinant plazmiti elde etmek için GFP geninin kesiminde kullanılan enzimlerle (*EcoRI* ve *KpnI*) pGKB vektör DNA’sının kesimi yapıldı. Kesim için Çizelge 3.10’daki reaksiyon karışımı kullanıldı. Kesilen plazmitin 5’ ucundaki fosfat grupları, CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) enzimi ile uzaklaştırıldı.

Çizelge 3.10. Vektör DNA’nın kesim reaksiyonu karışım içeriği

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar
ddH ₂ O	20 µL
10xFast Digest Green tamponu	3 µL
Vektör DNA	4 µL (~1µg)
Fast Digest <i>EcoRI</i>	1,5 µL
Fast Digest <i>KpnI</i>	1,5 µL
Toplam hacim	30 µL

Hazırlanan karışım, 37 °C’de 30 dakika inkübe edilip, 80 °C’de 5 dakika enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi. Ardından 1µL CIAP ilave edilerek 50 °C’de 60 dakika

inkübe edildi. Reaksiyon sonucu lineer hale getirilen plazmit, %1 'lik agaroz jelde 60 V'de 1,5 saat yürütülerek kesilip kesilmediği teyit edildi.

3.2.5.2.g. Vektör DNA'nın jelden ekstraksiyonu

Kesim reaksiyonu sonrası agaroz jele yüklenip yürütülen örnek, jelden ekstrakte edilerek hem CIAP uzaklaştırılmış hem de kesilen vektör DNA saflaştırılmış oldu. Bu işlem için PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) kullanıldı. İşlem şu şekilde gerçekleştirildi; agaroz jelde yürütülen ve UV ışık altında görülen bantlar, bant kesme aparatı ile jelden kesildikten sonra alınan bantların ağırlığı tespit edilerek her 100 mg jel için 300 µL jel çözme solüsyonu ilave edilip karışım, her 2-3 dakikada bir vortekslenerek 50 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Kolon, 2 mL'lik ependorf tüpüne yerleştirilerek üzerine 500 µL kolon hazırlama solüsyonu ilave edildi. Tüplere, bir jel hacmi kadar saf izopropanol ilave edilip homojen hale gelinceye kadar karıştırıldı. Elde edilen karışım, hazırlanan kolona aktarılıp, 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra sıvı kısım uzaklaştırıldı. Üzerine 500 µL yıkama solüsyonu ilave edilerek 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı ve kolona ekleme yapılmadan 20000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolon, yeni bir tüpe alınarak üzerine 50 µL elüsyon tamponu eklendi. 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra ligasyon reaksiyonunda kullanılmak üzere saf olarak elde edilen vektör DNA'nın miktarı, nanodrop spektrofotometre ile belirlendi.

3.2.5.2.h. Ligasyon reaksiyonu

Vektöre yerleştirilecek (insört) gen ve vektör DNA, aynı restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra reaksiyon karışımına, gen ve vektör DNA eşit hacimde olacak şekilde ilave edildi. Ligasyon reaksiyon karışımı Çizelge 3.11'de verildi (Büyüksungur 2006). Reaksiyon, 16 °C'de 16 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

Çizelge 3.11. Ligasyon reaksiyonu

Ligasyon reaksiyon karışım içeriği	Miktar
10X ligasyon tamponu	4 µL
İnsört DNA (GFP geni)	5 µL
Vektör DNA (pGKB)	5 µL
T4 DNA ligaz	1,5 µL
ddH ₂ O	5 µL
Toplam hacim	20,5 µL

3.2.5.2.i. *E. coli* One Shot TOP10 hücrelerinin transformasyonu

Bir önceki basamakta elde edilen ligasyon ürününün bakteri hücrelerine transfer edilmesi için -86 °C'den alınan kompetent bakteri hücreleri, buz üzerinde çözülüp üzerine 5 µL ligasyon ürünü (10 pg-100 ng) ilave edildi. Tüp, yavaşça karıştırıldıktan sonra buz üzerinde 30 dakika inkübe edildi. Isı şoku için hücreler çalkalamadan 42 °C'de 30 sn bekletildi. Süre sonunda, 42 °C'den alınarak buz üzerinde 2 dakika bekletildikten sonra tüpe steril ortamda önceden ısıtılan SOC besiyerinden 250 µL ilave edildi. Kapağı sıkıca kapatılarak çalkalamalı inkübatörde, 37 °C'de 225 rpm'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Önceden ısıtılmış LB-kanamisin seçim plaklarına, transformasyon karışımından 150 µL yayılarak 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı (Invitrogen 2010).

3.2.5.2.j. GFP genine ve vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak ilgili sekansların koloni PCR ile amplifikasyonu

İnkübasyon sonrası gelişen kolonilerden 15 tanesi seçilip, GFP genine ait primerler kullanılarak koloni PCR yapıldı. PCR reaksiyonu kurmak için koloniden mikropipet ucu ile çok küçük miktarda alınarak pipet ucu, PCR reaksiyon karışımı üzerine yerleştirilip, etrafında sabitçe çevrildikten sonra PCR reaksiyonu başlatıldı (Kaymak 2008). Reaksiyon sonrası elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütüldü. Koloni PCR için reaksiyon karışım içeriği ve PCR reaksiyon şartları Çizelge 3.12 ve Çizelge 3.13'te verildi.

Çizelge 3.12. Koloni PCR için reaksiyon karışım içeriği

PCR reaksiyon karışım içeriği	Miktar
dNTP mix (10 mM)	0,8 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1 µL
<i>EcoRI</i> -GFP-F primer / pGAP-F primer (10 pmol/µL)	1 µL
<i>KpnI</i> -GFP-R primer / 3' AOX-R primer (10 pmol/µL)	1 µL
10xPCR tamponu	1 µL
ddH ₂ O	6,6 µL
Taq DNA polimeraz	0,6 µL
Toplam hacim	12 µL

Çizelge 3.13. PCR reaksiyon şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
1	94	10
35	94	1
	56	1
	72	1
1	72	5
	4	∞

Reaksiyon sonucu elde edilen PCR ürünleri, %1'lik agaroz jelde, 80 V'de 45 dakika yürütülerek görüntülendi. GFP genine ait primerlerle yapılan koloni PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntülemesi sonucu seçilen koloniler (2, 8, 9, 11, 13, 14) kullanılarak vektör primerleri ile koloni PCR yapıldı. Reaksiyon sonucu elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 60 V'de 1,5 saat yürütülerek görüntülendi.

3.2.5.2.k. Muhtemel rekombinant vektörün sekans analizi ile doğrulanması

Klonlamanın doğruluğunu kontrol etmek için LB-kanamisin sıvı besiyerlerinde çoğaltılan 2. ve 8. kolonileri oluşturan bakterilerden plazmit izolasyonu yapıldı. Her iki koloniye ait plazmitlerden eşit miktarda (200 ng/µL) agaroz jele yüklenip 60 V'de 1,5 saat yürütülerek görüntülendi. Her iki koloniye ait saf olarak elde edilen plazmitlerin vektör primerleri ile çift yönlü Sanger sekans analizi, MedSanTek firması (İstanbul) tarafından yapıldı.

3.2.6. pGKB-GFP plazmitinin maya hücrelerine transferi

3.2.6.1. Manyetofektin hazırlama

GFP geninin manyetik NP aracılığıyla maya hücrelerine transferi için $\alpha\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ MNP ve rekombinant plazmit DNA (pGKB-GFP) ile manyetofektin hazırlama ve optimizasyon basamağında elde edilen tüm optimize şartlarda manyetofektin hazırlandı. DNA yüklü NP'lerin kararlılığının, suda dağılımının ve yüzey yükünün belirlenmesi amacıyla hazırlanan manyetofektin örnekleri, DLS (Dynamic Light Scattering; Dinamik Işık Saçılımı) analizine tabi tutuldu. Halkasal DNA ile doğrulamadan sonra pGKB-GFP vektörü lineer hale getirilerek aynı optimize şartlarda manyetofektin hazırlandı. Analiz sırasında manyetofektinin farklı sürelerdeki davranışını incelemek için örneklerin zeta potansiyelleri ölçüldü.

3.2.6.2. Halkasal rekombinant plazmitin transfer edilmesi

Farklı N/P oranlarının hücre alım üzerinde bir etkisinin olup olmadığını test etmenin yanı sıra kodon optimize GFP geninin ifadesini doğrulamak için halkasal rekombinant plazmit (pGKB-GFP) kullanılarak elde edilen optimum şartlarda hazırlanan manyetofektin örnekleri, Şekil 3.4'te gösterildiği gibi mıknatıs aracılığıyla YPD sıvı besiyerinde büyütülen *P. pastoris* hücrelerine gönderildi. Transformasyon sonrası hücreler, 28 °C'de 180 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Kontrol grubu olarak GFP genini içermeyen pGKB vektörü ile manyetofektin hazırlandı. 48 saat inkübasyonun ardından hücre içinde üretilen GFP miktarlarını karşılaştırmak amacıyla hücre lizatı hazırlanarak floresan spektrofotometrede (uyarma dalga boyu; EX, 488 nm; emisyon filtresi; Em, 507 nm) ölçüm yapıldı. Hücre lizatı şu şekilde hazırlandı; 6 mL kültür sıvısı steril tüpe alınarak 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjle çöktürüldükten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet üzerine proteaz inhibitörü (PMSF) içeren 600 µL parçalama tamponu eklenerek vortekslendi. Karışım hacmini 2 katına çıkaracak kadar asitle yıkanmış cam boncuk eklendikten sonra, 8 kez 30 sn vorteksleme ve 30 sn buzda bekletme ile hücre peletinin parçalanması sağlandı. Daha sonra 10000 rpm'de +4 °C'de 5 dakika santrifüj

edilerek süpernatantlar temiz tüpe alındı. Örnekler, floresan spektrofotometrede ölçüm yapılmaya kadar buz üzerinde bekletildi.



Şekil 3.4. Manyetofektinin mıknatıs aracılığıyla *P. pastoris*'e transferi

Bu aşamada ayrıca pGKB ve pGKB-GFP ile hazırlanan manyetofektinin (N/P 4) maya hücreleri üzerine toksik etkisinin olup olmadığını belirlemek için transformasyon sonrası inkübasyona bırakılan hücrelerden 24 ve 48 saat sonra örnekler alınarak YPD agar besiyerinde spotlama testi yapıldı.

3.2.6.3. Lineer rekombinant plazmitin transfer edilmesi

Maya hücrelerinin genomuna GFP geninin entegrasyonu için rekombinant plazmit (pGKB-GFP), *PagI* (*BspHI*) restriksiyon endonükleaz enzimi ile GAP promotöründen kesilerek lineer hale getirildi. Reaksiyon için kesim enzimi olarak sadece FastDigest *PagI* enziminin kullanıldığı reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra enzim aktivasyonu için 37 °C'de 10 dakika inkübe edilmesinin ardından 80 °C'de 5 dakika inaktivasyon gerçekleştirildi. Fosfat gruplarının uzaklaştırılması için 1 µL CIAP eklenerek 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra kesim reaksiyon ürünü kullanılarak fenol kloroform ekstraksiyonu yapıldı ve elde edilen DNA peleti, 14,4 µL nükleaz içermeyen suda (pH 6,3) çözüldü (Kaymak 2008). Çözeltiden 12 µL alınarak (1 µg DNA) manyetofektin hazırlamada kullanıldı. Geriye kalan 2,4 µL ise vektör DNA'nın kesilip kesilmediğini teyit etmek amacıyla agaroz jele yüklendi. Kontrol olarak kullanılan pGKB (GFP genini içermeyen) vektörü için de aynı işlemler gerçekleştirildi.

Vektör DNA'ların kesimi teyit edildikten sonra lineer pGKB-GFP ve pGKB vektör DNA'ları ile hazırlanan manyetofektinlerle yapılan gen aktarımı şu şekilde gerçekleştirildi; 12 µL MNP (7,5 µg) ve 12 µL lineer plazmit DNA (1 µg) karıştırıldıktan sonra 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Eşit hacimde (12 µL) PEI solüsyonu (N/P 4 oranı için gerekli miktar) MNP/DNA kompleksine eklendi ve pipetaj yapıldıktan sonra 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. YPD sıvı besiyerinde OD₆₀₀ değeri 0,7 oluncaya kadar büyütülen *P. pastoris* hücrelerini içeren kültür sıvısından 1'er mL steril ependorf tüpe alınarak santrifüjle çöktürüldü. Elde edilen hücre peleti, 164 µL YPD sıvı besiyeriyle süspanse edilerek kuyulu plağa (well plate) alındı. Hazırlanan manyetofektin karışımı (36 µL), mıknatıs (NdFeB) üzerine yerleştirilen plak kuyularındaki hücre süspansiyonu üzerine damla damla eklenerek hafifçe pipetaj yapıldı. Plak, 15 dakika boyunca mıknatıs üzerinde bekletildikten sonra hücreler steril ependorf tüpe alındı. Hücre süspansiyonundaki bağlanmayan DNA'ları uzaklaştırmak amacıyla 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet, 1 mL YPD sıvı besiyerinde çözüldükten sonra steril 50 mL'lik erlene aktarıldı. Son hacim, YPD sıvı besiyeri ile 5 mL'ye tamamlandı. 28 °C'de 180 rpm'de 2, 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Her inkübasyon süresinin ardından kültür sıvılarından 250'şer µL alınarak antibiyotik içeren YPD agar besiyerlerine (200 µg/mL genetisin) ekim yapıldı. Petriler, 30 °C'de inkübasyona bırakıldı. Kültür ortamına 250 µL steril YPD sıvı besiyeri eklenerek inkübasyona devam edildi.

3.2.6.4. Pozitif maya transformantlarının doğrulanması

3.2.6.4.a. Koloni PCR

Lineer pGKB-GFP ve pGKB vektörlerinin maya genomuna entegre olup olmadığını tespit etmek amacıyla 30 °C'de birkaç gün sonra gözlenen genetisin antibiyotiğine dirençli kolonilerden mikropipet ucu ile alınan hücreler kullanılarak gene ve vektöre ait primerlerle koloni PCR yapıldı. Bunun için, mikropipet ucuyla alınan hücreler, PCR tüpüne yerleştirildi ve mikrodalga fırında 3 dakika ısıtıldı (Kaymak 2008). Tüp üzerine

Çizelge 3.12'teki karışım eklenip, Çizelge 3.13'teki şartlarda PCR yapıldı. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 60 V'de 80 dakika yürütülerek görüntülendi.

3.2.6.4.b. Genomik DNA izolasyonu ve çoklu kopya varlığının belirlenmesi

Transforme maya kolonileriyle yapılan koloni PCR amplifikasyonundan sonra 3, 4 ve 8 numaralı koloniler, YPD-genetisin (200 µg/mL) agar besiyerine transfer edildi ve 30 °C'de 48 saat boyunca inkübe edildi. Gelişen kolonilerden öze ile alınarak 10 ml YPD sıvı besiyerine inoküle edilen hücreler, 28 °C'de 150 rpm'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Büyüyen maya hücrelerinden GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific™) kullanılarak genomik DNA izolasyonu özetle şu şekilde yapıldı; her bir kültürden 1×10^8 maya hücresi (OD_{600} değeri 0,8-1,0) alınarak mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek toplandı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet üzerine 500 µL maya parçalama tamponu eklenerek süspanse edildi. Yeniden süspanse edilen hücrelerin üzerine 100 µL zimoliyaz enzimi (3 mg/mL stok) ve cam boncuk (425-600 µm) eklenerek vortekslendi. 15 dakikada bir 20 sn boyunca vorteksleme işlemi yapılarak toplam 1 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Daha sonra hücreler, 3000 g'de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatant, pipet ile uzaklaştırıldı. Pelete, 180 µL parçalama tamponu eklenerek resüspanse edildi. Üzerine 20 µL proteinaz K eklenerek homojen oluncaya kadar iyice vortekslendi. Örnekler, 56 °C'de 45 dakika inkübasyona bırakıldı ve ara ara vortekslendi. Süre sonunda karışım üzerine 20 µL RNase A eklenerek iyice vortekslendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra karışım üzerine 200 µL lizis (parçalama) tamponu eklendi ve homojen oluncaya kadar iyice vortekslendi. 400 µL %50 etanol eklenerek vortekslendi. Hazırlanan lizat, saflaştırma kolonuna transfer edildi. 6000 g'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra toplama tüpü atılarak kolon, 2 mL'lik yeni toplama tüpüne yerleştirildi. 500 µL yıkama tamponu 1 eklenerek 8000 g'de 1 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpündeki atık uzaklaştırılarak kolon, tekrar tüpe yerleştirildi. Kolona, 500 µL yıkama tamponu 2 eklenerek maksimum hızda (≥ 12000 g) 3 dakika santrifüjlendi. Kolon, yeni bir steril tüpe yerleştirildi. Kolonun merkezine, 80 µL genomik elüsyon tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilerek 8000 g'de 1 dakika santrifüjlendi. Elüe edilen

genomik DNA'ların konsantrasyonları nanodrop spektrofotometrede ölçüldükten sonra hemen kullanım için +4 °C'ye kaldırıldı. Hem GFP geninin genoma entegrasyonunun doğrulanması hem de genomda genin çoklu kopya varlığının belirlenmesi için saflaştırılan genomik DNA'ların 30'ar nanogramının kalıp olarak kullanıldığı, GFP genine ait primerler ve reaksiyon şartları ile PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünleri, %1'lik agaroz jele yüklendi ve 80 V'de 45 dakika yürütülerek görüntülendi.

3.2.6.5. Pozitif maya transformantları ile GFP üretimi

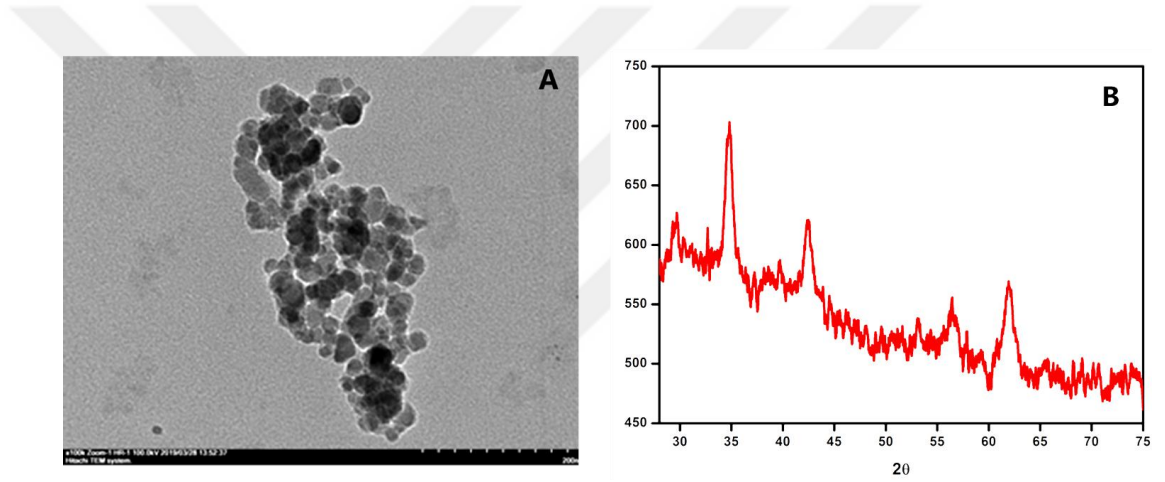
Pozitif maya transformantları ile GFP üretimi için çizgi ekim yapılarak YPD agar besiyerinde büyütülen rekombinant ve kontrol olarak boş vektör (pGKB) transfer edilen *P. pastoris* kolonilerinden öze ile toplanıp 25 mL YPD sıvı besiyeri içeren çentikli erlenlere inoküle edildi. Kültürler, 28 °C'de 180 rpm'de 120 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyondan sonra kültür sıvılarından 200 µL çöktürülerek elde edilen peletler, fosfat tamponunda çözülerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yeniden süspanse edilen hücreler, doğrudan mikroskop cam lamaları üzerine konuldu ve bir lamel ile kapatıldı. Görüntüler ve GFP floresansı (uyarma dalga boyu; EX, 488 nm; emisyon filtresi; Em, 507 nm), konfokal lazer tarama mikroskobu kullanılarak elde edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

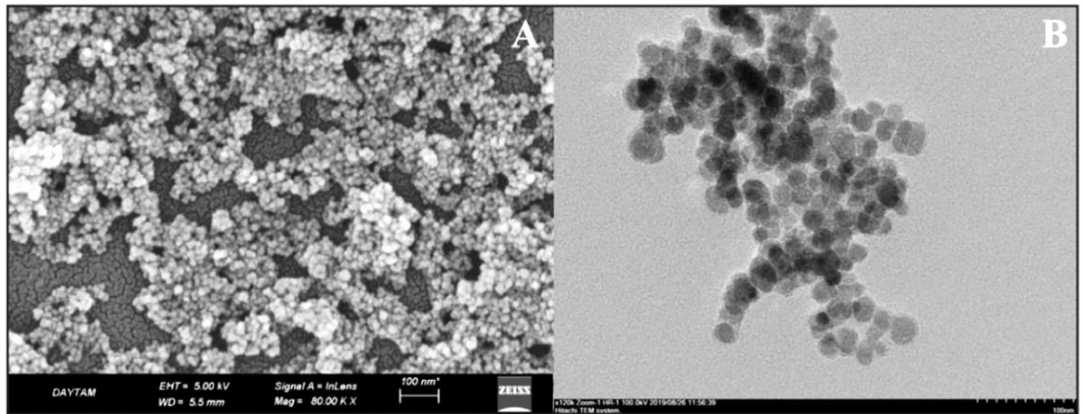
4.1. Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin (MNP) TEM görüntüleri, elde edilen MNP'lerin küresel ve ortalama 20 nm boyutunda olduğunu gösterdi. XRD kırınım deseni, Fe_3O_4 MNP'lerine ait [220], [311], [222], [400], [422], [511] ve [440] düzlemlerini belirtmektedir (Şekil 4.1) (Jiang *et al.* 2017).



