



***Pichia pastoris*'te KENDİNDEN
İNDÜKLENEBİLİR BİR HETEROLOG PROTEİN
EKSPRESYON SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Betül ARI

**Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER
Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
Gen Mühendisliği Bilim Dalı**

2021

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANA BİLİM DALI
GEN MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI

***Pichia pastoris*'te KENDİNDEN İNDÜKLENEBİLİR BİR HETEROLOG PROTEİN
EKSPRESYON SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

(Improvement of a Self-Inducible Heterologous Protein Expression System in *Pichia pastoris*)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Betül ARI

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER

Erzurum
Ağustos, 2021

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Betül ARI tarafından hazırlanan “Pichia Pastoris'te Kendinden İndüklenebilir Bir Heterolog Protein Ekspresyon Sisteminin Geliştirilmesi” başlıklı çalışması 12/08/ 2021 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Gen Mühendisliği Bilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Harun BUDAK
Atatürk Üniversitesi

Aslı Islak İmzalıdır

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER
Atatürk Üniversitesi

Aslı Islak İmzalıdır

Jüri Üyesi: Doç. Dr. Ebru AKKEMİK
Siirt Üniversitesi

Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim Kurulunun
.../.../.... tarih ve sayılı
kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

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.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER danışmanlığında sunulan “Pichia pastoris'te Kendinden İndüklenebilir Bir Heterolog Protein Ekspresyon Sisteminin Geliştirilmesi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	3	30
Kuramsal Temeller	1	30
Materyal ve Yöntem	11	35
Bulgular	3	20
Tartışma	7	20
Tezin Geneli	7	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Betül ARI	Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER
17.8.2021	17.8.2021
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DAYTAM) yapılmıştır.

DAYTAM Müdürü Sayın Prof. Dr. Hamdullah KILIÇ ve Müdür Yardımcısı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nihal ŞİMŞEK ÖZEK olmak üzere çok değerli DAYTAM ailesine, tez çalışmamı yürütürken sağlamış oldukları imkân ve gösterdikleri samimi ilgi için teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sürecinde her türlü bilimsel yönlendirmeleri ile yardım ve destekte bulunan, ilgisi ve sabrıyla her alanda yanımda hissettiğim, bilgi ve tecrübelerinden her daim faydalandığım kıymetli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü imkânı sağlayan Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e ve Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca desteğini hissettiğim, ilk laboratuvar tecrübesini beraber edindiğim çok kıymetli dostum Sayın Saadet KALAKENGER'e ve çalışmalarım boyunca beni yalnız bırakmayan çok değerli arkadaşlarım Sayın Emine KARACA'ya, Sayın Melek ACAR'a, Sayın Şükran GÜNAYDIN'a ve Sayın Elif AKSAKAL'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni her türlü maddi ve manevi destekleyen, tez çalışmalarım süresince sabırlarını eksik etmeyen, hayatıma anlam katan babama, anneme ve ablama sonsuz teşekkür ederim.

Betül ARI

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pichia pastoris'te KENDİNDEN İNDÜKLENEBİLİR BİR HETEROLOG PROTEİN EKSPRESYON SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Betül ARI

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER

Amaç: Bu çalışmada, rekombinant protein üretiminde sıklıkla kullanılan *Pichia pastoris*'te metanol ile indüklenebilir alkol oksidaz (AOX) promotörü kontrolünde kültür ortamına metanol ilave etmeden, kendinden indüklenebilir bir ekspresyon sisteminin geliştirilmesi amaçlandı.

Yöntem: Kodon optimize yeşil floresan protein (GFP) geni, pPICZαB vektörüne klonlandı. Elde edilen pPICZαB-GFP, *P. pastoris* X-33 genomuna ve genomunda pGKBα-PME taşıyan *P. pastoris* (pGKBα-PME/X-33) genomuna entegre edildi. Ayrıca pPICZαA-Azu da pGKBα-PME/X-33 hücrelerinin genomuna entegre edildi. Elde edilen maya transformantları, YPD-zeosin agar plaklarına transfer edilerek yüksek dozda antibiyotiğe dayanıklı transformantlar seçildi. pPICZαB-GFP/X-33 hücrelerinin %0,5 metanol indüksiyonu ile GFP ekspresyonunu belirlemede floresan spektrofotometre ve SDS-PAGE analizi kullanıldı. Kendinden indüklenebilir sistemin geliştirilmesi için pGKBα-PME+pPICZαB-GFP/X-33 hücreleri, farklı konsantrasyonlarda pektin içeren besiyerinde üretime alındı. Üretim ortamındaki hücrelerde AOX protein ekspresyonunu belirlemek için western blot analizi yapıldı. Kültür ortamında metanol varlığını belirlemede GC-MS analizi kullanıldı. Farklı inkübasyon süreleri sonunda toplanan kültür sıvılarında GFP ekspresyonunu belirlemede floresan spektrofotometre ve SDS-PAGE analizi kullanıldı. Diğer yandan, pGKBα-PME+pPICZαA-Azu/X-33 hücreleri pektin içeren üretim besiyerinde inkübasyona bırakıldı. Farklı inkübasyon süreleri sonunda toplanan kültür sıvılarında azurin proteininin ekspresyonunu belirlemek için western blot analizi yapıldı.

Bulgular: Metanol indüksiyonu ile pPICZαB-GFP/X-33 hücreleri tarafından en iyi ekstrasellüler GFP üretimi, 120 saatlik inkübasyon sonunda gerçekleştirildi. Farklı miktarlarda pektin içeren, metanol ilave edilmeyen kültür ortamlarında pGKBα-PME+pPICZαB-GFP/X-33 hücrelerinde AOX protein ekspresyonu gözlemlendi. Aynı zamanda kültür ortamlarında metanol varlığı tespit edildi. Farklı inkübasyon süreleri sonunda *P. pastoris* ikili promotör sistemi tarafından ekstrasellüler GFP üretiminin gerçekleştirildiği görüldü. Diğer yandan, pektin içeren üretim besiyerinde pGKBα-PME+pPICZαA-Azu/X-33 hücrelerinin azurin proteinini ürettiği gözlemlendi.

Sonuçlar: Bu tez çalışmasında pektin içeren, metanol ilave edilmeyen ortamda rekombinant *P. pastoris* hücreleri tarafından hem GFP hem de azurin proteininin üretimi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Böylelikle, literatürde ilk defa *Pichia pastoris*'te kendinden indüklenebilir bir heterolog protein ekspresyon sistemi geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *P. pastoris*, Heterolog protein, İndüksiyon, Pektin, GFP, Azurin

Ağustos 2021, 84 sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

IMPROVEMENT OF A SELF-INDUCIBLE HETEROLOGOUS PROTEIN EXPRESSION SYSTEM IN *Pichia pastoris*

Betül ARI

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Yağmur ÜNVER

Purpose: In this study, it was aimed to develop a self-inducible expression system without adding methanol to the culture medium under the control of methanol-inducible alcohol oxidase (AOX) promoter in *Pichia pastoris*, which is frequently used in recombinant protein production.

Method: The codon optimized green fluorescent protein (GFP) gene was cloned into the pPICZαB vector. The resulting pPICZαB-GFP was integrated into the *P. pastoris* X-33 genome and the *P. pastoris* (pGKBα-PME/X-33) genome carrying pGKBα-PME. In addition, pPICZαA-Azu was also integrated into the genome of pGKBα-PME/X-33 cells. Obtained yeast transformants were transferred to YPD-zeocin agar plates and high dose antibiotic resistant transformants were selected. Fluorescent spectrophotometer and SDS-PAGE analysis were used to determine GFP expression by 0.5% methanol induction of pPICZαB-GFP/X-33 cells. To improve the self-inducible system, pGKBα-PME+pPICZαB-GFP/X-33 cells were grown in medium containing pectin at different concentrations. Western blot analysis was performed to determine AOX protein expression in cells in the production medium. GC-MS analysis was used to determine the presence of methanol in the culture medium. Fluorescent spectrophotometer and SDS-PAGE analysis were used to determine GFP expression in collected culture broths at the end of different incubation times. On the other hand, pGKBα-PME+pPICZαA-Azu/X-33 cells were incubated in production medium containing pectin. Western blot analysis was performed to determine the expression of azurin protein in collected culture broths at the end of different incubation times

Findings: The best extracellular GFP production by pPICZαB-GFP/X-33 cells with methanol induction was achieved after 120 hours of incubation. AOX protein expression was observed in pGKBα-PME+pPICZαB-GFP/X-33 cells in culture media containing different amounts of pectin without methanol addition. At the same time, the presence of methanol was detected in the culture media. At the end of different incubation times, extracellular GFP production was observed by the *P. pastoris* dual promoter system. On the other hand, it was observed that pGKBα-PME+pPICZαA-Azu/X-33 cells produced azurin protein in production medium containing pectin.

Results: In this thesis study, both GFP and azurin protein were successfully produced by recombinant *P. pastoris* cells in a pectin-containing medium without methanol addition. Thus, a self-inducible heterologous protein expression system was developed in *Pichia pastoris* for the first time in the literature.

Keywords: *P. pastoris*, Heterologous protein, Induction, Pectin, GFP, Azurin

August 2021, 84 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	xi
GİRİŞ.....	1
Rekombinant Protein Üretimi	1
Metilotrofik Mayalar	3
Metilotrofik Olmayan Mayalar	3
<i>Pichia pastoris</i> Ekspresyon Sistemi.....	3
<i>Pichia pastoris</i> 'te Promotör Kullanımı.....	5
İndüklenebilir promotörler	5
Yapısal promotörler	6
<i>Pichia pastoris</i> 'in Rekombinant Protein Üretimindeki Önemi.....	7
Pektin	9
Pektik Enzimler.....	10
Poligalakturonaz (PG).....	10
Pektat liyaz (PEL)	10
Pektin liyaz (PNL).....	11
Pektin metilesteraz (PME) (Pektin pektinhidrolaz, pektin esterase)	11
Pektin Çeşitleri.....	11
Düşük metoksilli pektin	11
Yüksek metoksilli pektin	11
Çalışmanın Amacı.....	11
KURAMSAL TEMELLER.....	13
MATERYAL ve METOT	18
Kullanılan Cihazlar	18
Kimyasallar ve Besiyerler	19
Kullanılan Mikroorganizmalar	19