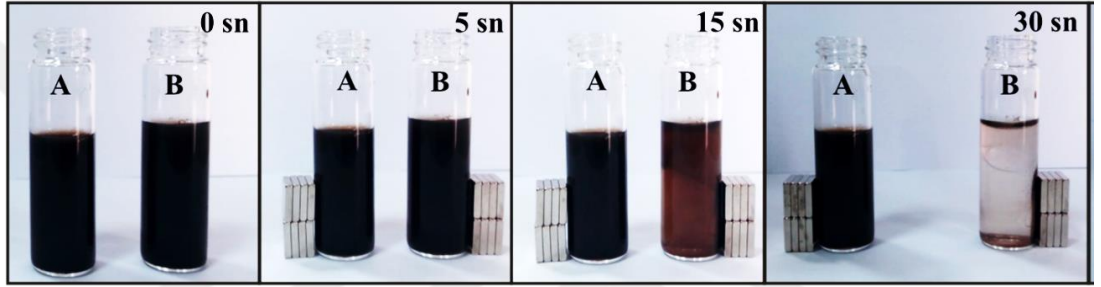
Şekil 4.1. Fe_3O_4 @PEI MNP'lerine ait TEM görüntüsü (A) ve XRD kırınım deseni (B)

Asidasyon işleminden sonra elde edilen MNP'lerin ($\alpha\text{Fe}_3\text{O}_4$ @PEI) morfolojisi, SEM ve TEM ile belirlendi (Şekil 4.2).

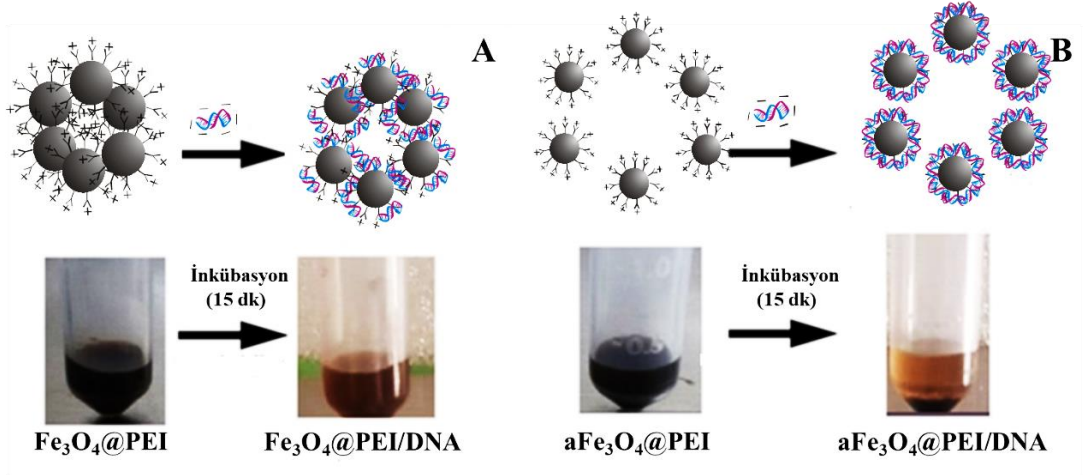


Şekil 4.2. $\alpha\text{Fe}_3\text{O}_4$ @PEI MNP'lerine ait SEM (A) ve TEM (B) görüntüleri

Öte yandan, asidasyon yapılan MNP'lerin, mıknatıs tarafından toplanabilirliğinin hızlandığı gözlemlendi. Asidasyon uygulanmayan grupta ise daha yavaş toplanma gözlemlendi (Şekil 4.3). Bu durum, hücrelere DNA'nın hızla ulaştırılması için bir dezavantaj olarak görüldüğünden bu tez çalışmasında asitleme yapılan MNP'ler kullanıldı. Ayrıca, asitleme yapılan ve yapılmayan MNP'ler DNA ile inkübe edilerek bu düşüncenin doğruluğu teyit edildi. Elde edilen bulgular, asitleme yapılan MNP'lerin daha hızlı bir şekilde DNA'yı bağladığını ve hızlı bir şekilde çökmeye sebep olduğunu gösterdi (Şekil 4.4).



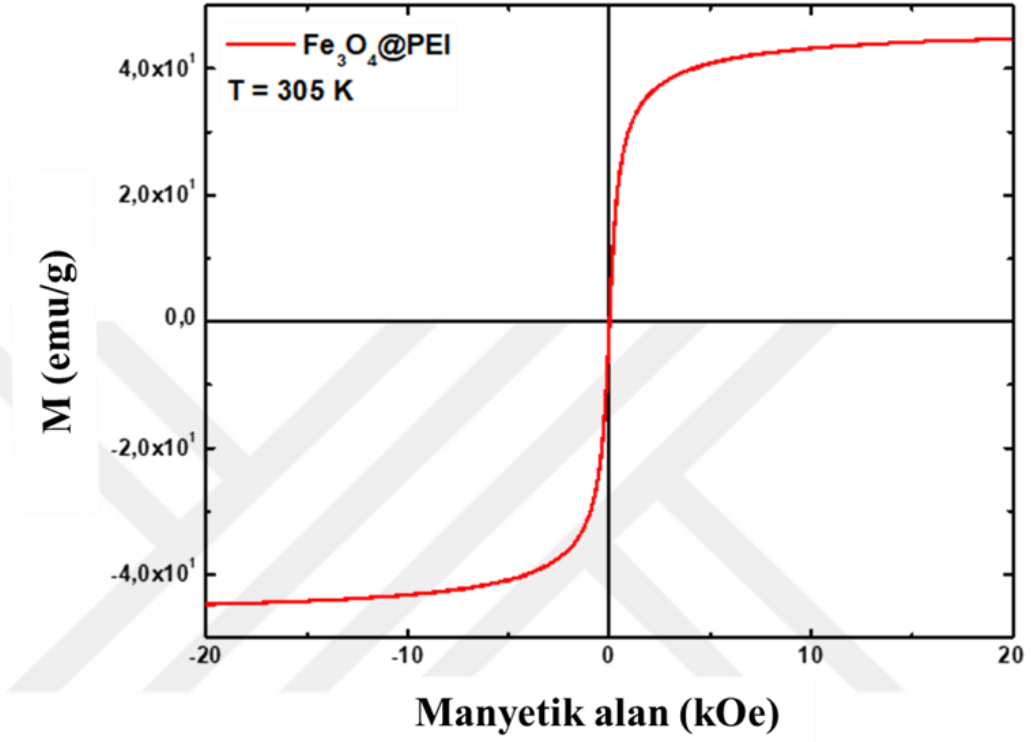
Şekil 4.3. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ (A) ve $\text{aFe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ (B) MNP'lerin mıknatısla toplanabilirliği



Şekil 4.4. DNA yüklenmiş $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ (A) ve DNA yüklenmiş $\text{aFe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ (B)

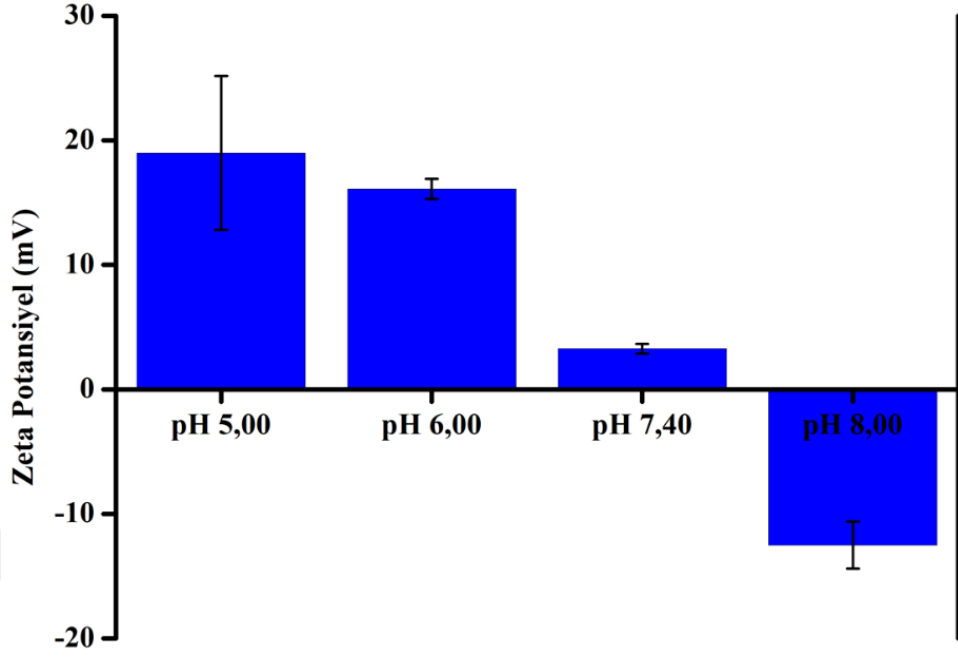
MNP'lerin manyetik özelliklerinin belirlenmesinde, bir titreşimli manyetometre (VSM) cihazı kullanıldı. Kurutulan MNP örneklerinin oersted (Oe) manyetik alandaki mıknatıslık değerleri, oda sıcaklığında ölçülüp, manyetik alan içindeki partiküllerin

manyetik özellikleri, birim kütle başına manyetik moment (emu) şeklinde ifade edildi. Analiz sonucu, elde edilen partiküllerin süpermanyetik olduğunu gösterdi (Şekil 4.5).



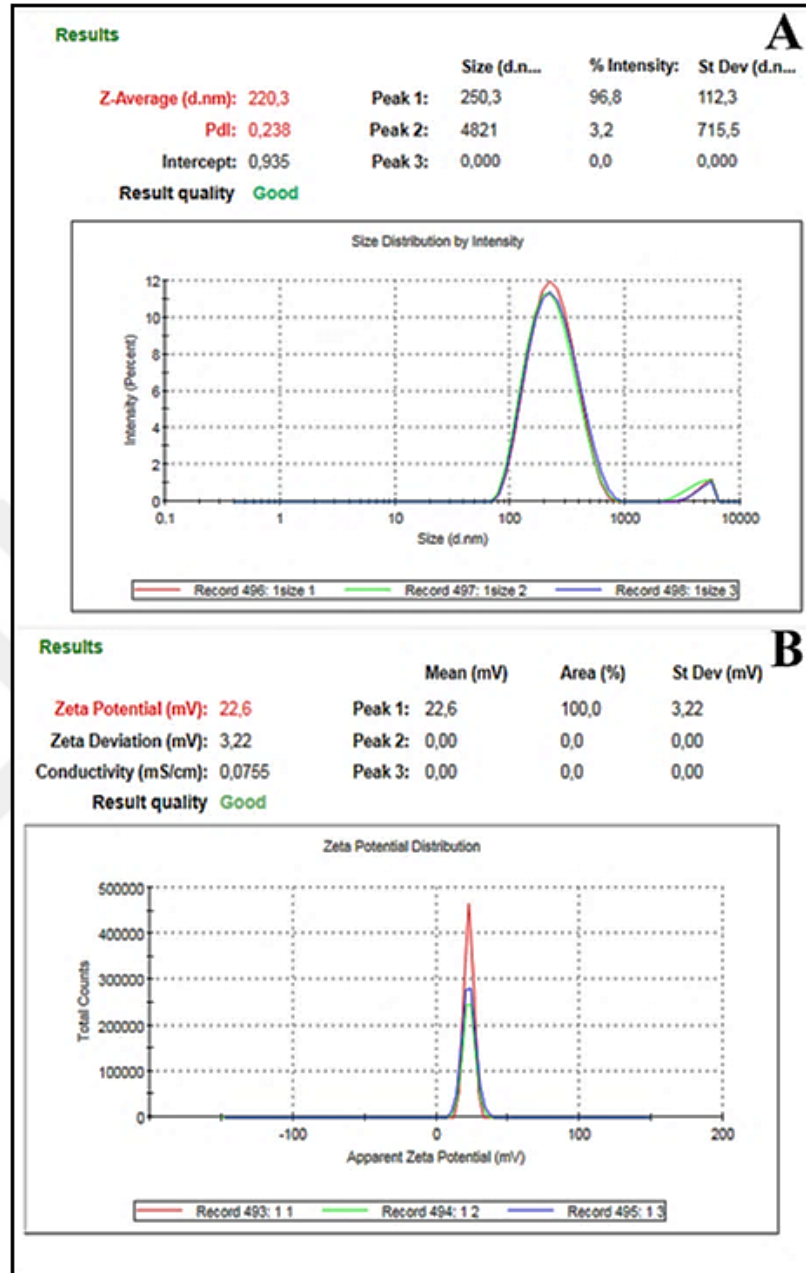
Şekil 4.5. MNP'lere ait titreşimli manyetometre karakterizasyon grafiği

Elde edilen MNP'lerin farklı tampon ortamlarındaki zeta potansiyel değişimlerinin belirlenmesi için DLS (Dinamik ışık saçılımı) analizi kullanıldı ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.6'da verildi.



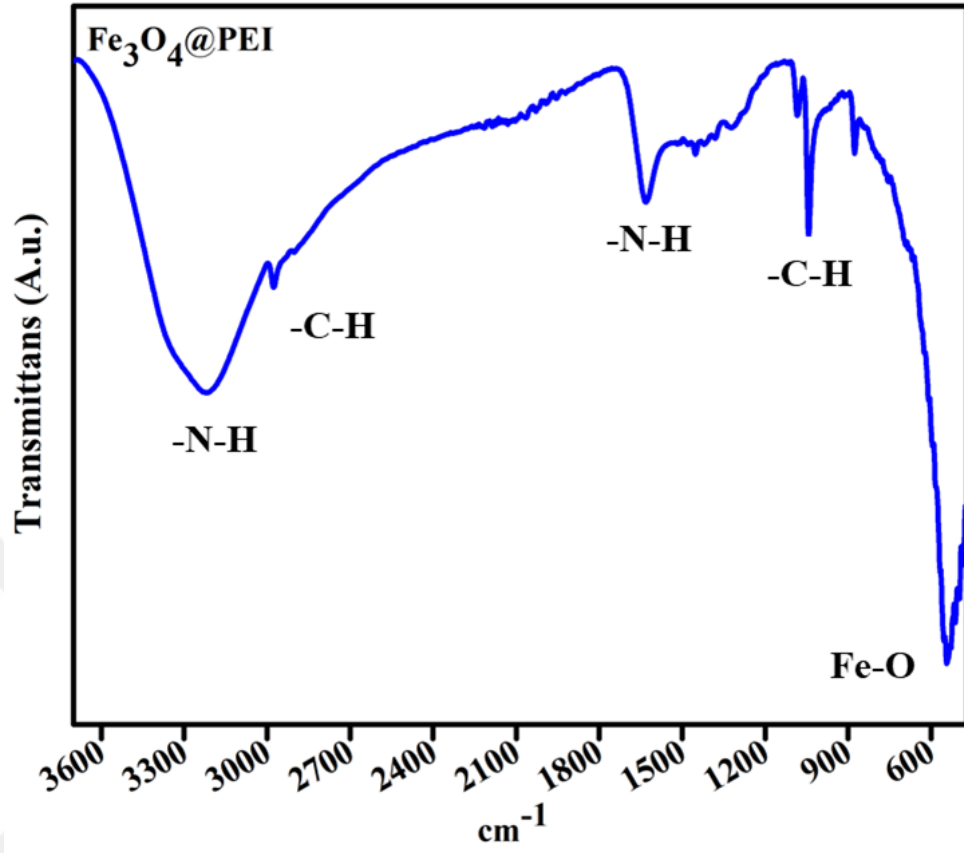
Şekil 4.6. MNP'lerin farklı tampon ortamlarındaki zeta potansiyel değişimleri

Elde edilen MNP'lerin suda dağılımı ve yüzey yükünün belirlenmesi için de DLS analizi kullanıldı. Zeta potansiyelinde, yükün pozitif veya negatif olması elde edilen sentez ürününün yüzey grupları tarafından belirlenmektedir. Analiz sonunda, SEM ve TEM görüntülerinin aksine ortalama MNP boyutunun 250 nm olduğu görüldü (Şekil 4.7 (A)). MNP'lerin yüzey yükü (zeta potansiyeli) ise pozitif olarak ölçüldü (Şekil 4.7 (B)). Ayrıca, DLS analizi ile nanopartiküllerin polidispersite indeksinin (PDI, Polydispersity Index) 0,238 olduğu belirlendi.



Şekil 4.7. aFe₃O₄@PEI MNP'lere ait Hidrodinamik boyut (A) ve Zeta potansiyeli (B) sonuçları

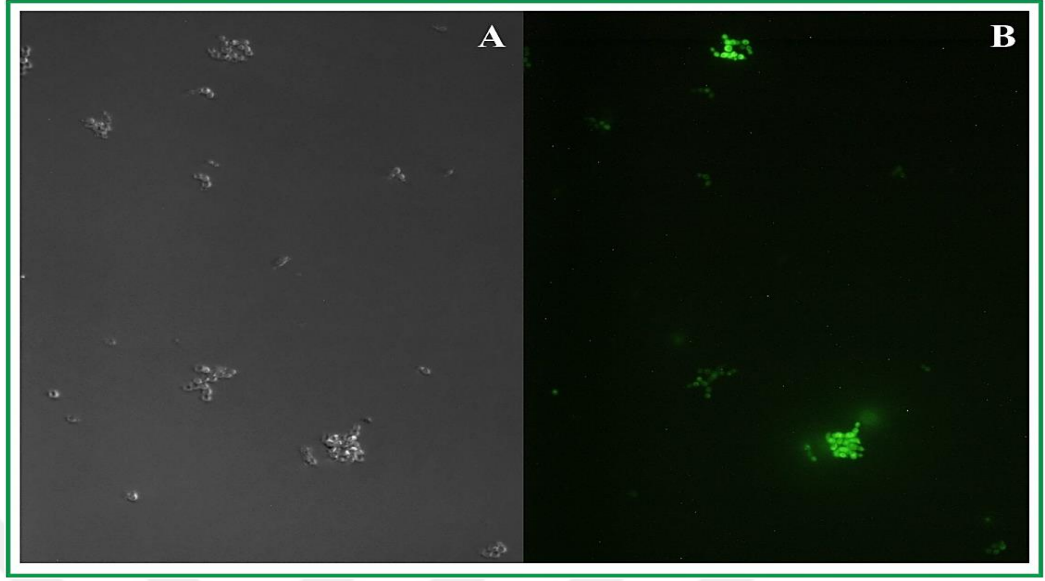
MNP'lerin kurutma sonrası 400-3600 cm⁻¹ dalga boyu aralığında FTIR ölçümü yapıldı. Sentezlenen aFe₃O₄@PEI NP'lerine ait FTIR spektrumu, Şekil 4.8'de verildi. Grafikte gözlenen -N-H ve -C-H pikleri, PEI varlığını göstermektedir (Islam *et al.* 2014; Han *et al.* 2016; Wang *et al.* 2016).



Şekil 4.8. Sentezlenen MNP'lerin FTIR spektrumu

4.2. MNP'lerin Hücresel Alımının Belirlenmesi

Sentezlenen Oregon Green (yeşil) etiketli MNP'lerin maya hücreleri tarafından alımını doğrulamak için mıknatıs aracılığıyla maya hücrelerine gönderilerek hücre içindeki varlığı, floresan mikroskopta görüntülendi (Şekil 4.9).



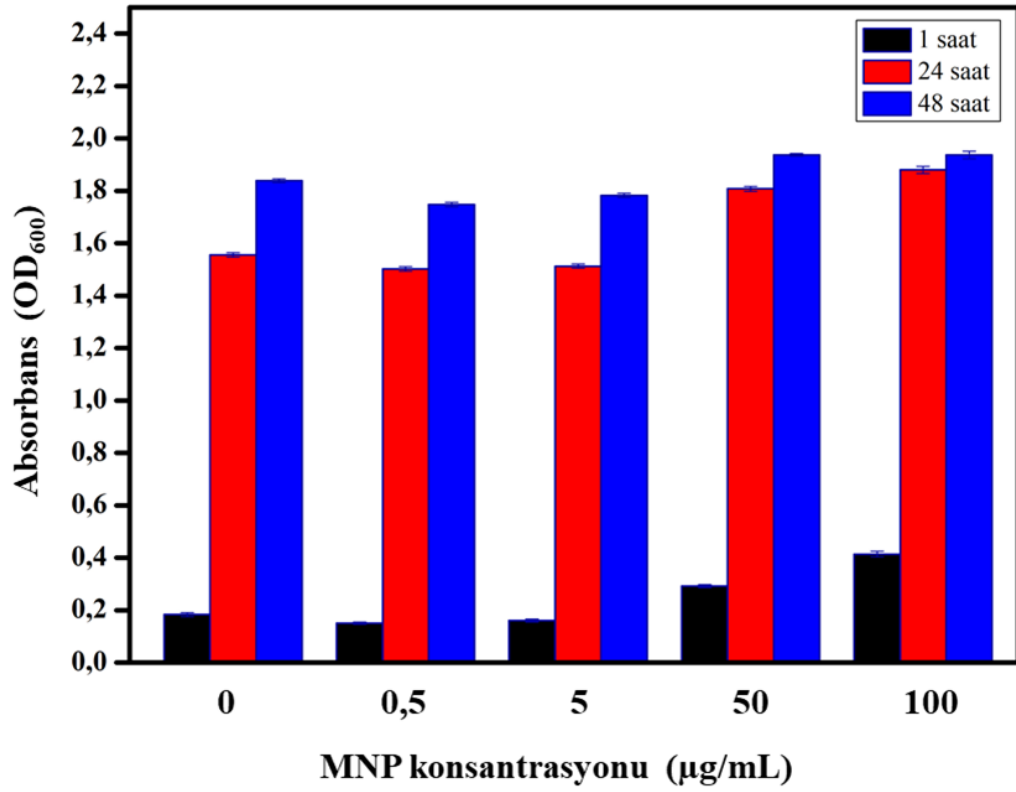
Şekil 4.9. Oregon Green ile etiketlenen MNP'lerin hücresel alımı (Hücrelerin beyaz ışık (A) ve floresan ışık (B) altında görüntülenmesi)

4.3. MNP'lerin Maya Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin Araştırılması

Maya hücrelerine gen aktarımında taşıyıcı olarak kullanılacak olan $\alpha\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ MNP'lerin *P. pastoris* üzerindeki toksisitesini incelemek amacıyla proliferasyon ve spotlama deneyleri yapıldı.

4.3.1. Proliferasyon testi

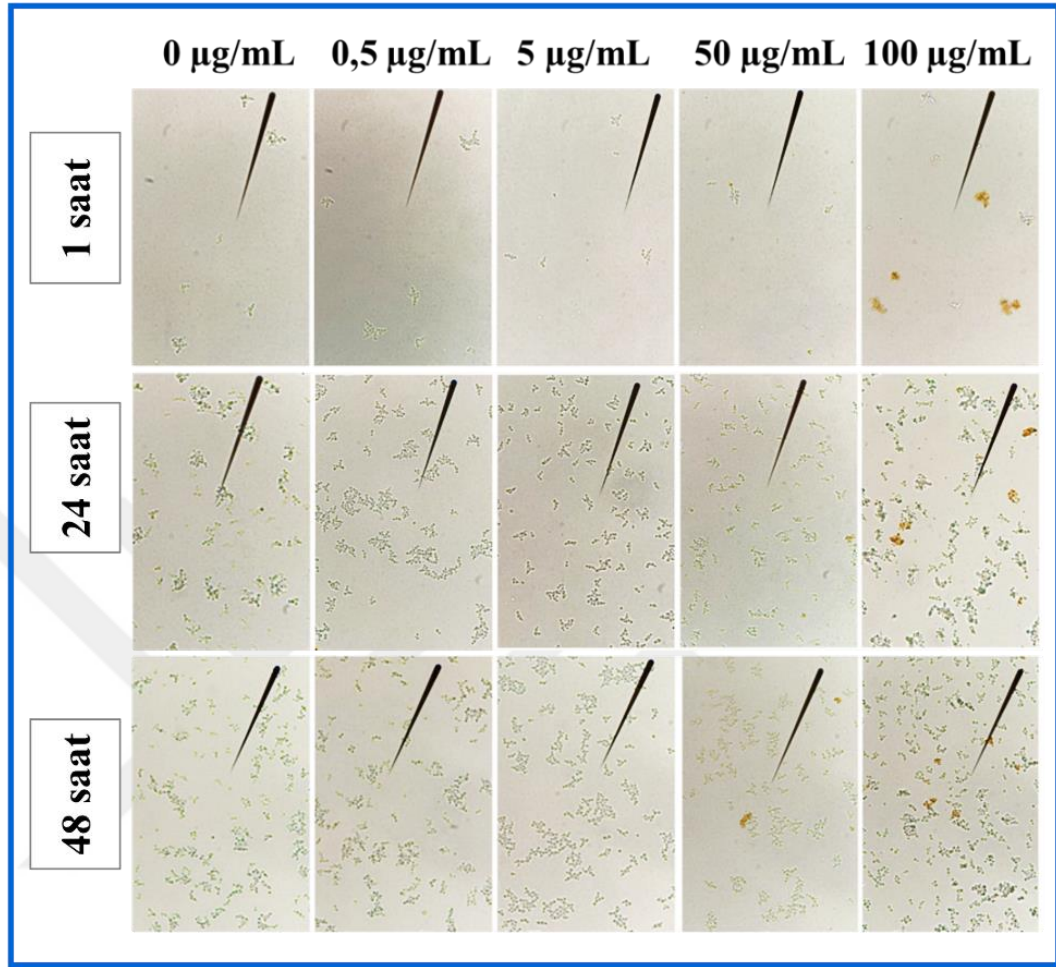
Mıknatıs (NdFeB) ile hücre içerisine gönderilen MNP'lerin, maya proliferasyonu (büyümesi) üzerine etkisini gözlemlemek amacıyla 0-100 $\mu\text{g/mL}$ aralığında değişen konsantrasyonlarda MNP'ler, maya kültür (10^8 hücre/mL) ortamına eklendi ve 15 dakika mıknatıs tutulduktan sonra 28 °C'de 180 rpm'de inkübasyona bırakıldı. 1, 24 ve 48 saatlik inkübasyonun ardından her bir gruptan 200'er μL alınarak spektrofotometrede (OD_{600}) optik dansite ölçüldü. Sonuçlar incelendiğinde, kullanılan konsantrasyonlardaki MNP'lerin maya hücreleri üzerinde toksik etki göstermediği, inkübasyon süresi boyunca büyümenin artarak devam ettiği gözlemlendi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. aFe₃O₄@PEI MNP'lerin maya hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi

4.3.2. Işık mikroskopunda görüntüleme

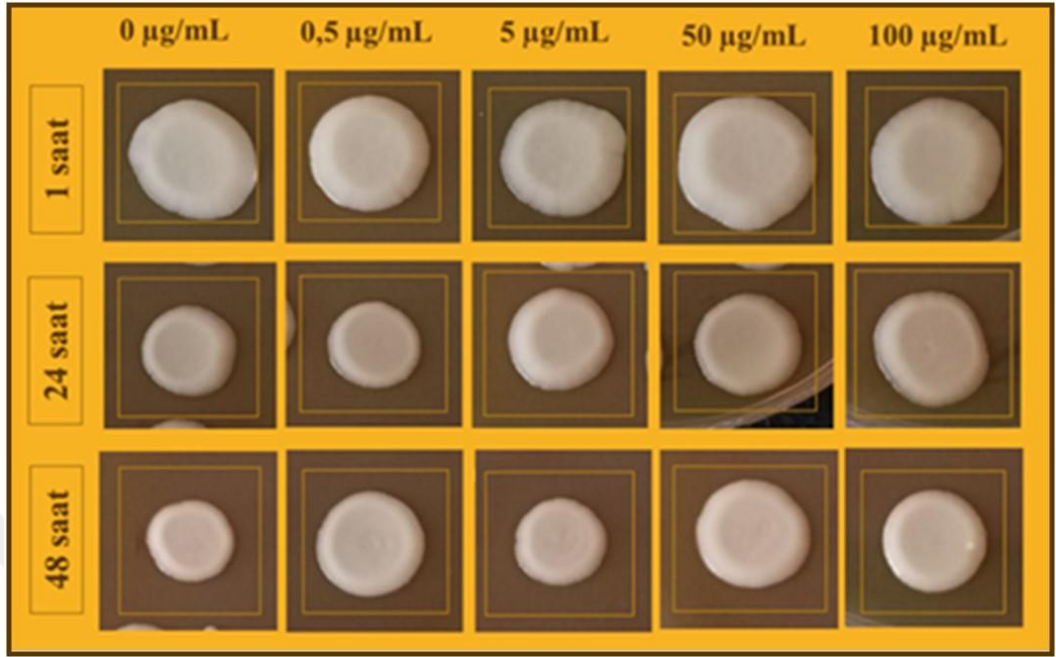
Proliferasyon testinde hazırlanan gruptaki (0-100 µg/mL) mayaların şekil, büyüklük ve büyüme davranışlarındaki değişimi gözlemlemek amacıyla 1, 24 ve 48 saat boyunca inkübe edildikten sonra maya hücreleri ışık mikroskopunda incelendi (40x). İncelenen mikroskop görüntülerinin Şekil 4.10'daki OD₆₀₀ ölçüm sonuçlarını desteklediği ve her uygulama grubunda inkübasyon süresi arttıkça maya hücrelerinde çoğalmanın devam ettiği gözlemlendi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Mayalara ait ışık mikroskop görüntüsü (40x)

4.3.3. Spotlama (Spotting) testi

Proliferasyon testinde hazırlanan grupların (0-100 µg/mL) maya hücreleri üzerindeki büyüme inhibisyonu incelemek amacıyla spotlama testi yapıldı. 1, 24 ve 48 saatlik inkübasyonun ardından kültür sıvılarından 4'er µL alınarak YPD katı besiyerine inoküle edildi ve 30 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi arttıkça devam eden büyümeyle birlikte yaklaşık 10 günlük inkübasyon sonrasında çekilen spotlara ait görüntüler incelendiğinde kullanılan en yüksek MNP dozunun (100 µg/mL) bile toksik etki göstermediği gözlemlendi (Şekil 4.12).



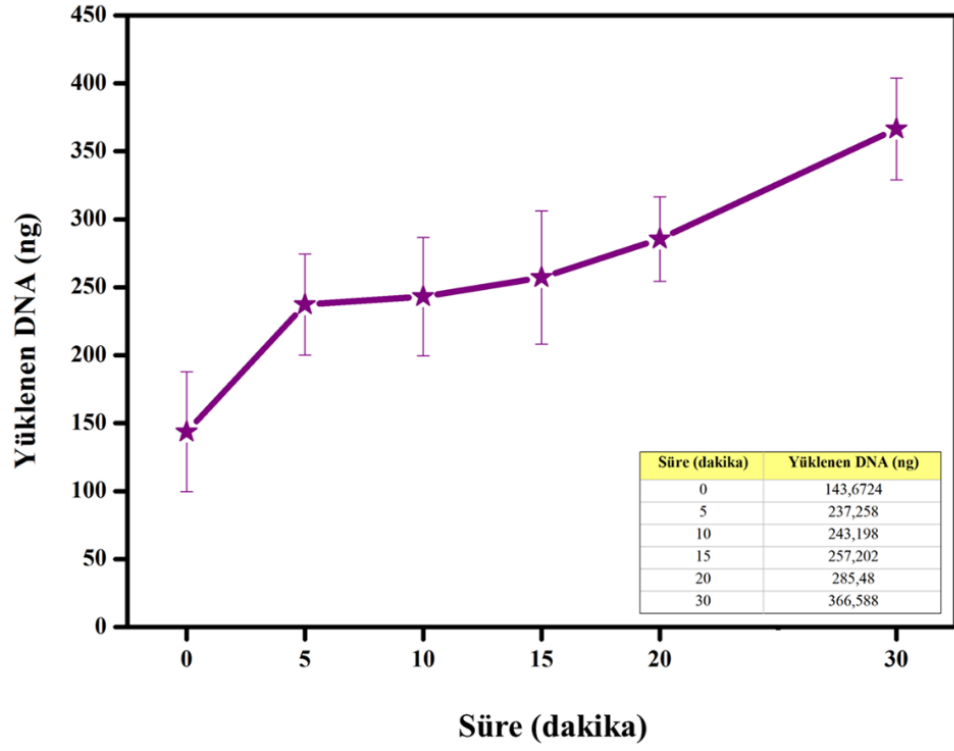
Şekil 4.12. Spotlama testine ait maya görüntüleri

4.4. Manyetofektin Hazırlama ve Optimizasyonu

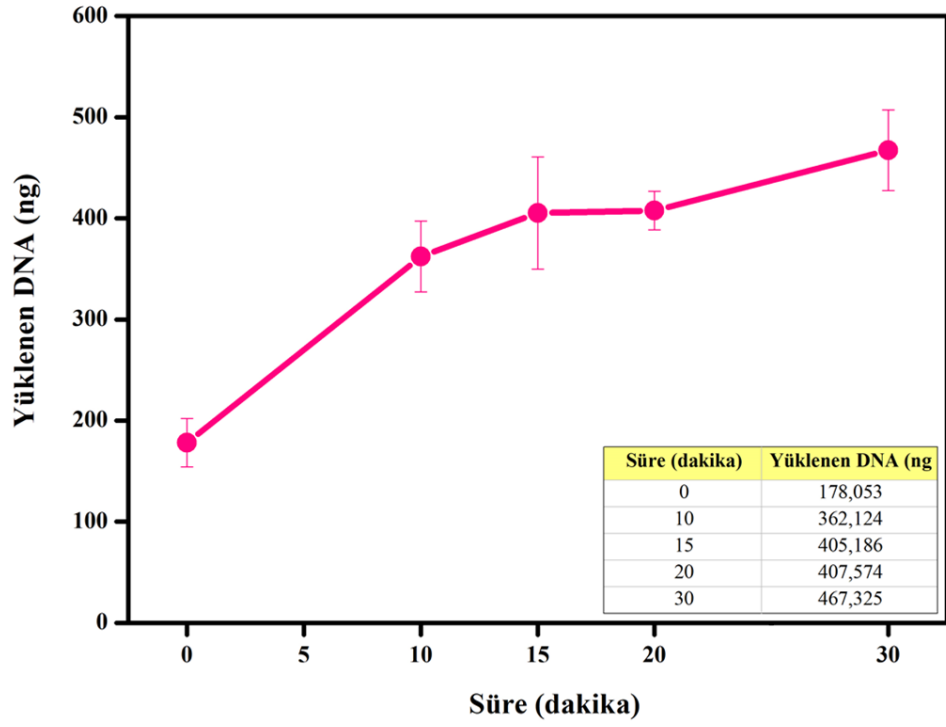
Maya hücrelerine gen transferi için araç olarak kullanılan MNP'lere DNA bağlamak üzere süre, N/P oranı ve MNP miktarı optimizasyonu yapıldı. Öncelikle süre ve miktar optimizasyonu çalışıldı. Bunun için oluşturulan deney gruplarında eşit hacimde (12 µL) MNP, DNA ve PEI kullanıldı.

4.4.1. Süre optimizasyonu

Süre optimizasyonunda MNP'lere DNA bağlanması için önce MNP ve DNA karıştırılarak farklı sürelerde inkübe edildi ve optimum DNA bağlanma süresi belirlendi (Şekil 4.13). Daha sonra ortama, belirlenen miktarda PEI (N/P 8) eklenerek farklı sürelerde inkübasyon gerçekleştirildi ve en yüksek miktarda DNA bağlanması gözlenen süre belirlendi (Şekil 4.14). Her iki deney sonucu elde edilen bulgular, en yüksek DNA bağlanma miktarının 30 dakikalık inkübasyon gruplarında olduğunu gösterdi.



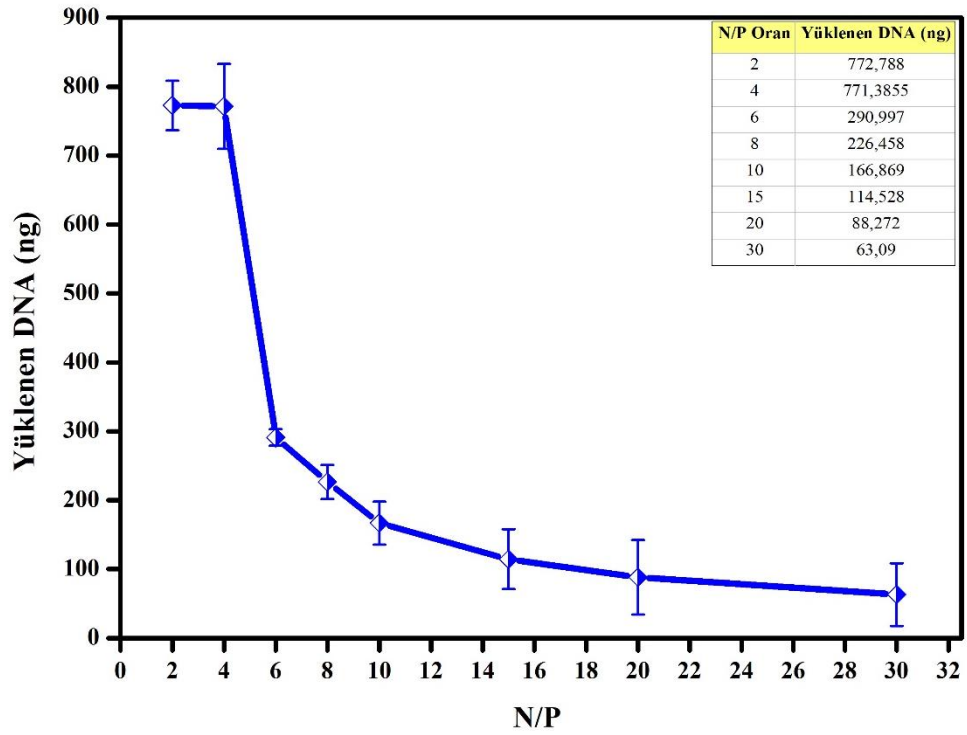
Şekil 4.13. DNA bağlanma için süre optimizasyonu



Şekil 4.14. PEI inkübasyonu için süre optimizasyonu

4.4.2. N/P oranı optimizasyonu

MNP'lerin daha fazla DNA'yı bağlayabilmesi için ortama, ekstra PEI eklemek gerektiği bilgisinin teyit edilmesinin ardından, belirlenen miktarlardaki PEI solüsyonları (N/P 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 ve 30) deney ortamına eklenerek manyetofektin hazırlandı ve en yüksek DNA bağlanması gözlenen grup belirlendi. Sonuçlar incelendiğinde, en yüksek DNA bağlanma miktarı, N/P 2 ve 4'te gözlemlendi (Şekil 4.15). Sonraki manyetofektin deneylerinde yüksek miktarda DNA bağlanması için N/P 4 oranında PEI kullanılmasına karar verildi.

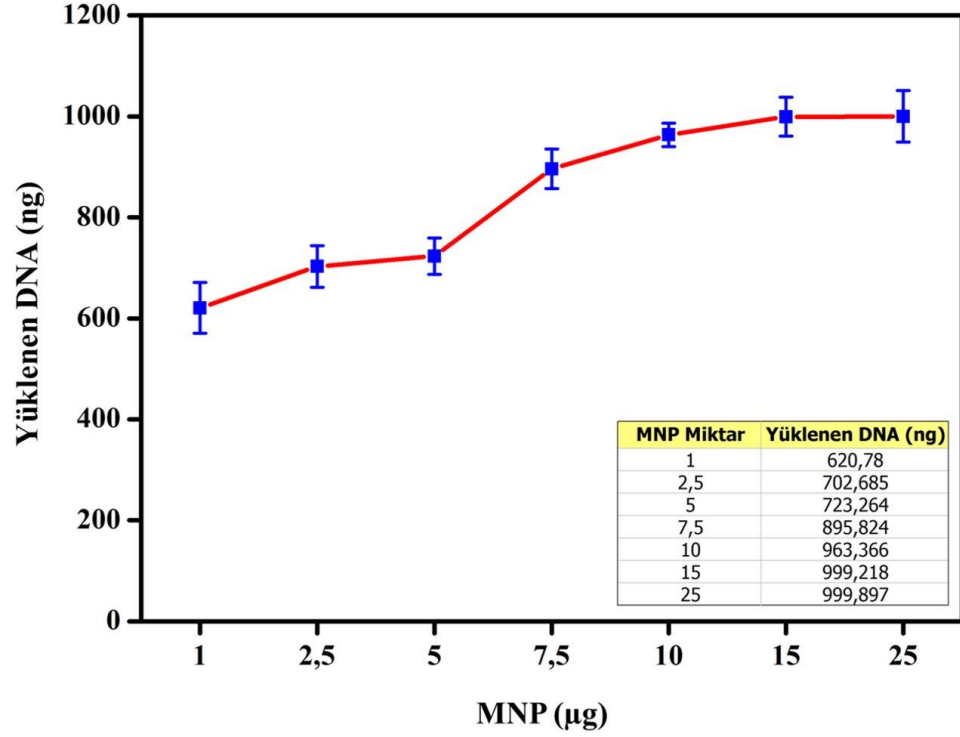


Şekil 4.15. N/P oranı optimizasyonu

4.4.3. MNP miktar optimizasyonu

Manyetofektin hazırlamak için kullanılacak olan optimum MNP miktarını belirlemek için farklı konsantrasyonlarda MNP kullanılarak deney grupları oluşturuldu. MNP miktarı arttıkça DNA bağlanma miktarında da artış gözlemlendi (Şekil 4.16). Sonraki çalışmalarda

hem yüksek oranda DNA bağlama kapasitesine sahip, hem de maya için toksik olmayacak olan MNP miktarı, 7,5 µg olarak belirlendi.



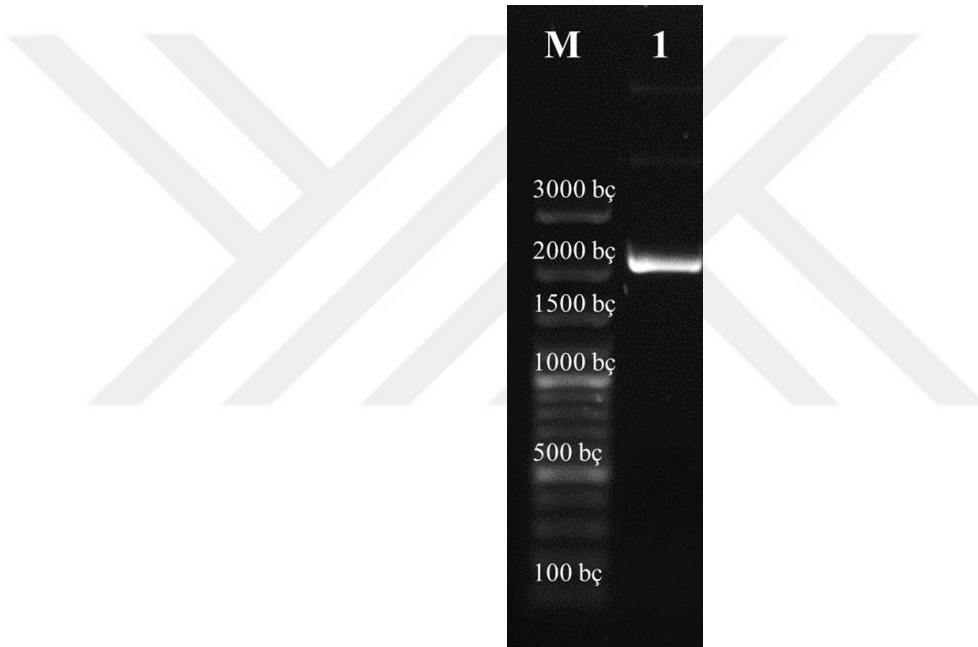
Şekil 4.16. MNP miktar optimizasyonu

Sonuç olarak; yapılan süre ve miktar optimizasyon deneylerinde elde edilen sonuçlar doğrultusunda, DNA bağlanması için tanınan inkübasyon sürelerinin 30 dakika olarak gerçekleştirilmesine, ortama eklenen ekstra PEI'nin, N/P 4 oranına göre hazırlanarak kullanılmasına ve taşıyıcı olarak kullanılan MNP dozunun ise 7,5 µg olacak şekilde ayarlanmasına karar verildi.

4.5. pGKB-GFP Plazmitinin Elde Edilmesi

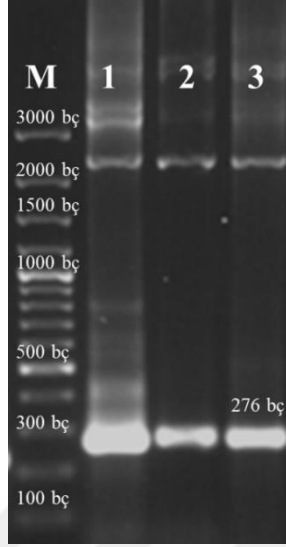
4.5.1. pGKB plazmitinin doğrulanması

Addgene'den temin edilen ve kanamisin antibiyotiği içeren LB sıvı besiyerinde büyütülen bakteri hücrelerinden plazmit izolasyonu yapıldı. Saf olarak elde edilen plazmit, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi (Şekil 4.17).