Kullanılan Primerler.....	19
Çalışmada Kullanılan pPICZαB vektör DNA'sı.....	19
Çalışmada Kullanılan Restriksiyon Endonükleazlar.....	21
Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltilerin Hazırlanışı	21
pPICZαB-GFP Vektörünün Elde Edilmesi	24
Kodon optimize GFP genine ait sekansın çoğaltılması.....	24
Elde edilen PCR ürününün saflaştırılması	24
Saflaştırılan PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi	25
Vektör DNA'nın (pPICZαB) restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi	25
Vektör DNA'nın jelden ekstraksiyonu.....	26
Ligasyon reaksiyonu	26
<i>E. coli</i> One Shot TOP10 Hücrelerinin Transformasyonu	27
GFP genine ve vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak ilgili sekansların koloni PCR ile amplifikasyonu.....	27
Muhtemel rekombinant vektörün sekans analizi ile doğrulanması.....	28
pPICZαB-GFP Rekombinant Vektörünün <i>P. pastoris</i> 'e Transfer Edilmesi.....	29
pPICZαB-GFP rekombinant vektörün lineer hale getirilmesi	29
<i>P.pastoris</i> hücrelerinin transformasyonu	29
<i>P. pastoris</i> transformantlarından genomik DNA (gDNA) izolasyonu.....	29
PCR	30
Maya transformantlarının antibiyotik ile seçilimi.....	31
İndüklenebilir Sistem ile GFP Ekspresyonunun Gerçekleştirilmesi.....	31
SDS-PAGE Analizi.....	31
Küçük Ölçekli GFP Üretimi.....	32
SDS-PAGE analizi ve gümüş boyama	33
Kendinden İndüklenebilir Sistem ile GFP Ekspresyonunun Gerçekleştirilmesi	33
Western blot Analizi	34
Hücre lizatının hazırlanması	34
Blotlama	34
GC-MS Analiziyle Metanol Varlığının Belirlenmesi	35
GFP Floresan Yoğunluğunun Belirlenmesi	35
SDS-PAGE Analizi ve Gümüş Boyama	35
Kendinden İndüklenebilir Sistem İle Azurin Ekspresyonunun Gerçekleştirilmesi	36
Western blot Analizi	36
ARAŞTIRMA BULGULARI	38

Kodon Optimize GFP Geninin PCR ile Amplifikasyonu	38
GFP Geninin ve pPICZαB Vektör DNA'nın Kesilmesi ve Görüntülenmesi.....	38
<i>E. coli</i> TOP10 Hücrelerinin Transformasyonu	39
Geni Taşıyan Doğru Transformantların Koloni PCR ile Seçimi	39
Muhtemel Rekombinant Vektörün Sekans Analizi İle Doğrulanması.....	40
<i>P. pastoris</i> Hücrelerinin Transformasyonu ve Doğru Transformantların Tespiti.....	42
<i>P. pastoris</i> Hücrelerinin Seçilimi ve gDNA İzolasyonu	42
Polimeraz Zincir Reaksiyonları.....	42
Maya Transformantlarının Antibiyotik ile Seçilimi.....	45
SDS PAGE Analizi	46
Küçük Ölçekli Rekombinant Protein Üretimi.....	47
Pektin içeren Ortamda <i>P. pastoris</i> İkili Promotör Sistemi Tarafından GFP Üretimi	49
GC-MS Analiziyle Metanol Varlığının Belirlenmesi	49
GFP Floresan Yoğunluğunun Belirlenmesi ve SDS-PAGE Analizi.....	51
Pektin İçeren Ortamda <i>P. pastoris</i> İkili Promotör Sistemi Tarafından Azurin Üretimi	52
TARTIŞMA ve SONUÇ	54
Sonuç ve Öneriler.....	64
KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ.....	71