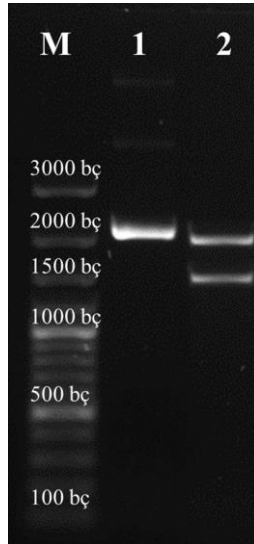
Şekil 4.17. pGKB plazmitine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1 nolu kuyu; pGKB plazmiti)

İzole edilen plazmite ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen gradiyent PCR reaksiyonu sonucu elde edilen ürünler, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendiğinde jelde, beklenen boyutta bant (276 bp) gözlemlendi (Şekil 4.18). Diğer yandan, vektör primerleriyle PCR yapılacağı zaman her üç primer bağlanma sıcaklığının da kullanılabileceği görüldü.



Şekil 4.18. PCR reaksiyonuna ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1, 2, ve 3 nolu kuyular; sırasıyla, 56, 52 ve 48 °C)

Diğer bir doğrulama yöntemi olarak; izole edilen plazmit, *EcoRI* ve *HindIII* enzimleri ile kesildi. Kesim reaksiyon sonucu elde edilen ürün, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Jel görüntüleme sonucuna göre, kesilen plazmitte beklendiği gibi 2007 bp ile 1499 bp uzunluğa sahip iki bant görüntülendi (Şekil 4.19).

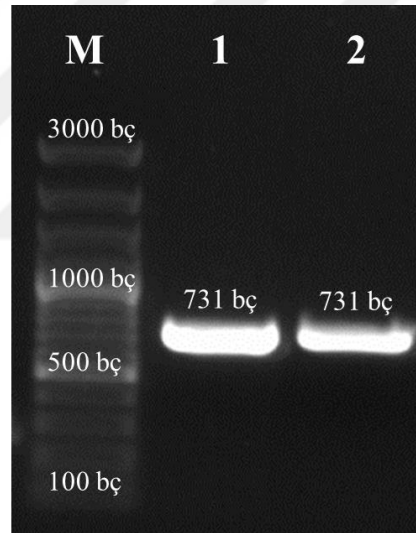


Şekil 4.19. Kesilen pGKB plazmitinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1 ve 2 nolu kuyular; sırasıyla, kesilmemiş pGKB ve kesilmiş pGKB)

Elde edilen her iki doğrulama işlemine ait sonuçlarla çalışmada kullanılmak üzere temin edilen pGKB plazmitinin doğruluğu teyit edilmiş oldu.

4.5.2. GFP geninin PCR ile amplifikasyonu

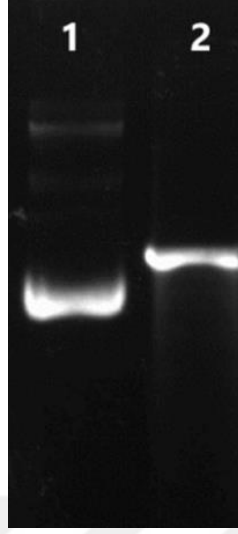
Rekombinant vektörü elde etmek için önce sentetik olarak temin edilen kodon optimize GFP geni, forward ve revers primerler kullanılarak PCR reaksiyonu ile amplifiye edildi ve elde edilen PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi (Şekil 4.20). Görüntüleme sonucunda beklenen boyutta bant (731 bç) gözlemlendi. Ayrıca kullanılan $MgCl_2$ 'ün PCR verimini arttırdığı görüldü.



Şekil 4.20. PCR ürünlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1 ve 2 nolu kuyular; sırasıyla, $MgCl_2$ eklenen ve eklenmeyen reaksiyon sonucu elde edilen PCR ürünleri)

4.5.3. Genin ve vektör DNA (pGKB)'nın kesilmesi ve görüntülenmesi

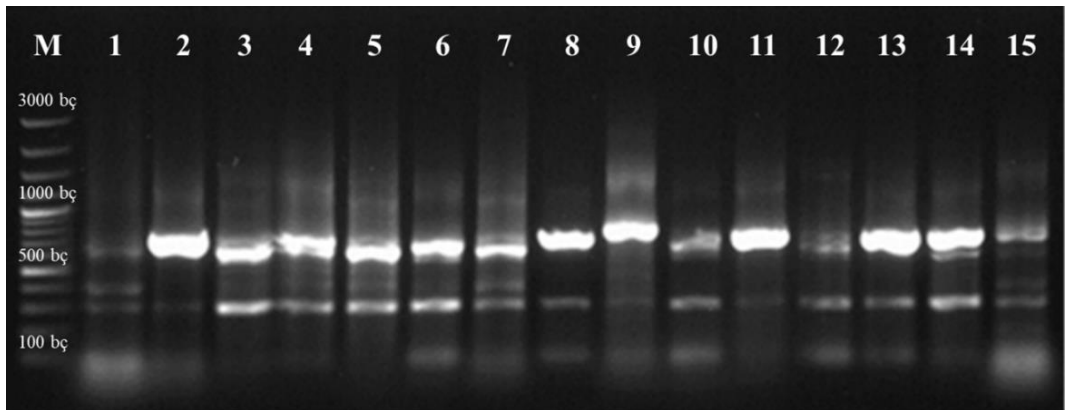
PCR reaksiyonu sonucu elde edilen GFP geni, 3.2.5.2.c'deki gibi saflaştırılıp *EcoRI* ve *KpnI* enzimleri ile kesildi. Vektör DNA da aynı enzimlerle kesildi ve elde edilen ürünler, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi (Şekil 4.21). Böylece, vektör DNA'nın kesildiği teyit edildi.



Şekil 4.21. Kesilen vektör DNA'nın agaroz jel elektroforez görüntüsü (1 ve 2 nolu kuyular; sırasıyla, kesilmemiş pGKB vektör DNA ve kesilmiş lineer pGKB vektör DNA)

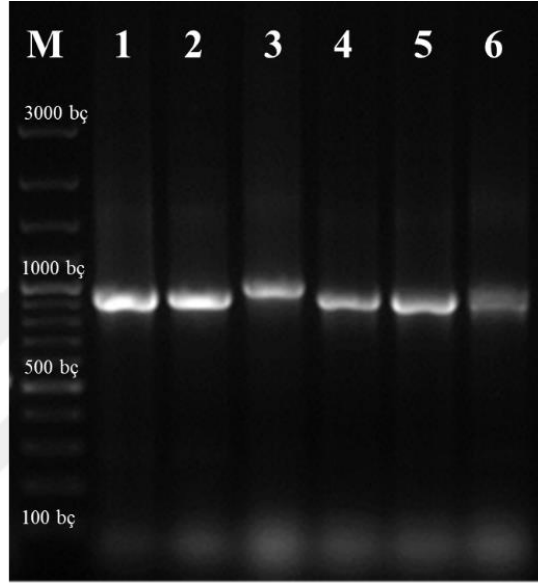
4.5.4. Bakteri hücrelerinin transformasyonu ve koloni PCR

Kesilen gen ve vektör DNA ile gerçekleştirilen ligasyon reaksiyonu sonrası elde edilen ürün, ısı şoku ile *E. coli* hücrelerine transfer edildi. Kanamisin içeren LB agar plaklarda gelişen kolonilerden 15 tanesi seçilip, GFP genine ait primerler kullanılarak koloni PCR yapıldı. GFP gen primerleriyle yapılan PCR sonucu pozitif transformantlarda gözlenen ürün boyutunun beklendiği gibi 731 bp olduğu belirlendi (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. GFP koloni PCR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1-15 nolu kuyular; sırasıyla, 1-15 numaralı kolonilere ait PCR ürünleri)

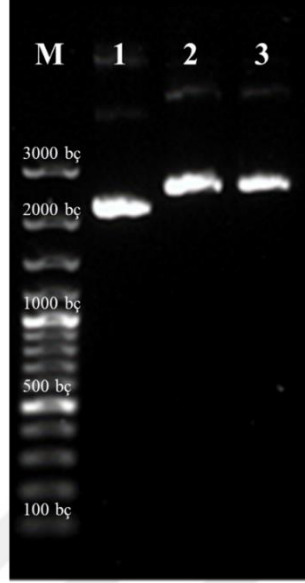
Ayrıca, GFP genine ait primerlerle yapılan koloni PCR reaksiyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntülemesi sonucu seçilen koloniler (2, 8, 9, 11, 13 ve 14 numaralı koloniler) kullanılarak vektör primerleri ile koloni PCR yapıldı. Vektör primerleriyle yapılan PCR sonucu oluşan ürün boyutunun 2, 8, 11, 13 ve 14 numaralı kolonilerde beklendiği gibi 963 bp olduğu belirlendi (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Koloni PCR reaksiyonu sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1-6 nolu kuyular; sırasıyla, 2., 8., 9., 11., 13. ve 14. kolonilere ait PCR ürünleri)

4.5.5. Muhtemel rekombinant vektörün sekans analizi

Klonlamanın doğruluğunu kontrol etmek için LB-kanamisin sıvı besiyerlerinde çoğaltılan 2. ve 8. kolonileri oluşturan bakterilerden saflaştırılan plazmitlere ait agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.24’te verildi.



Şekil 4.24. pGKB-GFP plazmit izolasyon ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1 ve 2 nolu kuyular; sırasıyla, 2. ve 8. kolonilerden saflaştırılan muhtemel rekombinant plazmit)

Transformasyon sonucu seçilen 2. ve 8. kolonileri oluşturan bakteri hücrelerinden saflaştırılan plazmitlerin sekans analiz sonucu elde edilen nükleotid sekansları, kodon optimize edilen GFP nükleotid sekansı ile blastlandığında (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) benzerliklerin her iki kolonide de %100 olduğu görüldü (Şekil 4.25 ve Şekil 4.26). Elde edilen rekombinant vektör, pGKB-GFP olarak adlandırıldı.

Download Graphics

Sequence ID: **Query_18711** Length: **1183** Number of Matches: **1**

Range 1: 14 to 727 Graphics

Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1319 bits(714)	0.0	714/714(100%)	0/714(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGTCCTAAAGGTGAAGAATTGTTCACTGGTGTGTTCCAATTTTGGTTGAATTGGATGGT	60		
Sbjct 14	ATGTCCTAAAGGTGAAGAATTGTTCACTGGTGTGTTCCAATTTTGGTTGAATTGGATGGT	73		
Query 61	GATGTTAATGGTCAAAAATTCTCTGTTTCTGGTGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGT	120		
Sbjct 74	GATGTTAATGGTCAAAAATTCTCTGTTTCTGGTGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGT	133		
Query 121	AAATTGACCTTGAAATTTATTTGCACTACTGGTAAGTTGCCTGTTCCATGGCCAACATTG	180		
Sbjct 134	AAATTGACCTTGAAATTTATTTGCACTACTGGTAAGTTGCCTGTTCCATGGCCAACATTG	193		
Query 181	GTTACTACTTTCTCTTATGGTGTTCATGCTTTTCTAGATACCCAGATCATATGAAACAG	240		
Sbjct 194	GTTACTACTTTCTCTTATGGTGTTCATGCTTTTCTAGATACCCAGATCATATGAAACAG	253		
Query 241	CATGACTTTTCAAGTCTGCCATGCCCGAAGGTTATGTTGAGGAAAGAACTATATTTTAC	300		
Sbjct 254	CATGACTTTTCAAGTCTGCCATGCCCGAAGGTTATGTTGAGGAAAGAACTATATTTTAC	313		
Query 301	AAAGATGACGGTAACACAGACACGTGCTGAAGTTAAGTTTGAAGGTGATACCTTGGTT	360		
Sbjct 314	AAAGATGACGGTAACACAGACACGTGCTGAAGTTAAGTTTGAAGGTGATACCTTGGTT	373		
Query 361	AATAGAATCGAGTTGAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGTAACATTTTGGGTACAAA	420		
Sbjct 374	AATAGAATCGAGTTGAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGTAACATTTTGGGTACAAA	433		
Query 421	ATGGAATACAACATAAATCTCATAATGTTTACATCATGGCAGACAAACCAAGAATGGT	480		
Sbjct 434	ATGGAATACAACATAAATCTCATAATGTTTACATCATGGCAGACAAACCAAGAATGGT	493		
Query 481	ATCAAAGTTAACTTCAAAATTAGACACAACATTAAAGATGGTTCTGTTCAATTGGCAGAC	540		
Sbjct 494	ATCAAAGTTAACTTCAAAATTAGACACAACATTAAAGATGGTTCTGTTCAATTGGCAGAC	553		
Query 541	CATTATCAACAAAATACTCCAATTGGTGATGGTCCTGTTTGTGTCAGACAAACATTAC	600		
Sbjct 554	CATTATCAACAAAATACTCCAATTGGTGATGGTCCTGTTTGTGTCAGACAAACATTAC	613		
Query 601	TTGTCTACACAATCTGCCTTGTCTAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGATCACATGATCTTG	660		
Sbjct 614	TTGTCTACACAATCTGCCTTGTCTAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGATCACATGATCTTG	673		
Query 661	TTGGAGTTTGTACAGCTGCTGGTATTACACATGGTATGGATGAATTGTACAAA	714		
Sbjct 674	TTGGAGTTTGTACAGCTGCTGGTATTACACATGGTATGGATGAATTGTACAAA	727		

Şekil 4.25. 8.koloniden saflaştırılan plazmite ait nükleotid sekansının blast sonucu

Download

Graphics

Sequence ID: Query_59613

Length: 1186

Number of Matches: 1

Range 1: 170 to 883

Graphics

Next Match

P

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1319 bits(714)	0.0	714/714(100%)	0/714(0%)	Plus/Minus
Query 1	ATGTCTAAAGGTGAAGAATTGTTCACTGGTGTGTTCCAATTTTGGTTGAATTGGATGGT	60		
Sbjct 883	ATGTCTAAAGGTGAAGAATTGTTCACTGGTGTGTTCCAATTTTGGTTGAATTGGATGGT	824		
Query 61	GATGTTAATGGTCAAAAATTCTCTGTTTCTGGTGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGT	120		
Sbjct 823	GATGTTAATGGTCAAAAATTCTCTGTTTCTGGTGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGT	764		
Query 121	AAATTGACCTTGAAATTTATTTGCACTACTGGTAAGTTGCCGTGTTCCATGGCCAACATTG	180		
Sbjct 763	AAATTGACCTTGAAATTTATTTGCACTACTGGTAAGTTGCCGTGTTCCATGGCCAACATTG	704		
Query 181	GTTACTACTTTCTCTTATGGTGTTCATGCTTTTCTAGATACCCAGATCATATGAAACAG	240		
Sbjct 703	GTTACTACTTTCTCTTATGGTGTTCATGCTTTTCTAGATACCCAGATCATATGAAACAG	644		
Query 241	CATGACTTTTTCAAGTCTGCCATGCCCGAAGGTTATGTTCAAGGAAAGAACTATATTTTAC	300		
Sbjct 643	CATGACTTTTTCAAGTCTGCCATGCCCGAAGGTTATGTTCAAGGAAAGAACTATATTTTAC	584		
Query 301	AAAGATGACGGTAACACAAGACACGTGCTGAAGTTAAGTTTGAAGGTGATACCTTGGTT	360		
Sbjct 583	AAAGATGACGGTAACACAAGACACGTGCTGAAGTTAAGTTTGAAGGTGATACCTTGGTT	524		
Query 361	AATAGAATCGAGTTGAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGTAACATTTTGGGTACAAA	420		
Sbjct 523	AATAGAATCGAGTTGAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGTAACATTTTGGGTACAAA	464		
Query 421	ATGGAATACAACATAACTCTCATAATGTTTACATCATGGCAGACAAACCAAGAATGGT	480		
Sbjct 463	ATGGAATACAACATAACTCTCATAATGTTTACATCATGGCAGACAAACCAAGAATGGT	404		
Query 481	ATCAAAGTTAACTTCAAAATTAGACACAACATTAAGATGGTTCTGTTCAATTGGCAGAC	540		
Sbjct 403	ATCAAAGTTAACTTCAAAATTAGACACAACATTAAGATGGTTCTGTTCAATTGGCAGAC	344		
Query 541	CATTATCAACAAAATACTCCAATTGGTGATGGTCCTGTTTGTGTTGCCAGACAACATTAC	600		
Sbjct 343	CATTATCAACAAAATACTCCAATTGGTGATGGTCCTGTTTGTGTTGCCAGACAACATTAC	284		
Query 601	TTGTCTACACAATCTGCCTTGTCTAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGATCACATGATCTTG	660		
Sbjct 283	TTGTCTACACAATCTGCCTTGTCTAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGATCACATGATCTTG	224		
Query 661	TTGGAGTTTGTACAGCTGCTGGTATTACACATGGTATGGATGAATTGTACAAA	714		
Sbjct 223	TTGGAGTTTGTACAGCTGCTGGTATTACACATGGTATGGATGAATTGTACAAA	170		

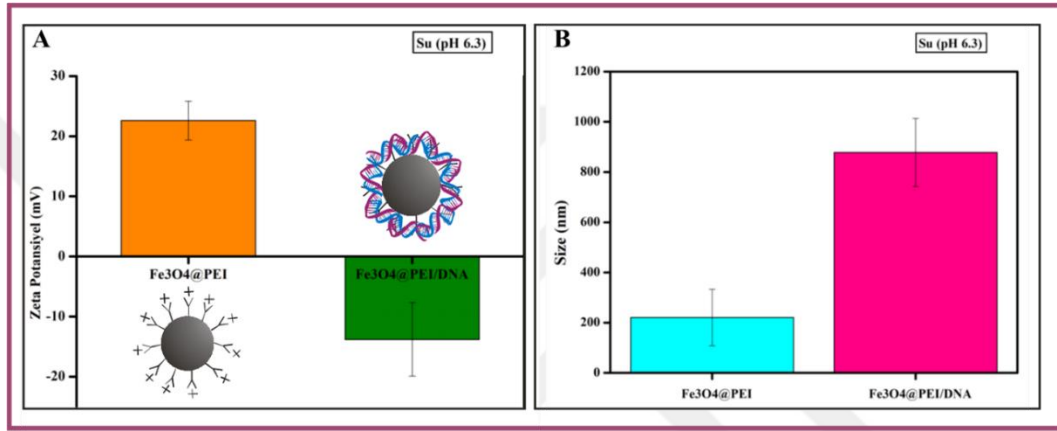
Şekil 4.26. 2. koloniden saflaştırılan plazmite ait nükleotid sekansının blast sonucu

4.6. pGKB-GFP Plazmitinin Maya Hücrelerine Transferi

4.6.1. Manyetofektin hazırlama

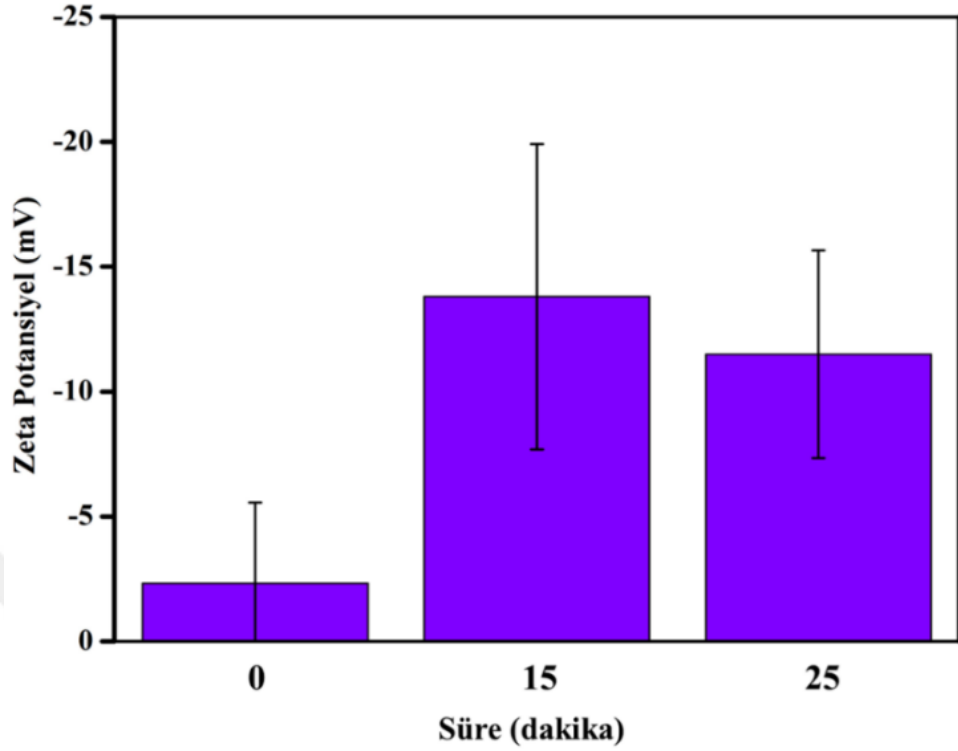
Fe₃O₄@PEI MNP ve pGKB-GFP ile elde edilen tüm optimize şartlarda hazırlanan manyetofektinin yani, DNA yüklü NP'lerin kararlılığının, suda dağılımının ve yüzey

yükünün belirlenmesi amacıyla DLS (Dinamik Işık Saçılımı; Dynamic Light Scattering) analizi yapıldı. Analiz sonuçları, Şekil 4.27’de verildi. Buna göre, zeta potansiyelleri incelendiğinde MNP/DNA kompleksinin yüzey yükünün negatif yönde artış gösterdiği, böylece kompleks oluşumunun başarılı ve kararlı olduğu, suda dağılımının yüksek ve kompleks boyutunun süpersarmal DNA’nın sahip olduğu hidrodinamik çaptan dolayı beklendiği gibi yüksek olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.27. DLS sonuçları (MNP ve MNP/DNA kompleksinin yüzey yükü (A), hidrodinamik boyutu (B))

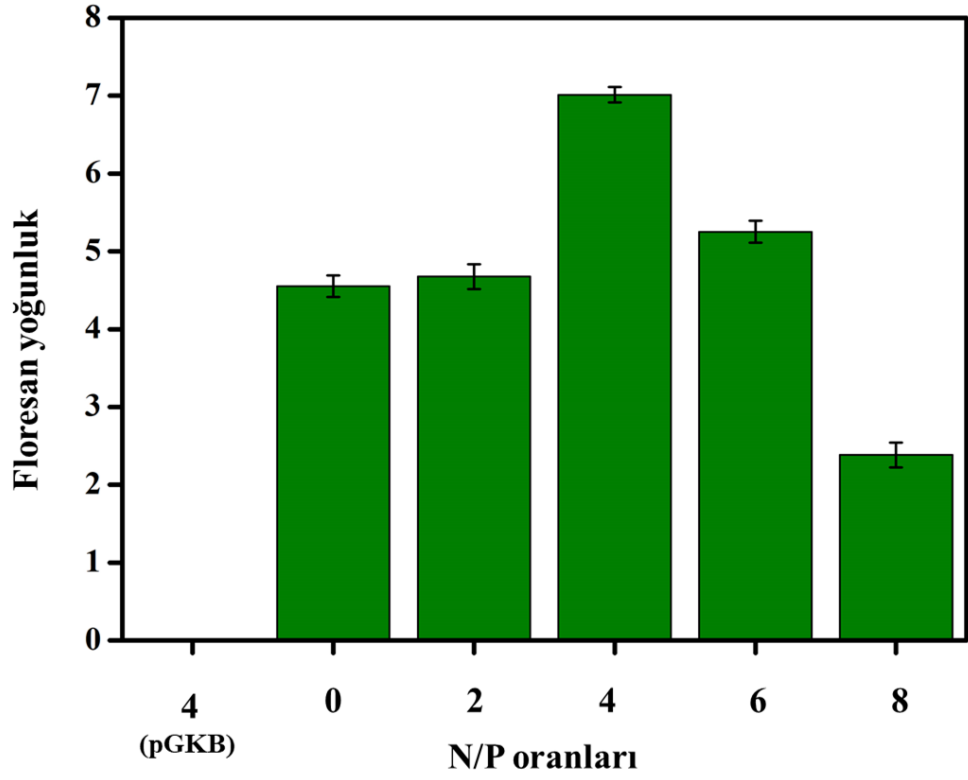
Aynı zamanda manyetofektin kompleksinin farklı sürelerde (0, 15 ve 25 dakika) alınan zeta potansiyel ölçümleri, zamanla yükün negatif yönde arttığını da gösterdi (Şekil 4.28). Sonuçlar incelendiğinde, en yüksek negatif yüzey yükünün 15. dakikada olduğu gözlemlendi. Bu süre, aynı zamanda en fazla DNA bağlandığı an olarak yorumlanabilir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda hazırlanan manyetofektin, manyetik alan altında (mıknatıs tutularak) maya hücrelerine gönderilirken 15 dakika mıknatıs tutulmasına karar verildi.



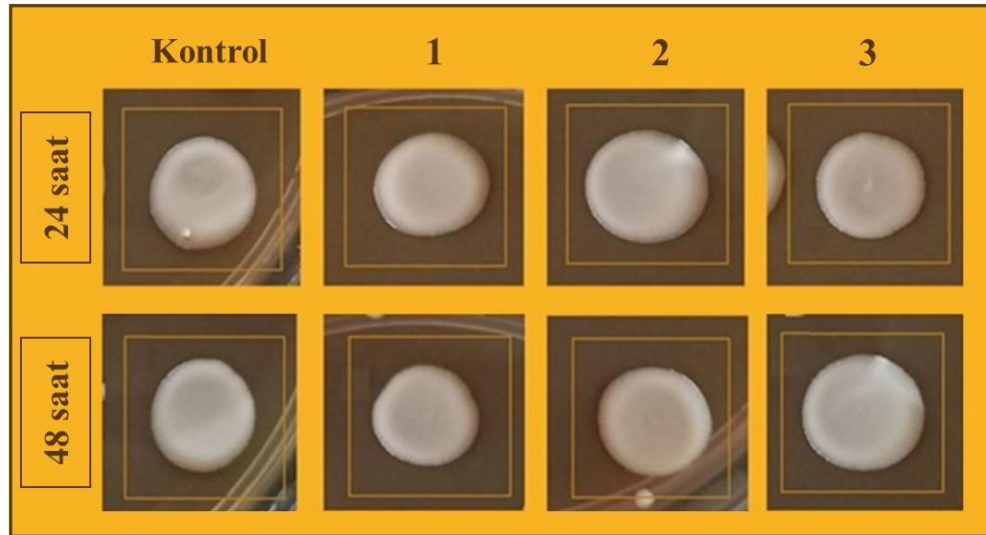
Şekil 4.28. Hazırlanan manyetofektinin farklı sürelerdeki davranışına ait DLS analiz sonucu

4.6.2. Halkasal rekombinant plazmitin maya hücrelerine transfer edilmesi

Halkasal pGKB-GFP plazmiti kullanılarak farklı N/P oranları ile hazırlanan manyetofektin örnekleri, *P. pastoris* hücrelerine gönderildi. Plazmitte yer alan genin ekspresyonu sonucu hücre içinde üretilen GFP miktarları, hazırlanan hücre lizatları ile floresan spektrofotometrede ölçüm yapılarak belirlendi. Buna göre hücreler tarafından üretilen rekombinant proteine ait en yüksek floresan yoğunluğa (GFP ışımasına) N/P 4 ile ulaşıldığı görüldü (Şekil 4.29). Diğer yandan, yapılan spotlama testi sonucunda hazırlanan manyetofektin örneklerinin (N/P 4) maya hücreleri üzerinde toksik etkisinin olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.30).



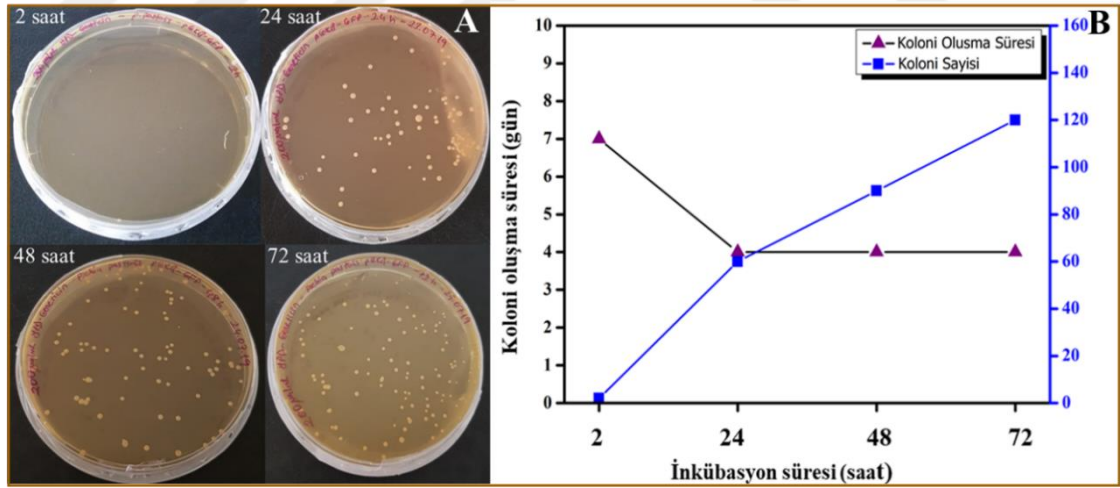
Şekil 4.29. Farklı N/P oranlarının etkisinin floresan yoğunluk ölçümü ile karşılaştırılması



Şekil 4.30. Spotlama testine ait maya görüntüleri (Kontrol: uygulama yapılmayan *P. pastoris* kolonileri; 1, 2 ve 3 nolu gruplar; sırasıyla, yalnızca MNP'nin gönderildiği, MNP/pGKB kompleksinin gönderildiği ve MNP/pGKB-GFP kompleksinin gönderildiği koloniler)

4.6.3. Lineer rekombinant plazmitin maya hücrelerine transfer edilmesi

Maya hücrelerine gen aktarımı gerçekleştirildikten sonra pGKB ve pGKB-GFP transformantlarını içeren *P. pastoris* kültürünün 2, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonun ardından hücreler, 200 µg/mL genetisin içeren YPD agara yayıldı. İnkübasyondan sonra antibiyotikli ortamda direnç gösterip gelişen kolonilere ait seçim plakların görüntüsü, bu kolonilerin oluşma süresi ve sayısı Şekil 4.31’de verildi. Koloni oluşumu gözlemlendikten yaklaşık 72 saat sonra petrilerin fotoğrafları çekildi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, 2 saatlik inkübasyonun ardından antibiyotik içeren besiyerine hücrelerin yayıldığı plakta, 7 gün sonra 2 koloni gözlenirken, 24 saatlik inkübasyonda; 4 gün sonra 60 koloni, 48 saatlik inkübasyonda; 4 gün sonra 90 koloni ve 72 saatlik inkübasyonda; 4 gün sonra 120 koloni oluşumu gözlemlendi. İnkübasyon süresi arttıkça koloni oluşum süresi kısalarak 24 saatten sonraki sürelerde sabit kaldığı, oluşan koloni sayısında ise inkübasyon süresiyle orantılı olarak artışın olduğu gözlemlendi.

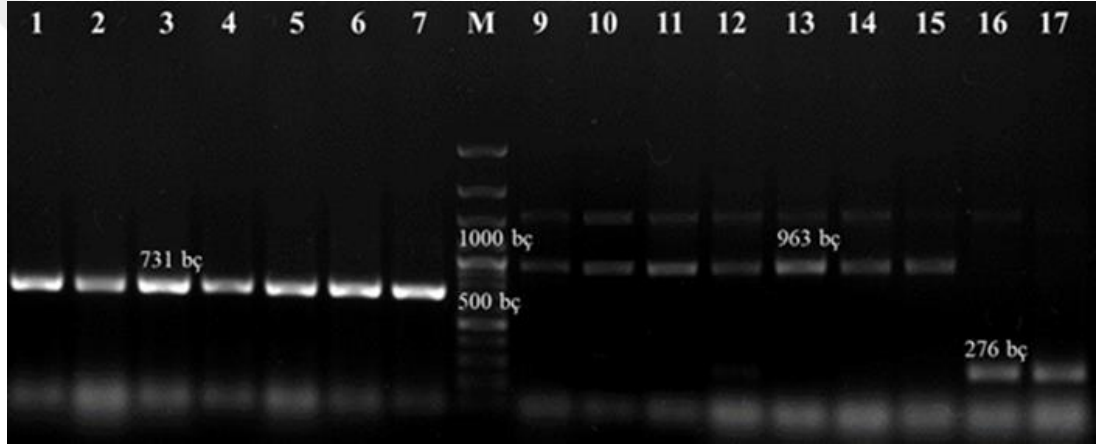


Şekil 4.31. pGKB-GFP taşıyan *P. pastoris* transformantları (Farklı sürelerde inkübasyonun ardından, gelişen kolonilere ait plak görüntüleri (A) ile koloni oluşma süreleri ve oluşan koloni sayılarının gösterimi (B))

4.7. Pozitif Maya Transformantlarının Doğrulanması

4.7.1. Koloni PCR

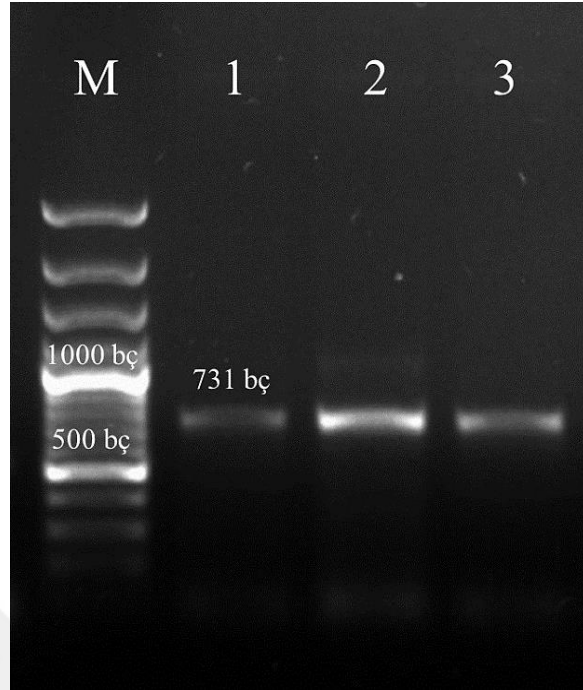
Transfer edilen lineer pGKB-GFP ve pGKB vektörlerinin maya genomuna entegre olup olmadığını tespit etmek amacıyla koloni oluşumu gözlenen tüm plakalardan rastgele seçilen koloniler ile PCR yapıldı. Reaksiyon sonrası elde edilen ürünlerin boyutlarının beklendiği gibi sırasıyla, 731 ve 963 bp olduğu görüldü (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. Koloni PCR reaksiyonu sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1-7 nolu kuyular; sırasıyla, 3-9. kolonilere ait gen primerleriyle yapılan PCR ürünleri; 9-15 nolu kuyular; sırasıyla, 9-3. kolonilere ait vektör primerleriyle yapılan PCR ürünleri; 16 ve 17 nolu kuyular; pGKB vektörünü taşıyan (kontrol) kolonilere ait vektör primerleriyle yapılan PCR ürünleri)

4.7.2. Genomik DNA izolasyonu ve çoklu kopya varlığının belirlenmesi

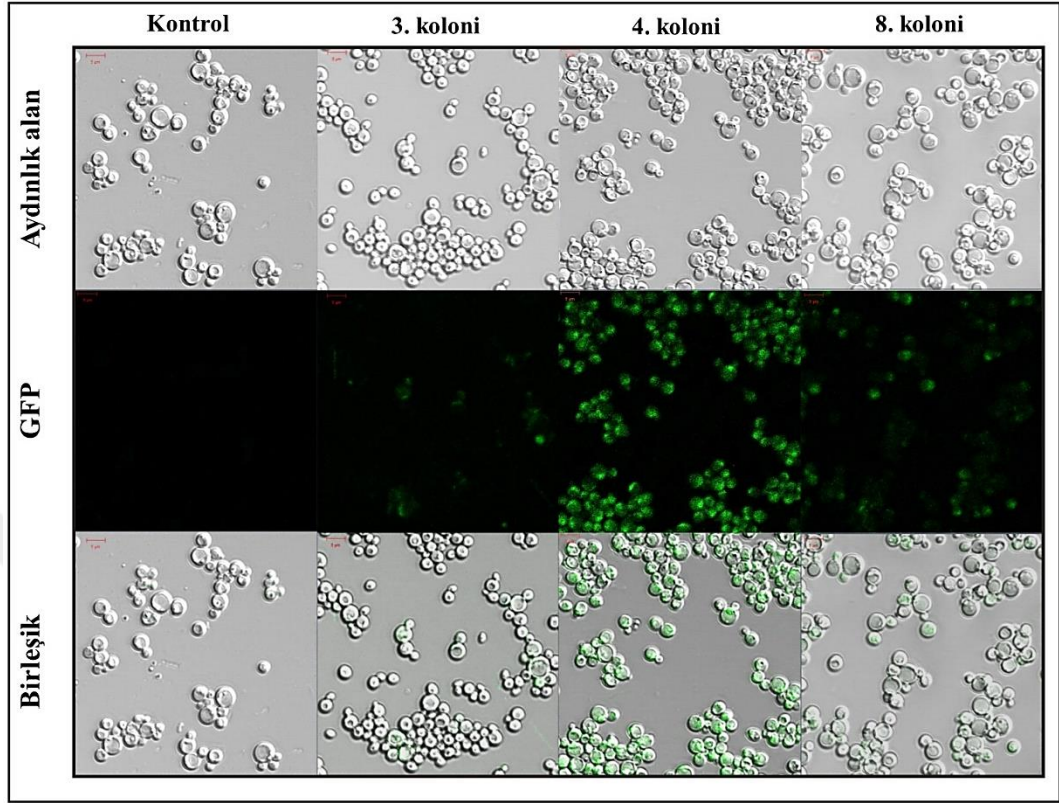
Transforme edilen maya kolonileriyle yapılan koloni PCR reaksiyonundan sonra 3, 4 ve 8 numaralı kolonilere ait saflaştırılan eşit miktarda genomik DNA'ların kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen ürünler, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. Maya transformantlarına ait gDNA ile gerçekleştirilen PCR sonucu agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1-3 nolu kuyular; sırasıyla, 3, 4 ve 8. kolonilere ait gDNA ile elde edilen PCR ürünleri)

4.8. Maya Transformantları ile GFP Üretiminin Görüntülenmesi

Pozitif maya transformantları ile GFP üretimi için, kontrol olarak pGKB vektörü transfer edilen ve rekombinant *P. pastoris* kolonilerinin YPD sıvı besiyerinde inkübasyonunun ardından hücreler, konfokal lazer tarama mikroskobu kullanılarak beyaz ve GFP floresan ışıktaki görüntülendi ve elde edilen görüntüler birleştirildi (Şekil 4.34). Elde edilen görüntülere bakıldığında, kontrol grubundaki hücrelerde GFP ışması gözlenmezken, en iyi GFP ışmasına 4. koloniyi oluşturan hücrelerin sahip olduğu, sırasıyla 8. ve 3. koloniyi oluşturan hücrelerin de 4. koloniyi oluşturan hücrelerden daha az GFP ışmasına sahip oldukları görüldü.



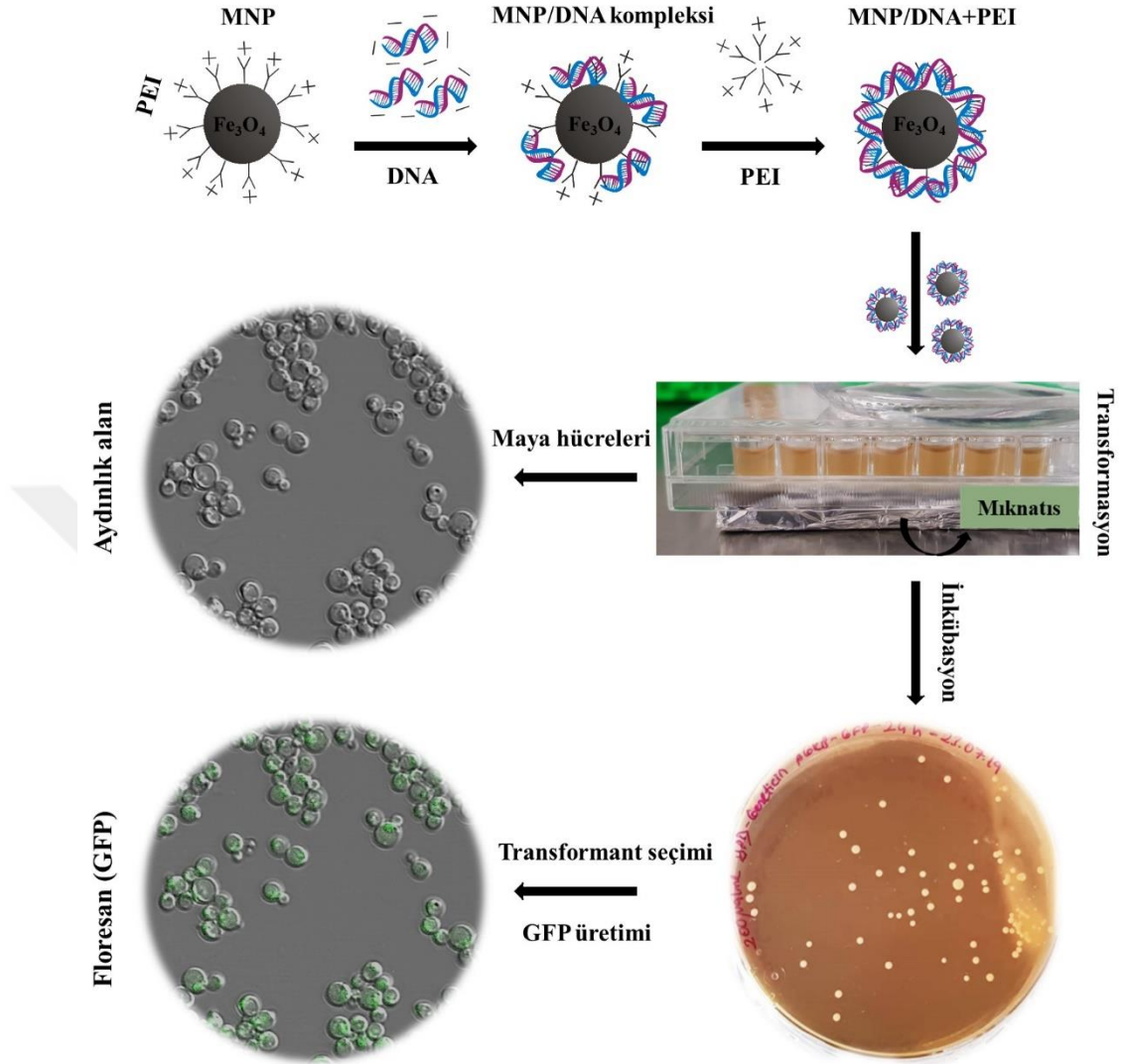
Şekil 4.34. *P. pastoris* hücrelerine ait konfokal mikroskop görüntüsü (Kontrol: pGKB plazmiti gönderilen; 3., 4. ve 8. koloniler: pGKB-GFP plazmiti gönderilen hücreler; Skala: 5 μm)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Rekombinant protein ekspresyonu ile ilgili bilgidaki artış ve bu proteinler için artan pazar talebi, heterolog olarak eksprese edilecek protein spektrumunu genişlettiğinden son zamanlarda heterolog protein ürünleri, endüstriyel uygulamaların yaklaşık üçte birini oluşturacak düzeye ulaşmıştır (Juturu and Wu 2018). Rekombinant protein üretimi için çeşitli avantaj ve dezavantajlara sahip olan bakteri, maya ve hayvan hücreleri olmak üzere üç çeşit konakçı kullanılmaktadır (Garnick *et al.* 1988; Hudayberdiyev ve Öner 1997). Bakteriyel konakçı olarak oldukça yüksek miktarda rekombinant protein üretiminde kullanılan en popüler *E. coli* ekspresyon sisteminden sonra ikinci ve üçüncü en uygun mikrobiyal sistemler sırasıyla, ökaryotik mikroorganizma olan, *S. cerevisiae* ve *P. pastoris*'tir (Jana and Deb 2005; Shrivastava *et al.* 2013). Her iki konakçı da insana yakın bir şekilde katlanabilen ve translasyon sonrası modifikasyon geçiren proteinleri üretme yeteneğine sahip olduğundan translasyon sonrası modifikasyonun gerekli olduğu proteinlerin üretiminde bu konakçılar tercih edilmektedir (Dalton and Barton 2014; Gupta and Shukla 2017). Endüstriyel açıdan etkili ürün geliştirmede tek hücre proteininin (SCP; Single Cell Protein) ticari üretimini ve hem hücre içi hem de hücre dışı rekombinant protein üretimini gerçekleştirebilen maya (*P. pastoris* gibi) ekspresyon sistemleri, büyük ölçekli fermentasyonda üretime olanak sağlayarak tanımlı besi ortamında kolayca büyür ve memeli hücre kültürasyon sürecinden nispeten daha uygun olmasının yanı sıra maliyet olarak daha ucuzdur (Gietz and Woods 2001; Dalton and Barton 2014; Gupta and Shukla 2017).