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Metilotropik Olan ve Metilotropik Olmayan Mayalar	2
Tablo 2. İndüklenebilir Promotörler	6
Tablo 3. Yapısal Promotörler.....	7
Tablo 4. <i>P. pastoris</i> 'te Piyasada Bulunan Ürünlerden Bazıları	8
Tablo 5. Kullanılan Cihazlar ve Markaları	18
Tablo 6. Çalışmada Kullanılan Primerler	19
Tablo 7. Restriksiyon Endonükleazların Tanıma Sekansları ve Kesim Noktaları.....	21
Tablo 8. Tez Çalışmasında Kullanılan Besiyerler ve Çözeltilerin Hazırlanışı	22
Tablo 9. GFP Geninin PCR İle Amplifikasyonu	24
Tablo 10. PCR Şartları.....	24
Tablo 11. GFP Geni Kesim Reaksiyon Karışım İçeriği	25
Tablo 12. Vektör DNA Kesim Reaksiyon Karışım İçeriği.....	25
Tablo 13. Ligasyon Reaksiyonu	26
Tablo 14. Koloni PCR İçin Kullanılan Karışım İçeriği	27
Tablo 15. Koloni PCR Şartları.....	28
Tablo 16. PCR Karışım İçeriği	30
Tablo 17. PCR Şartları.....	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Pektin molekülünün yapısı	10
Şekil 2. <i>P. pastoris</i> 'te kendinden indüklenebilir ekspresyon sisteminin şematik gösterimi	12
Şekil 3. pPICZαB vektörü	20
Şekil 4. pPICZαB vektöründe bulunan çoklu klonlama bölgesinin nükleotid sekansı	21
Şekil 5. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	38
Şekil 6. Kesilmiş vektör DNA'nın agaroz jel elektroforez görüntüsü	38
Şekil 7. LS-LB zeosin agarda inkübasyon sonrası gelişen koloniler	39
Şekil 8. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	39
Şekil 9. Vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak yapılan koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	40
Şekil 10. Vektör DNA'ya ait forward primer ile gerçekleştirilen sekans analizi ile kodon optimize GFP genine ait nükleotid dizisinin blast sonucu	40
Şekil 11. Vektör DNA'ya ait reverse primer ile gerçekleştirilen sekans analizi ile kodon optimize GFP genine ait nükleotid dizisinin blast sonucu	41
Şekil 12. pPICZαB-GFP vektörü	41
Şekil 13. Transformasyon sonrası gelişen maya kolonilerinin görüntüsü	42
Şekil 14. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	43
Şekil 15. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	43
Şekil 16. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	44
Şekil 17. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	44
Şekil 18. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	45
Şekil 19. İnkübasyon sonrası gelişen mayalar	46
Şekil 20. Ekstrasellüler rekombinant proteinin SDS-PAGE analizi	46
Şekil 21. Rekombinant GFP üretimi	48
Şekil 22. Western blot analiz sonucu	49
Şekil 23. GC-MS sonuçları	50
Şekil 24. GC-MS sonuçları	51
Şekil 25. Kendinden indüklenebilir sistem ile rekombinant GFP üretimi	52
Şekil 26. Rekombinant azurin proteinin western blot analiz sonucu	53

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

AOX	: Alkol Oksidaz
GAP	: Gliseraldehit-3-fosfat Dehidrogenaz
bç	: Baz Çifti
CIAP	: Sığır Bağırsak Alkalın Fosfataz (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)
dNTP	: Deoksiribonükleotid Trifosfat
ddH₂O	: Çift Distile Saf Su
gDNA	: Genomik Deoksiribonükleik Asit
LB	: Luria Bertani
LiCl	: Lityum Klorür
LS-LB	: Low Salt- Luria Bertani
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
Rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı (Revolutions Per Minute)
SOC	: Super Optimal Broth with Catabolite repressor
TCA	: Trikloroasetik Asit
YPD	: Maya Ekstraktı Pepton Dekstroz (Yeast Extract Peptone Dextrose)
TAE	: Tris Asetat-EDTA
PBST	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline-Tween 20)
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
GC-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
µg	: Mikrogram
aa	: Aminoasit
His	: Histidin
Kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
ng	: Nanogram
kPa	: Kilopaskal
nm	: Nanometre
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
H	: Saat (Hour)
α	: Alfa

GİRİŞ

Rekombinant Protein Üretimi

Son birkaç on yılda genetikçiler, genlerin tanımlanması, taşınması ve kaynağından farklı organizmaya yerleştirilmesi için DNA'yı manipüle etmeyi öğrenmişlerdir (Macauley-Patrick vd 2005). Bu manipülasyonlar sonucu elde edilen biyomoleküller, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak, kaynağından başka organizmada üretiminin yapılması ve istenen ürünün üretimden sorumlu hedef genin klonlanmasıyla mümkün olmaktadır (Nielsen ve Villadsen 1994). İlk rekombinant DNA (rDNA) molekülleri, 1973'te Stanford Üniversitesi ve California San Francisco Üniversitesi'nden Paul Berg, Herbert Boyer, Annie Chang ve Stanley Cohen tarafından üretilmiş (Khan vd 2016), elde edilen rekombinant DNA'nın bir konakçı hücrede ekspresyonu sonucu üretilen protein ise rekombinant (heterolog) protein olarak adlandırılmıştır (Karaoğlu 2012).