Rekombinant proteinin elde edilmesinde öncelikle, ilgili genin uygun bir ekspresyon vektöründe promotör arkasına yerleştirilerek rekombinant vektörün (rDNA) elde edilmesi, sonrasında ise rDNA'nın konakçıya gen aktarımı için uygun olarak belirlenen biyolojik, kimyasal ya da fiziksel yöntemlerden biriyle aktarılması ve ilgili genin konakçı genomuna entegrasyonu gerekmektedir. LiCl-ısı şoku ve elektroporasyon, *P. pastoris*'e gen aktarımında sıklıkla kullanılan yöntemlerdendir. Son zamanlarda popüler olan, ucuz, hızlı ve yüksek transfeksiyon başarısı gösteren manyetofeksiyon ise pek çok araştırmacı tarafından memeli hücrelerine gen aktarım (transfeksiyon) yöntemi olarak tercih

edilmektedir. Manyetik nanopartiküllerin (MNP) gen taşıyıcı platform olarak kullanıldığı bu yöntem, diğer yöntemler uygulandığında gözlenen düşük transfeksiyon etkinliği (özellikle makrofaj ve polen gibi hücrelerde) sorununa çözüm olarak ortaya atılmıştır (Lim *et al.* 2013; Zhao *et al.* 2017). Manyetofeksiyonun ana fikri, MNP ve hedef hücreye aktarılmak istenen yabancı bir genin bir araya getirilerek tuz-indüklü çökelme ve elektrostatik etkileşimle MNP/DNA kompleksinin (manyetofektin) elde edilmesi ve bu kompleksin hedef hücreler ile bir araya getirilerek hücrelere manyetik kuvvet uygulanmasıdır. Manyetik kuvvet, nükleik asitlerin hücrelere hızlı ve konsantre bir şekilde geçişini sağlamaktadır (Plank *et al.* 2011). Bu yöntem ile diğer viral olmayan vektörlere kıyasla oldukça kısa sürede ve düşük DNA miktarı (10 ile 100 kat daha az nükleik asit kullanımı) ile uygulama yapılmaktadır. Ayrıca, transfeksiyon/transdüksiyon etkinliği en yüksek yöntem olarak bilinmektedir (Smolders *et al.* 2018). Edinilen bu bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında hazırlanan MNP/DNA kompleksinin manyetik bir alan altında mıknatıs aracılığıyla maya hücrelerinin duvarından geçip önce sitoplazmaya kavuşması, daha sonra kompleksten salınan DNA'nın çekirdeğe ulaşip maya genomuna entegre olabileceği fikri ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla, gen transferinde genellikle LiCl ve elektroporasyon yöntemleri kullanılan *P. pastoris* ekspresyon sistemi için manyetik nanopartikül ile gen aktarımının gerçekleştirilebileceği bir protokol geliştirilmesinin, literatürde yer alan bu tür gen aktarım yöntemlerine önemli bir alternatif olabileceği düşünülmüştür. Bu fikirden yola çıkılarak başlatılan tez çalışmasında manyetik alan yardımıyla *P. pastoris* hücrelerine gen aktarımında aracı olarak; oldukça küçük, hazırlanan tamponlarda iyi dağılabilen, yüzeyi DNA bağlamaya uyumlu (pozitif), süpermanyetik ve maya canlılığı üzerine olumsuz etki göstermeyen bir taşıyıcı ($\alpha\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$) elde edildi. Elde edilen bu taşıyıcı ile birlikte gen aktarımının takibini kolaylaştıran raportör GFP geninin kullanıldığı ve maya hücrelerine gen aktarımının başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği çalışmanın özeti Şekil 5.1'de verildi.



Şekil 5.1. Çalışmanın özeti

Gen transfer aracı olarak kullanılan manyetit (Fe₃O₄) sentezi ile ilgili literatürde farklı yöntemler bulunmaktadır. Bunlar arasında demir oksit MNP sentezinde, ferrik ve ferrus klorürün (FeCl₂ ve FeCl₃) bazık ortamda birlikte çöktürüldüğü ucuz ve kolay olan bir yöntem kullanılmaktadır (Steitz *et al.* 2007). Bu nedenle, bu çalışmada birlikte çöktürme yöntemi kullanılarak MNP'ler üretildi. Sonuçlar, literatür ile karşılaştırıldı ve elde edilen MNP'lerin kristal yapısının manyetit (Fe₃O₄) olduğu teyit edildi (Sun *et al.* 2014; Chaki *et al.* 2015; Noval and Carriazo 2019). MNP'leri kararlı kılmak için dallı yapıya sahip ve halihazırda DNA aktarım ajanı olarak kullanılan ve pozitif yüke sahip olan polietilenimin (PEI) kullanıldı. PEI kaplı MNP'ler, suda stabil halde kalabilmekte ve nükleik asitleri

bağlayarak manyetik alan etkisi altında hareket edebilme yeteneğine sahip olduğu için bunlarla istenilen bölgeye hedefleme yapılabilir (Kami *et al.* 2011). MNP'ler negatif yüzey yüküne sahip olduğu için PEI, elektrostatik olarak MNP yüzeyini sarmaktadır. PEI kaplı manyetik nanopartiküllerin sentezlenmesinin ardından yapılan FTIR analiz spektrumunda gözlenen 3219 ve 1630 cm^{-1} 'deki pikler, PEI yapısında bulunan -NH deformasyonunu göstermektedir. Bunun dışında, 1452 cm^{-1} 'deki pik de -N-H yapısını göstermektedir (Islam *et al.* 2014; Han *et al.* 2016). Ayrıca PEI, dallı yapıya sahip olduğu için partikülleri kümeler halinde sarabilmekte ve DNA yükleme oranını düşürmektedir. Asidasyon işlemi, bu yapıyı çözmekte ve daha fazla pozitif yüke sahip kararlı bir MNP solüsyonunun elde edilmesini sağlamaktadır (Zhang *et al.* 2014). Pozitif yük sayısının artmasına bağlı olarak aynı yüklü partiküllerin birbirini daha fazla itmesiyle nanopartiküllerin kümelenme eğiliminin düştüğü bilinmektedir (Wang *et al.* 2009). Dolayısıyla PEI'nin dallı yapısının açılmasıyla ve pozitif yüzey yükünün artmasıyla daha fazla DNA tutabileceği öngörüldüğünden, sentezlenen $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ MNP'lerine asidasyon işlemi uygulandı. Asidasyon işlemi sonrası, elde edilen $\text{aFe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ MNP'lerin şeklinde ve boyutunda herhangi bir bozulmanın meydana gelmediği, yapısında bulunan PEI'nin dallı yapısının açılmasıyla partiküllerin birbirinden biraz daha uzaklaştığı (SEM ve TEM analizi), PEI'den dolayı pozitif yüke sahip olduğu ve asidasyon işleminden sonra ise pozitif yük miktarının arttığı, buna bağlı olarak da aynı yüklü nanopartiküllerin birbirini daha fazla itmesiyle suda daha iyi bir dağılım gösterdiği (DLS analizi) ve elde edilen $\text{aFe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ NP'lerin süpermanyetik olduğu (VSM analizi) belirlendi. Ayrıca, asidasyon işleminin MNP'lerin mıknatıs tarafından hızla toplanabilmesini sağladığı ve asidasyon uygulanmayan grupta ise toplanmanın daha yavaş olduğu gözlemlendi. Dolayısıyla, MNP'lerin mıknatıs tarafından yavaş toplanma durumunun hücrelere DNA'nın hızla ulaştırılmasında bir dezavantaj olacağı düşünüldüğünden, bu düşüncenin doğruluğunu test etmek amacıyla asitleme yapılan ve yapılmayan MNP'ler, DNA ile inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, $\text{aFe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ NP'lerin DNA'yı daha hızlı bir şekilde bağladığı gözlemlendi. Elde edilen bulgular doğrultusunda, solüsyondaki manyetik nanopartiküllerin yük dengesini koruduğu için askıda kaldığı (dispersiyon) (Sun *et al.* 2004), fakat ortama eklenen DNA'dan dolayı yük dengesinin bozulmasıyla partiküllerin kümelenmesine neden olduğu söylenebilir. Bu

şekilde asitleme yapılan grupta gözlenen hızlı kümelenmenin sebebi olarak, asitleme sonucu PEI'nin sahip olduğu dallı yapının açıldığı ve asidasyonla pozitif yük sayısının arttığı dolayısıyla da DNA ile daha fazla kompleks oluşturduğu söylenebilir. Ayrıca asidasyon işleminin, transfeksiyon başarısı üzerinde olumlu bir etkisi olduğu bildirildiğinden çalışmada asitleme yapılmış nanopartiküllerin kullanılmasına karar verildi (Wang *et al.* 2009).

Hazırlanan örneğe, sabit frekansta manyetik alan uygulandığında eğer örnek manyetik özellik gösterirse bir mıknatıs gibi davranır ve geçici bir manyetik akıştan dolayı iletken çubuğun içinde potansiyel fark oluşturur. Oluşan bu potansiyel fark, titreşimli manyetometre ile ölçülerek örneğin manyetik özelliğini belirlemektedir (Gnanaprakash *et al.* 2007; Semiz 2008). Elde edilen $a\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ NP'lere ait VSM analiz sonucu partiküllerin süpermanyetik olduğu belirlendi.

Nanopartiküllerin boyut ve yük dağılımlarını belirlemek için Zetasizer cihazı kullanıldı. Cihaz, ölçüm yöntemi olarak dinamik ışık saçılması (DLS) kullanmaktadır. Dinamik ışık saçılması, örneğin küçük bir kısımdan saçılan ışığın mikrosaniyenin onda biri ile milisaniye zaman aralığındaki değişiminin ölçülmesi olarak ifade edilmektedir (Semiz 2008). Bu teknik, bir elektrik alanı içindeki yüklü partikülün hızının ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Partikül ve içinde bulunduğu sıvı arasında zeta potansiyeli oluşmakta ve bu potansiyel, ortam pH değerinden etkilenmektedir. Dolayısıyla, sentezlenen partiküllerin suda dağılımı ve yüzey yükünün belirlenmesi için MNP'ler, pH değeri 6,3 olan nükleaz içermeyen su ile seyreltildi ve yaklaşık 3 mL hacimli küvet içerisine konularak DLS analizi yapıldı. Analiz sonucunda MNP boyutunun, SEM ve TEM görüntülerinin aksine ortalama 250 nm olduğu görüldü. Bu durumun, DLS tekniğinin hidrodinamik çapı ölçmesinden kaynaklandığı söylenebilir (Semiz 2008). MNP'lerin yüzey yükü (zeta potansiyeli) ise pozitif olarak ölçüldü. Bu durumun da, yüzeydeki PEI yapısının varlığından kaynaklandığı düşünüldü. Partikül yüzey yükünün pozitif olarak ölçülmesi, manyetofektin optimizasyon çalışmalarında NP'lere daha fazla DNA yüklenmesi için bir avantaj olarak görüldüğünden daha sonraki çalışmalarda pH değeri 6,3 olan nükleaz içermeyen su kullanıldı. Ayrıca DLS analizi ile nanopartikülün

polidispersite indeksi (PDI) hakkında da bilgi edinilmektedir. PDI değerlerinin 0,05-0,7 arasında olması, partiküllerin monodispers özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. DLS analizi sonucu sentezlenen nanopartiküllerin PDI değerinin 0,238 olduğu ve dolayısıyla elde edilen sentez ürününün monodispers yapıda olduğu görüldü.

Hücre canlılığının ve çoğalmasının devam edip etmediğini gözlemlemek amacıyla çeşitli testler ve uygulamalar yapılmaktadır (Kwalek-Mirek and Zadrage-Tecza 2014). Bu tez çalışmasında, gen aktarımında taşıyıcı olarak kullanılan $\alpha\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ manyetik NP'lerin, *P. pastoris* hücreleri üzerindeki toksisitesini incelemek amacıyla proliferasyon ve spotlama deneyleri yapıldı. Bu deneylerden önce partiküllerin hücresel alımını doğrulamak için sentezlenen floresans molekül ile etiketli NP'ler, miknotis aracılığıyla maya hücrelerine gönderilerek hücre içindeki MNP'lerin varlığı floresan mikroskop ile gösterildi.

Hücre içerisine farklı konsantrasyonlarda gönderilen MNP'lerin, hücre büyümesi üzerine herhangi bir olumsuz etkisinin olup olmadığının gözlemlendiği proliferasyon testi ve aynı kültür ortamından alınan hücrelerin ışık mikroskopunda görüntüleme ve spotlama testi sonuçlarının birbirini doğruladığı görüldü. Bu durum, üretilen MNP'lerin, maya hücrelerinin morfolojisine ve büyümesine olumsuz bir etkisinin olmadığını ve gen aktarımında aracı olarak kullanılabileceğini gösterdi. Elde edilen $\alpha\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ NP'lerin gen aktarım aracı olarak kullanılabileceği görüldükten sonra MNP/DNA kompleksinin (manyetofektin) hazırlanmasına ve yöntemin optimizasyonuna ait çalışmalar yapıldı. Manyetofeksiyon yönteminin memeli hücrelerinde sunduğu avantajlardan biri de transfeksiyonda kullanılan DNA miktarının azaltılması halinde bile yüksek transfeksiyon başarısının elde edilmesidir. Bu doğrultuda, çalışmada maya hücrelerine gen aktarımının düşük miktarda DNA ve yüksek etkinlik ile gerçekleştirilmesi hedeflendi. Dolayısıyla, hazırlanan manyetofektinin miknotis aracılığıyla *P. pastoris*'e gönderilmesi ve aktarılan genin maya genomuna entegrasyonu için yeterli olabileceği düşünülen DNA miktarı (1000 ng/ μL) ile optimizasyon çalışmaları yapıldı.

Manyetofektin hazırlama optimizasyon çalışmalarında öncelikle maya hücrelerine gen transferi için aracı olarak kullanılan MNP'lere DNA (salmon sperm DNA) bağlamak üzere süre ve miktar optimizasyonu yapıldı. Manyetofektin hazırlamak için oluşturulan deney gruplarında eşit hacimde (12 µL) MNP, DNA ve PEI kullanıldı. Literatürde yapılan çalışmalarda yer alan manyetofeksiyon işlemlerinde genellikle N/P 8 oranında PEI kullanıldığı bilindiğinden süre optimizasyonu çalışmalarında bu orana göre hazırlanan PEI solüsyonu kullanıldı (Schermant *et al.* 1995).

Süre optimizasyonu deneyinde, MNP'lere DNA bağlanması için önce MNP ve DNA karıştırılarak farklı sürelerde inkübe edildikten sonra optimum DNA bağlanma süresi belirlendi. Daha sonra ortama, N/P 8 için gerekli miktarda ekstra PEI eklenerek farklı sürelerde inkübasyon gerçekleştirildi ve en yüksek miktarda DNA'nın bağlandığı süre belirlendi. Her iki optimizasyon deneyleri sonucunda elde edilen bulgular, en yüksek DNA bağlanma miktarının 30 dakikalık inkübasyon gruplarında olduğunu gösterdi.

Süre optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra manyetofektin hazırlama aşamasında kullanılan ekstra PEI'nin DNA bağlanma oranı üzerindeki etkisini belirlemek için farklı oranlarda PEI kullanılarak DNA bağlanma oranları karşılaştırıldı. Bilindiği gibi gen aktarımının başarılı olabilmesi için DNA'nın hücre içinde bozulmadan korunması ve zarar görmeden çekirdeğe ulaşması gerekmektedir. Bu doğrultuda gen aktarımı için en kapsamlı olarak incelenen polimerler arasında hem farklılaşmış hem de farklılaşmamış hücrelerde yüksek transfeksiyon etkinliği gösteren PEI, önemli ölçüde ilgi çekici olmaktadır (Aravindan *et al.* 2009). PEI'nin, yüksek pozitif yüzey yüküne sahip olması nedeniyle negatif hücre zarıyla kolay bir şekilde etkileşime girip hücre alımı arttırdığı, endositoz yoluyla hücreler tarafından kolaylıkla alındığı ve katyonik yapısı sayesinde proton-sünger etkisi ile endozomal degradasyondan kaçtığı bilinmektedir (Aravindan *et al.* 2009; Hoskins *et al.* 2012). PEI'nin sahip olduğu bu özelliklerden dolayı NP'lerin daha fazla DNA'yı bağlayabilmesi için MNP/DNA kompleks ortamına eklenecek olan ekstra PEI miktarının belirlenmesinde, PEI'nin yapısındaki nitrojenin (N), 1 µg DNA'nın yapısındaki fosfat gruplarına (P) olan oranına göre belirlenen, ayrıca transfeksiyon başarısını da etkilediği bilinen farklı N/P oranlarında manyetofektinler hazırlanarak DNA

yükleme oranları karşılaştırıldı (Hinnen *et al.* 1978). Sonuçlar incelendiğinde, en yüksek DNA bağlanma miktarı, N/P 2 ve 4'te gözlendi. Farklı günlerde ve daha büyük hacimlerde (120'şer μ L MNP, DNA, PEI ile) tekrarlanan deney gruplarının hepsinde N/P oranı arttıkça DNA bağlanma miktarında azalma gözlendi. Bu durumun, artan PEI miktarının, DNA'yı ve MNP'yi ayrı ayrı sarması dolayısıyla DNA'nın MNP ile birlikte mıknatıs tutulan tarafa yönelmesine engel olmasından kaynaklandığı düşünüldü. DNA bağlanma miktarı, N/P 2 ve 4'te hemen hemen aynı olmasına rağmen pozitif yük miktarı ne kadar fazla olursa negatif yüklü hücre zarıyla o kadar fazla etkileşim olacağı ve dolayısıyla hücre alımının artacağı öngörüldüğünden (Arsianti *et al.* 2010a; Hoskins *et al.* 2012) farklı N/P oranlarını elde etmede kullanılan ekstra PEI'nin hücre alımına etkisinin belirlenmesi ve GFP ifadesinin doğrulanması için N/P oranı miktar optimizasyonu deneyi ile eş zamanlı olarak halkasal pGKB-GFP vektörü kullanılarak manyetofektin hazırlandı. Hazırlanan manyetofektin, mıknatıs tutularak *P. pastoris* hücrelerine transfer edildi. Plazmitte yer alan genin ekspresyonu sonucu hücre içinde üretilen rekombinant protein (GFP) miktarlarını karşılaştırmak amacıyla 48 saatlik inkübasyonun ardından hücre içi floresan yoğunluk, GFP'nin tamamen çözünür bir biçimde var olduğu varsayımına dayanarak (Scholz *et al.* 2000; Sarra megna *et al.* 2002), ölçülebileceğinden hücre lizatları hazırlandı. Hazırlanan lizat örnekleri, floresan spektrofotometrede ölçülerek grupların GFP ışıma miktarları karşılaştırıldı. Buna göre, hücreler tarafından üretilen rekombinant proteine ait en yüksek floresan yoğunluğa (GFP ışımasına) N/P 4 ile ulaşıldığı görüldü. Elde edilen sonuçların, manyetofektin hazırlama basamağında gerçekleştirilen PEI miktar optimizasyonu deneyleri sonucunda yüksek DNA bağlanması görülen N/P 4 oranını desteklediği görüldü.

Manyetofeksiyon işleminde aracı olarak kullanılan ve önceki toksisite deneylerinde toksik olmadığı belirlenen $\alpha\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ MNP'lerin manyetofektin için optimum miktarının belirlenmesinde, farklı konsantrasyonlarda MNP kullanılarak deney grupları oluşturuldu ve grupların DNA bağlama kapasiteleri belirlendi. Sonuçlar incelendiğinde, MNP miktarı arttıkça DNA bağlanma miktarında da artış olduğu gözlendi. Böylece hem yüksek miktarda DNA bağlayabilen hem de maya hücreleri üzerinde oluşabilecek toksik

etkinin minimuma indirgenebileceği en düşük doz olarak 7,5 µg MNP kullanılmasına karar verildi.

P. pastoris'te rekombinant protein verimini arttırmak amacıyla gerçekleştirilen genel stratejilerden biri de canlı organizmalardaki protein ifadelerini en üst düzeye çıkarmak için bir türün (orijinal diziye sahip organizma) nükleotid sekanslarını başka bir türün (konakçı organizma) nükleotid sekanslarına dönüştürerek hedef genlerin translasyon verimliliğini arttıran kodon optimizasyon yöntemini kullanmaktır (Al-Hawash *et al.* 2017; Yang and Zhang 2018).

Yabancı protein üretiminin, konakçı ile doğal gen arasındaki kodon kullanımındaki farktan etkilenebildiği bildirilmiştir (Tu *et al.* 2016). Kodon kullanımı, farklı organizmalar arasında değişiklik gösterdiğinden, *P. pastoris*'in tercih edilen kodon kullanımına göre nadir kullanılan kodonların değiştirilmesi, yüksek ekspresyon seviyeleri elde etmek için gereklidir. Kodon optimizasyonu yapılırken, haberci RNA'nın ikincil yapısı, kodon adaptasyon indeksi (CAI) ve transfer RNA havuzu dahil diğer faktörler de dikkate alınmalıdır. Örneğin, Tu *et al.* (2016), önemli bir antiviral sitokin olan ve aynı zamanda çok çeşitli immün modüle edici özelliği bulunan sığır interferon- α (bIFN- α)'yı kodon optimize etmiş ve hücre dışında çözünür formda bulunan opti-bIFN- α ekspresyonunun, doğal bIFN- α 'nın üç katı kadar olduğunu ifade etmiştir. Zhang *et al.* (2018), ilk deneylerinde doğal FIP-gap (Mantar immünomodülatör proteinleri) genlerini *P. pastoris*'te ekspresyonunu gerçekleştirmiş, ancak ekspresyon seviyesinin oldukça düşük olduğunu görmüştür. Doğal FIP-gap genlerindeki kodonları daha sık kullanılan kodonlarla değiştirdikten sonra ekspresyon seviyesinin anlamlı şekilde arttığını ifade etmiştir. Kaishima *et al.* (2016), yaptıkları çalışmada denizanası GFP geninin kodon optimizasyonunu *S. cerevisiae*'nin kodon kullanımına göre yapmış ve kodon optimizasyonunu gerçekleştirmediği hücrelerle GFP ekspresyonunu karşılaştırmıştır. Sonuçta GFP kodon optimizasyonu, bu proteinin ekspresyon seviyesini önemli ölçüde arttırmıştır ve hücrelerin floresan yoğunluğu, maksimum 101 kat artmıştır.

Bu tez çalışmasında maya genomuna aktarılmak istenen heterolog genin entegrasyonunun ve ekspresyonunun gerçekleştiğini görebilmek için denizanası yeşil floresan proteini (GFP) kullanıldı. Bu protein, son yıllarda en yaygın olarak kullanılan raportör proteinlerinden biri haline gelmiştir. Hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde floresans özelliği sayesinde kolaylıkla görselleştirilen bir proteindir (Yang *et al.* 2014). *P. pastoris* hücrelerine aktarılmak üzere kullanılan GFP geninin translasyon verimliliğini arttırmak için amino asitler değiştirilmeden sadece S, L, G ve V (serin, lösin, glisin ve valin) amino asitlerini kodlayan düşük frekanstaki kodonlar, *P. pastoris*'in kodon kullanım eğilimi dikkate alınarak daha yüksek frekanstaki aynı amino asitleri kodlayan kodonlarla yer değiştirildi. Böylece kodon optimizasyonu ile doğal GFP genine ait kodon adaptasyon indeksi (CAI) %78' den %91'e çıkarıldı. Sentetik olarak temin edilen kodon optimize GFP geni, bu diziye göre dizayn edilen primerler ile PCR'da amplifiye edildikten sonra *EcoRI* ve *KpnI* enzimleri ile kesilip, aynı enzimlerle kesilen pGKB vektör DNA'sı ile bir araya getirildi (ligasyon). *E. coli* TOP10 hücrelerinin ligasyon ürünü ile transformasyonu sonucu LB-kanamisin agar besiyerinde gelişen koloniler ile yapılan PCR reaksiyonunun ardından seçilen muhtemel rekombinant kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldı. Plazmitlerin sekans analizi yaptırıldı. Analiz sonucu elde edilen nükleotid sekansları, kodon optimize GFP nükleotid sekansı ile blastlandığında %100 eşleşme görüldü.

pGKB-GFP yüklü MNP'lerin kararlılığının, suda dağılımının ve yüzey yükünün belirlenmesi amacıyla DLS analizi ile karakterizasyon yapıldı. MNP'ler, yapısındaki PEI'den dolayı pozitif yüklüdür. DNA ise fosfat grupları nedeniyle negatif yüklüdür. MNP'lerin DNA bağlaması ile birlikte NP yüzey yükünün negatif değerlere doğru düşmesi beklenir. Dolayısıyla beklenildiği gibi $\alpha\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ MNP ve DNA yüklü MNP yüzey yüklerinin ve boyutlarının değiştiği gözlemlendi. Pozitif yüke sahip olan MNP'ler, negatif yüklü DNA ile bir araya getirildiğinde oluşan manyetofektin kompleksinin zeta potansiyeli beklenildiği gibi negatif değer gösterdi. Bu durum da, MNP'lerin DNA ile başarılı bir şekilde kompleks oluşturduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, pozitif yüke sahip olan MNP'ler ile negatif yüke sahip olan DNA arasında elektrostatik olarak bir etkileşim meydana gelir ve elde edilen MNP/DNA kompleksinin yüzey yükünün,

bağlanan DNA miktarına göre değişim gösterdiği söylenebilir. DNA yüklü olan $\text{aFe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ MNP'lerle DNA yüklü olmayan $\text{aFe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ MNP'lerin boyutları arasındaki farkın, kullanılan süpersarmal DNA'nın sahip olduğu hidrodinamik çaptan kaynaklandığı bilinmektedir (Semiz 2008). Aynı zamanda manyetofektin kompleksinin farklı sürelerde alınan zeta potansiyel ölçümleri, zamanla yükün negatif yönde arttığını da gösterdi. DLS sonuçları incelendiğinde, en yüksek negatif yüzey yükü 15 dakikada gözlemlendiği için bu sürenin DNA bağlanması için yeterli olduğu düşünüldü. Dolayısıyla, gen aktarımı için hazırlanan manyetofektin, manyetik alan altında maya hücrelerine gönderilirken 15 dakika mıknatıs tutulmasına karar verildi.

Manyetofektin hazırlama basamağında optimum N/P oranının 4 olduğu, halkasal pGKB-GFP plazmiti ile hazırlanan manyetofektin örneklerinin *P. pastoris* hücrelerine transfer edilmesiyle belirlenmişti. Böylelikle, bu deneyle maya hücrelerinde GFP'nin ekspresyonu da doğrulanmış oldu. Diğer yandan, yapılan spotlama testiyle hazırlanan manyetofektinin maya hücreleri üzerinde toksik etkisinin olmadığı görüldü. Daha sonraki aşamada maya hücrelerinin genomuna GFP geninin entegrasyonu için lineer hale getirilen pGKB-GFP, 1 $\mu\text{g}/12 \mu\text{L}$ olacak şekilde nükleaz içermeyen suda çözülüp, $\text{aFe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ MNP'ler ile bir araya getirilerek optimum şartlarda manyetofektin elde edildi. Direnç geni aktarılmamış mayaların 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ genetisin içeren besiyerinde gelişim gösterebildikleri ve seçim için en az 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ genetisine ihtiyaç duyulduğu bilindiğinden (Papakonstantinou *et al.* 2009; Yang *et al.* 2014), transformasyon işlemi sonrasında geni alan maya kolonilerinin seçilimi için 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ genetisin içeren YPD agar besiyerleri kullanıldı. Manyetofektinin mıknatıs aracılığıyla maya hücrelerine transfer edilmesinin ardından, antibiyotik direnç geninin ekspresyonuna izin verilmesi amacıyla hücrelere antibiyotik içermeyen YPD sıvı besiyerinde en az iki saat inkübasyon süresi tanındı (Guerra *et al.* 2006). Direnç geninin ekspresyonu için tanınan 24 saatlik inkübasyonun ardından yayılan plaklarda dikkate değer miktarda antibiyotiğe direnç gösteren kolonilerin geliştiği görüldü. Ayrıca inkübasyon süresi arttıkça da (48 ve 72 saat) antibiyotiğe direnç gösteren koloni sayısında artış görüldü. Transformantların yayıldığı tüm plakların inkübasyonunun ardından, gelişen kolonileri oluşturan maya hücrelerinin

genomuna lineer pGKB-GFP ve pGKB vektörlerinin entegrasyonu, koloni PCR ve gDNA'ların kullanıldığı PCR reaksiyonu ile doğrulandı.

Gen kopya sayısının, *P. pastoris*'te heterolog proteinlerin ekspresyon seviyelerini iyileştirmenin kritik bir parametresi olduğu kanıtlanmış ve kopya sayısının bir dereceye kadar arttırılmasının, verimin artmasına önemli ölçüde katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Yang *et al.* 2012). PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılan DNA miktarının tüm numunelerde aynı olmasına rağmen, ekspresyon kasetinin maya genomuna çoklu halde yerleştirilmesiyle meydana gelen kopya sayıları arasındaki fark, PCR amplifikasyonu ile bant yoğunluklarında saptanabilir bir değişikliğe yol açmıştır (Athmaram *et al.* 2012). Bu bilgi doğrultusunda, seçilen kolonilere ait genomik DNA'lar ile yapılan PCR reaksiyonu sonrası, Şekil 4.33'te verilen jel görüntüsü incelendiğinde en fazla bant yoğunluğunun 4. koloniye ait olduğunun görülmesi, GFP gen kopya sayısının en fazla 4. kolonide olduğunu düşündürdü.

Son olarak, GFP üretimi için tercih edilen üç farklı maya kolonisi, YPD sıvı besiyerinde 120 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından maya hücrelerine ait floresanlar, standart GFP ayarlarıyla konfokal mikroskopta görüntülendi (Papakonstantinou and Harris 2016). Benzer şekilde, Zupan *et al.* (2004), yaptıkları çalışmada denizanası GFP genini *P. pastoris* X-33 genomuna entegre etmiş ve maya hücrelerinde bu proteinin ekspresyonunu gerçekleştirmiştir. *P. pastoris*'te GFP'nin farklı organelleri hedef aldığı ve konfokal mikroskopta maya hücreleri içerisinde floresan lekeler olarak gözlendiği bildirilmiştir. *P. pastoris* ekspresyon sisteminde ifade edilen protein miktarı ile transgen kopya sayısı arasındaki ilişki, rekombinant çoklu gen kopya sayısı hakkında bilgi vermektedir (Athmaram *et al.* 2012). Buna göre, konfokal mikroskop görüntüleri incelendiğinde, floresan özellik gösteren GFP ışımalarının en fazla 4. kolonide olduğu gözlendi. Bu sonucun, 4. kolonide diğer kolonilere kıyasla gen kopya sayısının ve dolayısıyla da rekombinant GFP ifadesinin daha fazla olduğunun göstergesi olduğu söylenebilir. Diğer yandan, konfokal mikroskop ile görüntüleme sonuçlarının gDNA'lar ile gerçekleştirilen PCR reaksiyon sonuçlarını desteklediği görüldü.

Sonuç ve Öneriler

1. Bu tez çalışmasında rekombinant protein üretiminde sıklıkla kullanılan *P. pastoris* mayasına manyetik nanopartikül aracılığıyla gen aktarımı, ilk defa ve başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.
2. Oda sıcaklığında birlikte çöktürme yöntemiyle yaklaşık 20 nm boyutunda polietilenimin kaplı manyetik nanopartiküller ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$) elde edilmiştir.
3. Daha fazla DNA yükleme kapasitesine sahip olan asitlenmiş nanopartiküller ($\text{aFe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$) hazırlanmış, SEM, TEM, XRD, FTIR, VSM ve Zetasizer analizleri ile karakterizasyonu yapılan partiküllerin gen aktarımında aracı olarak kullanılmaya uygun olduğu belirlenmiştir.
4. Hazırlanan gen taşıyıcı platformun maya morfolojisi, canlılığı ve çoğalması üzerinde toksik veya olumsuz etkisi gözlenmemiştir.
5. Yapılan optimizasyon deneyleri sonucunda manyetofektin hazırlamada kullanılması gereken optimum şartlar; 7,5 μg MNP ve N/P 4 oranında ekstra PEI kullanılarak DNA bağlanma ve PEI inkübasyon süreleri 30'ar dakika olarak belirlenmiştir.
6. Maya hücrelerinin transformasyonu için hücrelerin kompetent hale getirilmesine gerek duyulmamıştır.
7. Transformasyon işlemi kısa sürede gerçekleştirilmiştir.
8. Hedef DNA'yı maya genomuna taşımada ekstra taşıyıcı bir DNA'ya ihtiyaç duyulmamıştır.
9. Az miktarda plazmit DNA (1 μg) kullanılarak gen aktarımı gerçekleştirilmiş ve plazmitin maya genomuna entegrasyonu sağlanmıştır.
10. Maya genomuna gen entegrasyonunun başarısı, hücre içinde GFP üreten maya hücrelerine ait floresan lekelerin konfokal mikroskopta görüntülenmesiyle ortaya koyulmuştur.
11. Maya genomuna çoklu gen aktarımının mümkün olduğu görülmüştür.
12. Yöntemin *P. pastoris* hücrelerine gen aktarımında kolay bir şekilde uygulanabilir olmasının yanı sıra maliyetinin düşük olduğu söylenebilir.
13. *P. pastoris* mayasına gen aktarımı için geliştirilen bu yeni yöntem, sadece bu mayaya değil, rekombinant protein üretiminde kullanılan *Saccharomyces cerevisiae*,

Hansenula polymorpha, *Kluyveromyces lactis* ve *Yarrowia lipolytica* gibi diğ er mayalara gen aktarımında da kullanılabilir.



KAYNAKLAR

- Abdelmoula-Souissi, S., Rekik, L., Gargouri, A. and Mokdad-Gargouri, R., 2007. High-level expression of human tumour suppressor P53 in the methylotrophic yeast: *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 54 (2), 283–288.
- Akinc, A., Thomas, M., Klivanov, A. M. and Langer, R., 2005. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *Journal of Gene Medicine*, 7 (5), 657–663.
- Al-Deen, F. N., Ho, J., Selomulya, C., Ma, C. and Coppel, R., 2011. Superparamagnetic nanoparticles for effective delivery of malaria DNA vaccine. *Langmuir*, 27(7), 3703–12.
- Al-Hawash, A. B., Zhang, X. and Ma, F., 2017. Strategies of codon optimization for high-level heterologous protein expression in microbial expression systems. *Gene Reports*, 9 (August), 46–53.
- Altıntaş, L., Enver, H. and Tutun, H., 2017. Veteriner İlaç Alanında Rekombinant DNA Teknolojisinin Kullanımı. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5 (2), 192–203.
- Anonim, Beşergil, B., 2019. http://bilsenbesergil.blogspot.com/p/nano-nanometre-nanoskala-nano-nanometer_11.html, Erişim tarihi: 28.12.2019)
- Aravindan, L., Bicknell, K. A., Brooks, G., Khutoryanskiy, V. V and Williams, A. C., 2009. Effect of acyl chain length on transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine. *International Journal of Pharmaceutics*, 378, 201–210.
- Armaleo, D., Ye, G. N., Klein, T. M., Shark, K. B., Sanford, J. C. and Johnston, S. A., 1990. Biolistic Nuclear Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and Other Fungi. *Current Genetics*, 17 (2), 97–103.
- Arsianti, M., Lim, M., Marquis, C. P. and Amal, R., 2010a. Assembly of Polyethylenimine-Based Magnetic Iron Oxide Vectors : Insights into Gene Delivery. *American Chemical Society*, 26 (6), 7314–7326.
- Arsianti, M., Lim, M., Marquis, C. P. and Amal, R., 2010b. Polyethylenimine Based Magnetic Iron-Oxide Vector: The Effect of Vector Component Assembly on Cellular Entry Mechanism, Intracellular Localization, and Cellular Viability. *Biomacromolecules*, 11, 2521–2531.
- Arslan, K. and Akyüz, B., 2009. Gen Transfer Teknolojileri. *Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi Derleme J Fac Vet Med Univ Erciyes*, 6 (61), 77–82.
- Athmaram, T. N., Saraswat, S., Singh, A. K., Rao, M. K., Gopalan, N., Suryanarayana, V. V. S. and Rao, P. V. L., 2012. Influence of copy number on the expression levels of pandemic influenza hemagglutinin recombinant protein in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Virus Genes*, 45 (3), 440–451.
- Barcellos, F. G., Fungaro, M. H. P., Furlaneto, M. C., Lejeune, B., Pizzirani-Kleiner, A. A. and Lúcio de Azevedo, J., 1998. Genetic analysis of *Aspergillus nidulans* unstable transformants obtained by the biolistic process. *Canadian Journal of Microbiology*, 44 (12), 1137–1141.

- Bazan-Peregrino, M., Sainson, R. C. A., Carlisle, R. C., Thoma, C., Waters, R. A., Arvanitis, C., Harris, A. L., Hernandez-Alcoceba, R. and Seymour, L. W., 2013. Combining virotherapy and angiotherapy for the treatment of breast cancer. *Cancer Gene Therapy*, 20 (8), 461–468.
- Benjaminsen, R. V, Matthebjerg, M. A., Henriksen, J. R., Moghimi, S. M. and Andresen, T. L., 2013. The Possible “Proton Sponge ” Effect of Polyethylenimine (PEI) Does Not Include Change in Lysosomal pH. *Molecular Therapy*, 21 (1), 149–157.
- Birch, J. R. and Racher, A. J., 2006. Antibody production. *Adv. Drug Deliver Rev.*, 58, 671–685.
- Blount, B. A., Weenink, T., Vasylechko, S. and Ellis, T., 2012. Rational Diversification of a Promoter Providing Fine- Tuned Expression and Orthogonal Regulation for Synthetic Biology. *PLoS ONE*, 7 (3), 1–11.
- Boder, E. T. and Wittrup, K. D., 1997. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nature Biotechnology*, 15, 553–557.
- Brien, J. A. O. and Lummis, S. C. R., 2009. Biolistic transfection of neuronal cultures using a hand-held gene gun. *Nat Protoc.*, 1 (2), 977–981.
- Büyüksungur, A., 2006. Cloning and Expression of Benzaldehyde Lyase Gene From *Pseudomonas fluorescens* Biovar I in *Pichia pastoris*. Master thesis, Middle East Technical University, The Graduate School of Natural and Applied Sciences, Ankara.
- Buzea, C., Pacheco, I. I. and Robbie, K., 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2 (4), MR17–MR71.
- Chaki, S. H., Malek, T. J., Chaudhary, M. D., Tailor, J. P. and Deshpande, M. P., 2015. Magnetite Fe₃O₄ nanoparticles synthesis by wet chemical reduction and their characterization. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 6 (3), 035009 (6pp).
- Chanda, A. and Mohanta, D., 2016. Nanotechnology- A Potent Pharmacological Tool. *International Journal of Research in Advent Technology*, 4 (3), 6–16.
- Chappel, M. and. , 2014. A critical analysis of codon optimization in human therapeutics. *Trends Mol Med.*, 20 (11), 604–613.
- Chen, X., Zhai, C., Kang, L., Li, C., Yan, H., Zhou, Y., Yu, X. and Ma, L., 2012. High-level expression and characterization of a highly thermostable chitosanase from *Aspergillus fumigatus* in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 34 (4), 689–694.
- Chen, Z., He, Y., Shi, B. and Yang, D., 2013. Human serum albumin from recombinant DNA technology: Challenges and strategies. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1830 (12), 5515–5525.
- Costanzo, M. C. and Fox, T. D., 1988. Transformation of yeast by agitation with glass beads. *Genetics*, 120 (3), 667–670.
- Cregg, J. M., Barringer, K. J., Hessler, A. Y. and Madden, K. R., 1985. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology*, 5 (12), 3376–3385.
- Cregg, J. M., Tolstorukov, I., Kusari, A., Sunga, A. J., Madden, K. and Chappell, T., 2010. Expression of recombinant genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*, 4 (1), 13.2.1-13.2.14.
- Cui, L., Lin, H., Yang, C., Han, X., Zhang, T. and Qu, F., 2014. Synthesis of Multifunctional Fe₃O₄@mSiO₂@Au Core-Shell Nanocomposites for pH-Responsive Drug Delivery. *Eur. J. Inorg. Chem*, 2014 (36), 6156–6164.

- Curran, K. A., Crook, N. C., Karim, A. S., Gupta, A., Wagman, A. M. and Alper, H. S., 2014. Design of synthetic yeast promoters via tuning of nucleosome architecture. *Nature Communications*, 5:4002.
- Dalton, A. C. and Barton, W. A., 2014. Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein Science*, 23 (5), 517–525.
- De Backer, M. D., Maes, D., Vandoninck, S., Logghe, M., Contreras, R. and Luyten, W. H., 1999. Transformation of *Candida albicans* by electroporation. *Yeast* (Chichester, England), 15 (15), 1609–1618.
- Delorme, E., 1989. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (9), 2242–2246.
- Dobson, J., 2006. Gene therapy progress and prospects : magnetic nanoparticle-based gene delivery. *Gene Ther.*, 13 (4), 283–287.
- El-sayed, A., Futaki, S. and Harashima, H., 2009. Delivery of Macromolecules Using Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides: Ways to Overcome Endosomal Entrapment, 11 (1).
- Erdogan, A., 2018. Kanser Tanı ve Tedavisinde Manyetik Nanopartiküller. *Magnetic Nanoparticles In The Diagnosis And Treatment Of Cancer*, I (1), 23–30.
- Fickers, P., 2014. *Pichia pastoris*: a workhorse for recombinant protein production. *Curr Res Microbiol Biotechnol*, 354–363.
- Galambos, L. and Sturchio, J. L., 1998. Pharmaceutical Firms and the Transition to Biotechnology: A Study in Strategic Innovation. *Business History Review*.
- Garnick, R. L., Solli, N. J. and Papa, P. A., 1988. The Role of Quality Control in Biotechnology: An Analytical Perspective. *Analytical Chemistry*.
- Gietz, R. D. and Woods, R. A., 2001. Genetic transformation of yeast. *BioTechniques*, 30 (4), 816–831.
- Gietz, R. Daniel and Woods, R. A., 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*, 350 (2001), 87–96.
- Gnanaprakash, G., Philip, J. and Raj, B., 2007. Effect of divalent metal hydroxide solubility product on the size of ferrite nanoparticles. *Materials Letters*, 61 (23–24), 4545–4548.
- Gouka, R. J., Gerk, C., Hooykaas, P. J., Bundock, P., Musters, W., Verrips, C. T. and de Groot, M. J., 1999. Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination. *Nature Biotechnology*, 17 (June), 598–601.
- Griffith, F., 1928. The significance of pneumococcal types. *A Medical Officer of the Ministry of Health*, XXVII (2).
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, et al., 2000. Recombinant DNA Technology in Eukaryotes. In W. H. Freeman (Ed.), *An Introduction to Genetic Analysis* (7th editio). New York.
- Guerra, O. G., Rubio, I. G. S., da Silva Filho, C. G., Bertoni, R. A., dos Santos Govea, R. C. and Vicente, E. J., 2006. A novel system of genetic transformation allows multiple integrations of a desired gene in *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes. *Journal of Microbiological Methods*, 67 (3), 437–445.
- Gupta, S. K. and Shukla, P., 2017. Sophisticated cloning, fermentation, and purification technologies for an enhanced therapeutic protein production: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 8 (JUL), 1–17.