Rekombinant (heterolog) protein üretimi, doğal kaynaklardan protein ekstraksiyonun zorlayıcılığına alternatif oluşturan genetik mühendisliği araçlarının geliştirilmesiyle 1980'lerin başında ortaya çıkmıştır. Yıllar geçtikçe, *Escherichia coli* bakterisinden memeli hücrelerine kadar çeşitli konakçılarda yüksek düzeyde heterolog protein üretimi mümkün hale gelmiştir. Rekombinant proteinin önemi, 2016 yılında 1,6 milyar dolara ulaşan ve 2022 yılına kadar 2,8 milyar dolara ulaşması beklenen pazar büyüklüğü ile temsil edilmektedir. İlk ticari farmasötikler olan, insan insülini ve büyüme hormonu, başlangıçta konakçı olarak *E. coli* bakterisi kullanılarak üretilmiştir. Daha sonra, insan insülini, 1982'de genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak üretilen ilk lisanslı ilaç olmuştur. Günümüzde rekombinant protein, ilaç keşfi için bir kilometre taşı olarak kabul edilmektedir (Karbalaee vd 2020).

Heterolog protein üretiminde kullanılan farklı konakçılar arasında, *E. coli* bakterisi, genetik araçların çok geniş bulunabilirliği, hızlı büyüme ve basit yetiştirme teknikleri nedeniyle yaygın olarak tercih edilen bir konakçı olarak bilinir. Fakat, istenen proteinin özelliklerine bağlı olarak, *E. coli*'nin kullanımı zahmetli olabilir, hatta mümkün olmayabilir. Bunun sebebi, rekombinant proteinin translasyondan sonra glikolize edilmesi veya kimyasal olarak modifiye edilmesine gerek duyulması ya da proteolitik işlem gerektirmesidir. Bu nedenle, genellikle *E. coli*'den saflaştırılan enzimlere, post-translasyonel modifikasyonların eklenmesi için bu proteinlerin bir *in vitro* işlemde geçmesi gerekir. Bu da daha maliyetli bir işlemle ve nihai rekombinant protein veriminde azalma ile sonuçlanır. Bu nedenle, *in vitro* modifikasyona alternatif olarak, mayalar, ipliksi mantarlar, böcekler, bitki ve memeli hücre hatları gibi ökaryotik konakçılar kullanılmıştır (Karbalaee vd 2020).

Bunların arasında tek hücreli mayaların, böcek ve memeli hücre dizileri ile karşılaştırıldığında daha düşük besin ihtiyaçlarına sahip olduğu ve biyolojik olarak aktif bir rekombinant protein üretim, için gereken post translasyonel modifikasyonları gerçekleştirme yetenekleri olduğu söylenebilir. Bu nedenle mayalar, çeşitli farmasötik proteinlerin üretimi için kullanılmaktadır (Karbalaee vd 2020).

Mayalardan *Saccharomyces cerevisiae*, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA; U.S. Food and Drug Administration) tarafından genellikle güvenli (GRAS; Generally Recognized As Safe) olarak kabul edilen bir organizmadır (Porro ve Mattanovich 2004). Tarihsel olarak en çok kullanılan konakçılardan biri olan *S. cerevisiae*, heterolog protein üretimi için sıklıkla kullanılan konakçı olarak bilinmekteydi (Karbalaee vd 2020). Ancak bu maya bazen, oldukça karmaşık ekipman gerektiren teknik fermentasyon ihtiyaçlarının bulunması nedeniyle, rekombinant proteinlerin büyük ölçekli üretimi için uygun bir konakçı değildir ve *S. cerevisiae* tarafından üretilen proteinler sıklıkla hiperglikozile edilir. Ayrıca üretilen ürünler periplazmik boşlukta birikir. Bu birikmeden dolayı, üretilen proteinlerin bir kısmı genellikle bozulur. Bu bozunma ürünlerinin genellikle istenen üründen ayrıştırılması çok zordur. 1980'lerin ortalarından beri bu tür dezavantajlar, mayalar arasında var olan büyük biyolojik çeşitlilikten yararlanmaya çalışan ve "geleneksel olmayan" mayalar kullanarak ekspresyon sistemlerinin geliştirilmesine başlayan alternatif konakçı arayışını teşvik etmiştir. Alternatif maya konakçılarından öne çıkan örnekler, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia methanolica*, *Pichia stipitis*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Z. bailii*, *Candida boidinii* ve *Schwanniomyces (Debaryomyces) occidentalis* örnek verilmektedir (Porro ve Mattanovich 2004).

Heterolog protein üretiminde kullanılan mayalar, metilotrofik ve metilotrofik olmayan olmak üzere sınıflandırılmıştır. Tablo 1’de metilotrofik olan ve metilotrofik olmayan mayalar verilmiştir.

Tablo 1. Metilotrofik Olan ve Metilotrofik Olmayan Mayalar (Porro ve Mattanovich 2004)

Metilotrofik Mayalar	Metilotrofik Olmayan Mayalar
<i>Hansenula polymorpha</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Pichia pastoris (Komagataella phaffii)</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>Pichia methanolica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
<i>Pichia minuta</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
<i>Candida boidinii</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
	<i>Pichia stipitis</i>
	<i>Arxula adenivorans</i>
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>

Metilotrofik Mayalar

Bir karbon bileşimini (örneğin, metanol) karbon ve enerji kaynağı olarak metabolize etmek için temelde ortak yolu paylaşan bir maya grubudur. Başlangıçta bu maya grubu, tek hücreli protein üretiminde kullanılmış ve iki ana özellik nedeniyle rekombinant proteinler için üretim sistemleri olarak ilgi çekmiştir. Bunlar; karmaşık olmayan fermentasyon işlemlerinde bile yüksek hücre yoğunluklarına kadar büyüyebilir ve metanol oksitleyici enzimlerin (alkol oksidaz) ekspresyonunu sağlayan güçlü bir şekilde düzenlenmiş promotörlere sahiptir (Porro ve Mattanovich 2004).

Metilotrofik Olmayan Mayalar

Hem endotoksinlerden hem de litik virüslerden yoksun olan ve Tablo 1’de gösterilen vahşi tip (wild-type) mayaların çoğu, etanol, içecekler, aromalar, enzimler, vitaminler, organik asitler ve tek hücre proteinlerinin (biyomas) üretimi için kullanılmaktadır. Genel olarak metilotrofik olmayan konakçıların temel avantajı, moleküler biyologların, biyokimyacıların, mikrobiyal fizyologların ve fermentasyon teknologlarının bu mayalara aşina olmalarıyla ilgilidir. Ayrıca *K. lactis*, daha önce bahsedilen *S. cerevisiae* gibi GRAS statüsündedir (Porro ve Mattanovich 2004).

Metilotrofik mayalardan olan *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffi*) ve *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*), temel olarak heterolog protein ekspresyonu için kullanılır. Bu mayalara ek olarak *Pichia methanolica* ve *Candida boidinii* de maya ekspresyon sistemleri olarak kullanılmaktadır (Porro ve Mattanovich 2004).

Pichia pastoris Ekspresyon Sistemi

Tek hücreli ökaryot olan metilotrofik maya *P. pastoris*, 1-5 µm çapında, 5-30 µm uzunluğunda, oval şekillidir. Metilotrofik olduğu için karbon ve enerji kaynağı olarak metanolü kullanabilen ve çeşitli rekombinant proteinlerin ekspresyonu için genetik olarak tasarlanabilen mayadır (Cregg ve m. 1999; Ünver 2014) .

Tarihsel olarak, *P. pastoris* mayası ilk olarak Fransa'da kestane ağacının salgısından izole edilmiş ve Guilliermond tarafından “*Zygosaccharomyces pastoris*” olarak adlandırılmıştır. Yamada ve arkadaşları daha sonra bu organizmayı yeni bir cins olan *Komagataella* veya *Pichia* olarak sınıflandırmıştır (Karbalaei vd 2020).

Phillips petrol şirketi, *P. pastoris*'in yüksek hücre yoğunluklarında (> 130 g / kuru hücre ağırlığı) sürekli kültürde, metanol üzerinde yetiştirilmesi için ortam ve protokoller geliştiren ilk şirkettir. 1970'lerde *P. pastoris*, bu mayanın metanolü tek karbon kaynağı olarak kullanma

kabiliyetinden dolayı potansiyel bir tek hücreli protein kaynağı olarak değerlendirilmiştir. Ne yazık ki, 1970'lerde meydana gelen petrol krizi metan (metanolün kaynağı) maliyetinde artışa neden olmuş ve en önemli alternatif hayvan yemi kaynağı olan soya fasulyesinin fiyatı düşmüştür. Bu nedenle, metanolden tek hücreli protein (SCP: Single Cell Protein) üretiminin ekonomisi son derece elverişsiz hale gelmiştir. Bununla birlikte, sonraki on yılda, Phillips petrol şirketi, Salk Biyoteknoloji Enstitüsü ile birlikte heterolog protein ekspresyonu için *P. pastoris*'i incelemiştir. Alkol oksidaz için gen ve promotör, aynı zamanda *P. pastoris*'in moleküler manipülasyonu için gereken vektörleri, suşları ve protokolleri üreten SIBIA tarafından izole edilmiştir. 20 yıldan daha uzun bir süre önce, bol miktarda metanolü hayvan yemi için bir protein kaynağına dönüştürme programı olarak başlayan durum, bugün hücre biyolojisi araştırmalarında kullanılan bir model ökaryot ve bir rekombinant protein üretim sistemi olmak üzere iki önemli biyolojik araca dönüşmüştür. Böylece *Pichia*, yüksek seviyelerde heterolog proteinleri ifade etme kabiliyeti nedeniyle bir ekspresyon sistemi olarak oldukça ilgi görmüştür (Macauley-Patrick vd 2005).