- Han, R., Yi, H., Shi, J., Liu, Z., Wang, H., Hou, Y. and Wang, Y., 2016. pH-Responsive drug release and NIR-triggered singlet oxygen generation based on a multifunctional core-shell-shell structure. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18 (36), 25497–25503.
- Hashimoto, H., Morikawa, H., Yamada, Y. and Kimura, A., 1985. A novel method for transformation of intact yeast cells by electroinjection of plasmid DNA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 21 (5), 336–339.
- Hashimoto, H., Morikawa, H., Yamada, Y. and Kimura, A., 1985. Rapid communication A novel method for transformation of intact yeast cells by electroinjection of plasmid DNA. *Microbiol. Biotechnol.*, (21), 336–339.
- Hashimoto, M., Hisano, Y. Directional gene-transfer into the brain by an adenoviral vector tagged with magnetic nanoparticles. *J. Neurosci. Methods* 2011, 194, 316–320.
- Higgins, D. R. and Cregg, J. M., 1998. Introduction to *Pichia pastoris*. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) (Vol. 103).
- Hinnen, A., Hicks, J. B. and Fink, G. R., 1978. Transformation of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75 (4), 1929–1933.
- Holmes RK., 1996. *Medical Microbiology*. 4th edition. University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Hoskins, C., Cuschieri, A. and Wang, L., 2012. The cytotoxicity of polycationic iron oxide nanoparticles: Common endpoint assays and alternative approaches for improved understanding of cellular response mechanism, 1–11.
- Hoskins, C., Wang, L., Cheng, W. P. and Cuschieri, A., 2012. Dilemmas in the reliable estimation of the in-vitro cell viability in magnetic nanoparticle engineering: which tests and what protocols? *Nanoscale Research Letters*, 7:77.
- Hu, H., Dai, S., Wen, A. and Bai, X., 2019. Efficient Expression of Xylanase by Codon Optimization and Its Effects on the Growth. *College of Animal Science*, 9, 65.
- Huang, Y., Hu, W., Rustandi, E., Chang, K., Yusuf-makagiansar, H. and Ryll, T., 2010. Maximizing Productivity of CHO Cell-Based Fed-Batch Culture Using Chemically Defined Media Conditions and Typical Manufacturing Equipment. *Biotechnol. Progr.*, 26, 1400–1410.
- Hudayberdiyev ve Öner., 1997. Rekombinant DNA Teknolojisi ile Üretilen Peptid-Protein İlaçlar. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 22, 27–38.
- Hughes, S. S., 2001. Making dollars out of DNA. The first major patent in biotechnology and the commercialization of molecular biology. *International Review Devoted to the History of Science and Its Cultural Influences*, 1974-1980
- Idiris, A., Tohda, H. and Kumagai, H., 2010. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 403–417.
- Ikeda, S. R., Lovinger, D. M., McCool, B. A. and Lewis, D. L., 1995. Heterologous Expression of Metabotropic Glutamate Receptors in Adult Rat Sympathetic Neurons : Subtype-Specific Coupling to Ion Channels. *Neuron*, 14, 1029–1038.
- Inoue, Takayoshi; Krumlauf, R., 2001. An impulse to the brain using in vivo electroporation. *Nature Neuroscience*, 4 (november), 1156–1158.
- Invitrogen., 2010. pGAPZ A, B, and C pGAPZα A, B, and C *Pichia* expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins. *Invitrogen Manual*, (25), 25–0174.

- Islam, M. S., Choi, W. S. and Lee, H., 2014. Controlled Etching of Internal and External Structures of SiO₂ Nanoparticles Using Hydrogen Bond of Polyelectrolytes. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6, 9563–9571.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A., 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology*, 153 (1), 163–168.
- Jackson, D., Symons, R. and Berg, P., 1972. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69, 2904–2909.
- Jana, S. and Deb, J. K., 2005. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, 289–298.
- Jia, H., Fan, G., Yan, Q., Liu, Y., Yan, Y. and Jiang, Z., 2012. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic High-level expression of a hyperthermostable *Thermotoga maritima* xylanase in *Pichia pastoris* by codon optimization. “Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic,” 78 (17), 72–77.
- Jiang, W., Wu, J., Tian, R. and Jiang, W., 2017. Synthesis and characterization of magnetic mesoporous core-shell nanocomposites for targeted drug delivery applications. *Journal of Porous Materials*, 24 (1), 257–265.
- Jin, R., Lin, B., Li, D. and Ai, H., 2014. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MR imaging and therapy: design considerations and clinical applications. *Current Opinion in Pharmacology*, 18, 18–27.
- Johnston, S. A., Anziano, P. Q., Shark, K., Sanford, J. C. and Butow, R. A., 1988. Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. *Science*, 240 (4858), 1538–1541.
- Juturu, V. and Wu, J. C., 2018. Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. *ChemBioChem*, 19 (1), 7–21.
- Kain, S. R., Adams, M., Kondepudi, A., Yang, T. T., Ward, W. W. and Kitts, P., 1995. Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. *BioTechniques*, 19(4), 650–5.
- Kaishima, M., Ishii, J., Matsuno, T., Fukuda, N. and Kondo, A., 2016. Expression of varied GFPs in *Saccharomyces cerevisiae*: Codon optimization yields stronger than expected expression and fluorescence intensity. *Scientific Reports*, 6 (November 2015), 1–15.
- Kami, D., Takeda, S., Itakura, Y., Gojo, S., Watanabe, M. and Toyoda, M., 2011. Application of magnetic nanoparticles to gene delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 12 (6), 3705–3722.
- Karaoğlu, M., 2012. *Pichia pastoris* Alkol Oksidaz (AOX1 ve AOX2) Genlerinin İnaktif Edilmesi ve Elde Edilen Suşun Rekombinant Protein Üretiminde Kullanılması. Yüksek Lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- Karube, I., Tamiya, E. and Matsuoka, H., 1985. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* spheroplasts by high electric pulse. *FEBS Lett.*, 182 (1), 90–94.
- Kawai, S., Hashimoto, W. and Murata, K., 2010. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: Methods and possible underlying mechanism. *Bioengineered Bugs*, 1 (6), 395–403.

- Kaymak, E., 2008. *Arabidopsis Thaliana* Lipases: Cloning and Expression in *Pichia pastoris*. Master thesis, Sabancı University, The Graduate School Of Engineering and Natural Sciences, Istanbul.
- Khan, S., Ullah, M. W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M. and Hou, H., 2016. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *International Journal of Genomics*, 2016, 14.
- Kim, T. K. and Eberwine, J. H., 2010. Mammalian cell transfection : the present and the future. *Anal Bioanal Chem*, 397 (8), 3173–3178.
- Kurtzman, C. P., 2009. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene, 1435–1438.
- Kwolek-Mirek, M. and Zadrag-Tecza, R., 2014. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Research*, 14 (7), 1068–1079.
- Lenassi Zupan, A., Trobec, S., Gaberc-Porekar, V. and Menart, V., 2004. High expression of green fluorescent protein in *Pichia pastoris* leads to formation of fluorescent particles. *Journal of Biotechnology*, 109 (1–2), 115–122.
- Li, H., Li, N., Gao, X., Kong, X., Li, S., Xu, A., Jin, S. and Wu, D., 2011. High level expression of active recombinant human interleukin-3 in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 80 (2), 185–193.
- Lim, J., Thompson, J., May, R. C., Hotchin, N. A. and Caron, E., 2013. Regulator of G-Protein Signalling-14 (RGS14) Regulates the Activation of $\alpha M\beta 2$ Integrin during Phagocytosis. *PLoS ONE*, 8 (6), 5–9.
- Lo, C., Desjouy, C., Chen, S., Lee, J., Inserra, C., Béra, J., Chen, W., Claude, U., Lyon, B. and Thomas, C. A. , 2014. Ultrasonics Sonochemistry Stabilizing in vitro ultrasound-mediated gene transfection by regulating cavitation. *Ultrasonics-Sonochemistry*, 21 (2), 833–839.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al., 2000. *Molecular Cell Biology* 5th Ed. W.H. Freeman.
- Lu, Y., Fang, C., Wang, Q., Zhou, Y., Zhang, G. and Ma, Y., 2016. High-level expression of improved thermo-stable alkaline xylanase variant in *Pichia pastoris* through codon optimization, multiple gene insertion and high-density fermentation. *Scientific Reports*, 6 (May), 1–10.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., Mcneil, B. and Harvey, L. M., 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system, 249–270.
- Mamat, U., Wilke, K., Bramhill, D., Schromm, A. B., Lindner, B., Kohl, T. A., Corchero, J. L., Villaverde, A., Schaffer, L., Head, S. R., Souvignier, C., Meredith, T. C. and Woodard, R. W., 2015. Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins. *Microbial Cell Factories*.
- Mehier-humbert, S. and Guy, R. H., 2005. Physical methods for gene transfer : Improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv. Drug Del Rev*, 57, 733–753.
- Mendonça Bahia, F., Souza Carmo, T., Vieira Gomes, A., Silva Carvalho, L. and Parachin, N., 2018. Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production. *Microorganisms*, 6 (2), 38.
- Miller, J. F., Dowert, W. J. and Tompkins, L. S., 1988. High-voltage electroporation of bacteria: Genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85 (February), 856–860.

- Mirek, K. M. and Tecza, Z. R., 2014. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells, 14 (August), 1068–1079.
- Mykhaylyk, O., Antequera, Y. S., Vlaskou, D. and Plank, C., 2007. Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection in vitro. *Nature Protocols*, 2 (10), 2391–2411.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M. and Y. Wang, and P. H. H., 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.*, 1, 841–845.
- Noval, V. E. and Carriazo, J. G., 2019. Fe₃O₄-TiO₂ and Fe₃O₄-SiO₂ Core-shell Powders Synthesized from Industrially Processed Magnetite (Fe₃O₄) Microparticles. *Materials Research*, 22 (3).
- Okazaki, K., Okazaki, N., Kume, K., Jinno, S., Tanaka, K. and Okayama, H., 1990. High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Research*, 18 (22), 6485–6489.
- Papakonstantinou, T., Harris, S. and Hearn, M. T. W., 2009. Mass spectrometric analysis of the secretome of, (26), 311–321.
- Pardee, A. B., 1959. The genetic control and cytoplasmic expression of “Inducibility” in the synthesis of β -galactosidase by *E. coli*. *Journal of Molecular Biology*.
- Pfeifer, A. and Verma, I. M., 2001. GENE THERAPY: Promises and Problems. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 177–211.
- Pickard, M. R., Olariu, C. I., Williams, S. R., Chari, D. M. and Rosseinsky, M. J., 2012. Fe₃O₄-PEI-RITC Magnetic Nanoparticles with Imaging and Gene Transfer Capability: Development of a Tool for Neural Cell Transplantation Therapies dynamic Light Scattering, 1328–1343.
- Plank, C., Zelphati, O. and Mykhaylyk, O., 2011. Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection Progress and prospects. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63 (14–15), 1300–1331.
- Potter, H., 1993. Application of electroporation in recombinant DNA technology, 217, 461–478.
- Potter, Huntington, Weir, L. and Leder, P., 1984. Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81 (November), 7161–7165.
- Pray, L., 2008. Recombinant DNA Technology and Transgenic Animals, *Nature Education*, 1(1):51.
- Razzell, W. E. and Khorana, H. G., 1958. Purification and properties of a pyrimidine deoxyriboside phosphorylase from *Escherichia coli*. *BBA-Biochimica et Biophysica Acta*, 562-566.
- Rech, E.L., M.J. Dobson, M.R. Davey, and B. J. M., 1989. Introduction of a yeast artificial chromosome vector into *Saccharomyces cerevisiae* cells by electroporation. *Nucleic Acids Res.*, 18 (5), 1313.
- Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S. and Hoekstra, D., 2004. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical Journal*, 377 (1), 159–169.
- Rosenfeld, S., 1999. Use of *Pichia pastoris* for expression of recombinant proteins, *Methods in Enzymology*, 306, 154-169.
- Russell, J. M. C. and K. A., 1998. Transformation. General Characteristics of the Methods. *Methods in Molecular Biology*, 103.

- Sambrook, J, Fritsch, E. F. and Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook J. and Russell D.W., 2001. Agarose Gel Electrophoresis, in Molecular Cloning, 3rd ed., Ed: J. Sambrook and D.W. Russell. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sánchez, O. and Aguirre, J., 1996. Efficient Transformation of *Aspergillus nidulans* by Electroporation of Germinated Conidia. Fungal Genetics Newsletter, 43, 48–51.
- Sarramegna, V., Talmont, F., Seree de Roch, M., Milon, A. and Demange, P., 2002. Green fluorescent protein as a reporter of human μ -opioid receptor overexpression and localization in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. J. Biotechnol. 99, 23–39.
- Schermant, D., Demeneix, B. and Behr, J., 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine, 92 (August), 7297–7301.
- Scholz, O., Thiel, A., Hillen, W. and Niederweis, M., 2000. Quantitative analysis of gene expression with an improved green fluorescent protein. European Journal of Biochemistry, 267 (6), 1565–1570.
- Schillinger, U., Brill, T., Rudolph, C., Huth, S., Kro, F., Hirschberger, J., Bergemann, C. and Plank, C., 2005. Advances in magnetofection magnetically guided nucleic acid delivery. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 293, 501–508.
- Schlorf, T., Meincke, M., Kossel, E., Glüer, C. and Jansen, O., 2011. Biological Properties of Iron Oxide Nanoparticles for Cellular and Molecular Magnetic Resonance Imaging. Int. J. Mol. Sci., (12), 12–23.
- Schmotzer, C. A., Butler, S. P., Velandar, W. H. and Gwazdauskas, F. C., 2003. Development of Murine Embryos Following Electroporation. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 20 (4), 148–152.
- Schneckenburger, H., Strauss, W. S. L. and Schmitt, M., 2002. Laser-assisted optoporation of single cells. J Biomed Opt, 7 (3), 410–416.
- Semiz, E., 2008. Manyetik Yüklü Polimerik Nanopartikül Esaslı Plazmid Dna Safılaştırma Kitlerinin Geliştirilmesi. Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.
- Sharma, R., Katoch, M., Srivastava, P. S. and Qazi, G. N., 2009. Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25 (12), 2083–2094.
- Shrivastava, S., Shukla, P., Deepalakshmi, P. D. and Mukhopadhyay, K., 2013. Characterization, cloning and functional expression of novel xylanase from *Thermomyces lanuginosus* SS-8 isolated from self-heating plant wreckage material. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 29(12):2407-15.
- Smolders, S., Kessels, S., Smolders, S. M. T., Poulhes, F., Zelphati, O., Sapet, C. and Brône, B., 2018. Magnetofection is superior to other chemical transfection methods in a microglial cell line. Journal of Neuroscience Methods, 293, 169–173.
- Soydemir ve Aksoy., 2017. Rekombinant DNA Teknolojisi ve Günümüzdeki Kullanımı, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, Güncel gastroenteroloji 21/1, (7), 14–17.
- Steinberg, F. M. and Raso, J., 1998. Biotech pharmaceuticals and biotherapy: an overview. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences : A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques, 1(2):48-59.

- Steitz, B., Hofmann, H., Kamau, S. W., Hassa, P. O., Hottiger, M. O., von Rechenberg, B., Hofmann-Amttenbrink, M. and Petri-Fink, A., 2007. Characterization of PEI-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for transfection: Size distribution, colloidal properties and DNA interaction. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 311 (1 SPEC. ISS.), 300–305.
- Suga, M. and Hatakeyama, T., 2003. High-efficiency electroporation by freezing intact yeast cells with addition of calcium. *Current Genetics*, 43 (3), 206–11.
- Sun, M., Yu, Q., Hu, M., Hao, Z., Zhang, C. and Li, M., 2014. Lead sulfide nanoparticles increase cell wall chitin content and induce apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Hazardous Materials*, 273, 7–16.
- Sun, S., Hao Zeng, D. B. R., Raoux, S., Rice, P. M., Wang, S. X. and Li, G., 2004. Monodisperse MFe_2O_4 (M=Mn, Fe, Co, Ni and Zn) Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 273–279.
- Papakonstantinou, T., Harris, S. J. and Hearn, M., 2009. Expression of GFP using *Pichia pastoris* vectors with zeocin or G-418 sulphate as the primary selectable marker. *Yeast*, 26; 311–321.
- Tang, H., Bao, X., Shen, Y., Song, M., Wang, S., Wang, C. and Hou, J., 2015. Engineering protein folding and translocation improves heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(9):1872–82.
- Thompson, J. R., Register, E., Curotto, J., Kurtz, M. and Kelly, R., 1998. An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation. *Yeast*, 14 (6), 565–571.
- Tu, Y., Wang, G., Wang, Y., Chen, W., Zhang, L., Liu, Y., Jiang, C., Wang, S., Bu, Z. and Cai, X., 2016. Extracellular expression and antiviral activity of a bovine interferon-alpha through codon optimization in *Pichia pastoris*. *Microbiological Research*, 191, 12–18.
- Tyo, K. E. J., Liu, Z., Magnusson, Y., Petranovic, D. and Nielsen, J., 2014. Impact of protein uptake and degradation on recombinant protein secretion in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 16, 7149–7159.
- Ünver, Y., 2014. İnsan Paraoksonaz 1 (pon1) geninin klonlanması, *Pichia pastoris*'te ekspresyonu, rekombinant enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri enstitüsü, Erzurum, Türkiye.
- Ünver, Y., Kurbanoglu, E. B. and Erdogan, O., 2015. Expression, purification, and characterization of recombinant human paraoxonase 1 (rhPON1) in *Pichia pastoris*. *Turkish Journal of Biology*, 39: 649–655.
- Ünver, Y., Yildiz, M., Kilic, D., Taskin, M., Firat, A., and Askin, H., 2018. Efficient expression of recombinant human telomerase inhibitor 1 (hPinX1) in *Pichia pastoris*. *Prep Biochem Biotechnol.*, 48(6), 535–540.
- Varkouhi, A. K., Scholte, M., Storm, G. and Haisma, H. J., 2011. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *Journal of Controlled Release*, 151, 220–228.
- Wall, R., 1996. Transgenic livestock: progress and prospects for the future. *Theriogenology*, 45, 57–68.
- Wang, J., Li, Y., Liu, D., Liu, J., Li, P., Chen, L. and Xu, S., 2014. Codon Optimization Significantly Improves the Expression Level of α -Amylase Gene from *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris*, 2015.

- Wang, W., Li, W., Ou, L., Flick, E., Mark, P., Nesselmann, C., Lux, C. A., Gatzert, H. H., Kaminski, A., Liebold, A., Lützow, K., Lendlein, A., Li, R. K., Steinhoff, G. and Ma, N., 2011. Polyethylenimine-mediated gene delivery into human bone marrow mesenchymal stem cells from patients. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15 (9), 1989–1998.
- Wang, X., Zhou, L. and Gu, H., 2009. Charged Magnetic Nanoparticles for Enhancing Gene Transfection, *IEEE Transactions on Nanotechnology*, 8 (2), 142–147.
- Wang, X., Zhou, L., Ma, Y., Li, X. and Gu, H., 2009. Control of Aggregate Size of Polyethyleneimine-Coated Magnetic Nanoparticles for Magnetofection, *Nano Research*, 2, 365–372.
- Washbourne, P. and Mcallister, A. K., 2002. Techniques for gene transfer into neurons. *Curr Opin Neurobiol*, 12(5), 566–573.
- Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. V and Cregg, J. M., 1997. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter, *Gene*, 186, 37–44.
- Woods, N., Muessig, A., Schmidt, M., Flygare, J., Olsson, K., Salmon, P., Trono, D., Kalle, C. Von and Karlsson, S., 2003. Lentiviral vector transduction of NOD / SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell : risk of insertional mutagenesis. *Blood*, 101 (4), 1284–1289.
- Wu, S. and Letchworth, G. J. , 2004. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *BioTechniques*, 36 (1), 152–154.
- Xu, N., Cai, M., Zhang, Y., Zhu, J., Jiang, T., Zhou, M., Xing, Y. and Zhu, Q., 2017. Identification and characterization of novel promoters for recombinant protein production in yeast *Pichia pastoris* . *Yeast*, 35 (5), 379–385.
- Yang, J., Nie, L., Chen, B., Liu, Y., Kong, Y., Wang, H. and Diao, L., 2014. Hygromycin-resistance vectors for gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast*, 31 (4), 115–125.
- Yang, M., Johnson, S. C. and Murthy, P. P. N., 2012. Enhancement of alkaline phytase production in *Pichia pastoris* : Influence of gene dosage , sequence optimization and expression temperature. *Protein Expression And Purification*, 84 (2), 247–254.
- Yang, Z. and Zhang, Z., 2018. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris* : A review. *Biotechnology Advances*, 36 (1), 182–195.
- Yin, P. T., Shah, S., Pasquale, N. J., Garbuzenko, O. B., Minko, T. and Lee, K., 2016. Stem cell-based gene therapy activated using magnetic hyperthermia to enhance the treatment of cancer. *Biomaterials*, 81, 46–57.
- Yoshiyuki, H., Yasuki, F., Shigeyuki, K., Wataru, H. and Kousaku, M., 2002. Extremely simple, rapid, and highly efficient transformation method for the yeast *Saccharomyces cerevisiae* using glutathione and early log phase cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94 (2), 166–171.
- Zhang, Lei, Li, Y., Yu, J. C., Chen, Y. Y. and Chan, K. M., 2014. Assembly of polyethylenimine-functionalized iron oxide nanoparticles as agents for DNA transfection with magnetofection technique. *Journal of Materials Chemistry B*, 2 (45), 7936–7944.

- Zhang, Ling, Tian, B., Li, Y., Lei, T., Meng, J., Yang, L., Zhang, Y., Chen, F., Zhang, H., Xu, H., Zhang, Y. and Tang, X., 2015. A Copper-Mediated Disulfiram-Loaded pH-Triggered PEG-Shedding TAT Peptide-Modified Lipid Nanocapsules for Use in Tumor Therapy. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7 (45), 25147–25161.
- Zhang, X., Fan, W., Ma, H., Chen, L., Zhou, S., Han, X., Ruan, Y., Guan, S., Liu, H., Li, H., Duan, Z. and Lin, J., 2018. Molecular cloning, codon-optimized gene expression, and bioactivity assessment of two novel fungal immunomodulatory proteins from *Ganoderma applanatum* in *Pichia*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102 (13), 5483–5494.
- Zhao, X., Meng, Z., Wang, Y., Chen, W., Sun, C., Cui, B., Cui, J., Yu, M., Zeng, Z., Guo, S., Luo, D., Cheng, J. Q., Zhang, R. and Cui, H., 2017. Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers. *Nature Plants*, 3 (12), 956–964.
- Zhou, W. J., Yang, J. K., Mao, L. and Miao, L. H., 2015. Codon optimization, promoter and expression system selection that achieved high-level production of *Yarrowia lipolytica* lipase in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 71, 66–72.

ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında Erzurum’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2012 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nden 2016 yılında mezun oldu. 2016 yılında Atatürk Üniversitesi Yabancı Diller Yüksekokulu’nda Yüksek Lisans İngilizce Hazırlık öğrenimini tamamladıktan sonra 2017 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gen Mühendisliği Bilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Aynı zamanda Atatürk Üniversitesi Edebiyat Fakültesi İngiliz Dili ve Edebiyatı Bölümü öğrencisidir.