P. pastoris ekspresyon sisteminin avantajları, ucuz olması, nispeten hızlı ekspresyon sürelerine sahip olması ve translasyon sonrası modifikasyonları yapabilmesidir. Son zamanlarda yapılan araştırmalar, *Pichia* ekspresyon sisteminin kalsiyum ve potasyum kanalları, nitrat ve fosfat taşıyıcı ve histamin H1 reseptörü dahil olmak üzere zar proteinlerinin üretiminde benzersiz olduğunu göstermiştir. Ayrıca *P. pastoris*, rekombinant proteinlerin doğrudan kültür ortamına salgılanması için uygun bir mikroorganizmadır. Bu yüzden bu ekspresyon sisteminde sınırlı endojen salgı proteinleri üretimi nedeniyle rekombinant proteinlerin saflaştırılması kolaydır. Ayrıca *P. pastoris*'in protein üretim konakçısı olarak sahip olduğu bir başka avantajı, O- ve N-bağlı glikozilasyon ve disülfür bağ oluşumu gibi translasyon sonrası modifikasyonları gerçekleştirme kabiliyetidir. Pek çok terapötik protein glikoproteindir ve doğru katlanma, çözünürlük, stabilite ve uygun biyolojik aktiviteye sahip olmak için karbonhidrat yapılarının protein omurgasına eklenmesini (glikozilasyon) gerektirir. Diğer bir avantajı ise, bu mayaların GRAS statüsünde olmasıdır (Juturu ve Wu 2018).

P. pastoris'in metanol kullanım metabolizmasındaki ilk adım, metanolün alkol oksidaz enzimi (AOX) tarafından hidrojen peroksit ve formaldehite oksidasyonudur. Toksik hidrojen peroksit ise peroksizom adı verilen özel bir organel içinde toksik olmayan hale getirilir. Alkol oksidaz (AOX), her alt birimi kovalent olmayan bir şekilde bağlı FAD (flavin adenin dinükleotid) kofaktörü içeren bir homo-oktomerdir. Alkol oksidaz, O₂ için zayıf bir afiniteye sahiptir ve metilotrofik mayalar, büyük miktarlarda enzim sentezleyerek bu eksikliği telafi ediyor gibi görünmektedir. *P. pastoris*'te AOX'u kodlayan iki gen vardır; AOX1 ve AOX2.

Ancak hücredeki alkol oksidaz aktivitesinin büyük çoğunluğundan AOX1 geni sorumludur. AOX1 geninin ekspresyonu sıkı bir şekilde düzenlenir ve metanol tarafından yüksek seviyelere kadar indüklenir (James M. Cregg vd 2000).

***Pichia pastoris*'te Promotör Kullanımı**

Heterolog proteinlerin üretimi için önemli anahtarlardan biri, heterolog gen(ler)in transkripsiyon verimliliği ile ilgilidir. Yabancı genlerin verimli transkripsiyonu için çok çeşitli yapısal ve indüklenebilir, maya promotörleri mevcuttur. Genel olarak, konakçı olarak kullanılan maya türlerinden kaynaklanan homolog promotörler tercih edilir, çünkü heterolog promotörün genellikle iyi bir ifade verimliliği sağlamayacağı bilinir (Porro ve Mattanovich 2004).

AOX1 promotörü gibi sıkı bir şekilde düzenlenen promotörlerin kullanımı, proteinlerin aşırı ekspresyonu için avantajlar sağlar. Büyümenin üretim aşamasından ayrılmasıyla, protein ekspresyonundan önce biyokütle biriktirilir. Bu sayede hücreler, büyüme fazı sırasında rekombinant protein birikimi ile strese girmez ve bu sayede *P. pastoris* için toksik olan proteinlerin üretimi bile mümkün olur. Diğer yandan, yapısal promotörlerin kullanımı, sürecin işlenmesini kolaylaştırabilir. Yapısal promotörler genellikle seçim işaretlerini ifade etmek için de uygulanır. *P. pastoris* ekspresyon sisteminde yaygın olarak kullanılan, kapsamlı bir şekilde çalışılan ve ayrıca yakın zamanda incelenen promotörler Tablo 2 ve Tablo 3'te verilmiştir (Ahmad vd 2014a).

İndüklenebilir promotörler

İlk olarak heterolog gen ekspresyonu için Tschopp vd (1987) tarafından kullanılan sıkı bir şekilde düzenlenen AOX1 promotörü (P_{AOX1}), hala en yaygın kullanılan promotördür. *P. pastoris* glikoz, gliserol veya etanol üzerinde büyütüldüğünde P_{AOX1} güçlü bir şekilde baskılanır. Bu karbon kaynaklarının tükenmesi üzerine, promotörün baskısı kaldırılır, ancak sadece metanol ilavesiyle tamamen indüklenir. Birkaç çalışma, P_{AOX1} dizisinde birden çok düzenleyici öge tanımlamıştır (Ahmad vd 2014a). İndüklenebilir promotörler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Metanol, oldukça yanıcı ve tehlikeli bir maddedir ve bu nedenle büyük ölçekli fermentasyonlar için istenmeyen bir durumdur. Bu yüzden, metanol olmadan indüklenebilen ancak yine de yüksek ekspresyon seviyelerine ulaşan alternatif indüklenebilir promotörler veya P_{AOX1} varyantları arzu edilir. Yakın zamanda yayınlanan bir patent başvurusu, protein ekspresyonunun metanol eklenmeden AOX1, metanol oksidaz (MOX) veya format dehidrojenaz (FMDH) gibi metanol ile indüklenebilir promotör tarafından kontrol edildiği bir

yöntemi açıklar (Takagi vd 2012). Şimdilerde yüksek seviyede protein ekspresyonu geliştirme yetenekleri açısından çok sayıda kontrol edilebilir promotör araştırılmaktadır. Örneğin, yakın zamanda yayınlanan bir patent başvurusu, ilginç düzenleyici özellikler gösteren, *P. pastoris*, ADH1 (alkol dehidrojenaz), GUT1 (gliserol kinaz) ve ENO1'den (enolaz) üç yeni indüklenebilir promotörün kullanımını açıklamaktadır (J. Cregg ve Tolstorukov 2012). Bununla birlikte, mutlak ekspresyon değerlerinin eksikliğinden dolayı, bu yeni promotörlerin performansı, yaygın olarak kullanılan AOX1 ve GAP promoterleriyle karşılaştırılmaz durumdadır (Ahmad vd 2014a).

Yapısal promotörler

Bu promotörler; protein ekspresyonunu kolaylaştırır, potansiyel olarak tehlikeli indükleyicilerin kullanımına gerek duymazlar ve ilgili genin sürekli transkripsiyonunu sağlarlar. Bu amaçla, gliseraldehit-3-fosfat promotörü (P_{GAP}) yaygın olarak kullanılır ve glikoz üzerinde metanol ile indüklenen P_{AOX1} ile hemen hemen aynı ekspresyon seviyelerine ulaşabilir. $pGAP$ kontrolünde ekspresyon seviyeleri, gliserol üzerinde yaklaşık yarısına ve hücreler metanol üzerinde büyütüldüğünde üçte birine düşer (Ahmad vd 2014b). Diğer yandan, yapısal promotörler, genlerin aşırı ekspresyonu için veya yardımcı faktörleri ve işaretleyici genleri birlikte ifade etmek için avantajlı olabilir. Yapısal promotörler Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 2. İndüklenebilir Promotörler (Ahmad vd 2014b; Juturu ve Wu 2018)

İndüklenebilir promotörler	İlgili gen	Düzenlenme
AOX1	Alkol oksidaz 1	Metanol
DAS	Dihidroksiaseton sentaz	Metanol
FLD1	Formaldehit dehidrojenaz 1	Metanol veya metilamin
ICL1	İzositrat liyaz	Glikoz tarafından baskılanır, yokluğunda indüksiyon etanol ilavesiyle yapılır.
PHO89	Varsayılan Na^+ /fosfat simporter	Fosfat açlığı üzerine indüksiyon
THI11	Tiamin biyosentez geni	Tiamin tarafından baskılanır.
ADH1	Alkol dehidrojenaz	Glikoz ve metanol tarafından baskılanır, gliserol ve etanolla indüklenir.
ENO1	Enolaz	Glikoz, metanol ve etanol tarafından baskılanır, gliserolle indüklenir.
GUT1	Gliserol kinaz	Metanol tarafından baskılanır, glikoz, gliserol ve etanolla indüklenir.

Tablo 3. Yapısal Promotörler (Ahmad vd 2014b; Juturu ve Wu 2018)

Yapısal Promotörler	İlgili gen	Düzenlenme
GAP	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz	Glikoz üzerinde yapısal ekspresyon, gliserol ve metanolde daha az oranda yapısal ekspresyon.
TEF1	Translasyon uzama faktörü 1	Gliserol ve glikoz üzerinde yapısal ifade.
PGK1	3-Fosfoglisarat kinaz	Glikoz üzerinde yapısal ekspresyon, gliserol ve metanolde daha az oranda yapısal ekspresyon.
GCW14	Potansiyel glikosil fosfatidil inozitole (GPI) bağlı protein	Gliserol, glikoz ve metanol üzerinde yapısal ekspresyon.
G1	Yüksek afiniteli glikoz taşıyıcı	Gliserol üzerinde baskılanır, glikoz sınırlandırmasına bağlı olarak indüklenir.
G6	Muhtemel aldehit dehidrojenaz	Gliserol üzerinde baskılanır, glikoz sınırlandırmasına bağlı olarak indüklenir.

***Pichia pastoris*'in Rekombinant Protein Üretimindeki Önemi**

Metilotrofik maya olan *P. pastoris*'in rekombinant proteini fermentasyon ortamına salgılama yeteneği ve potansiyel ekspresyon sistemine sahip olması dolayısıyla son otuz yılda yaklaşık 5000'in üzerinde protein bu mikroorganizma tarafından intrasellüler veya ekstrasellüler olarak başarıyla üretilmiştir (Ahmad vd 2014b). Bu maya, endojenik proteinlerini çok düşük seviyede salgıladığından ifade edilen rekombinant proteinler, kültür ortamındaki total proteinin büyük çoğunluğunu oluşturur. Bu durum ise kültür ortamındaki rekombinant proteinin saflaştırılmasına öncülük eden önemli bir basamaktır. Bu mikroorganizmaya ait ekspresyon sistemi, biyoteknoloji, ilaç endüstrisi ve akademik araştırmacılar tarafından heterolog protein üretimi için ihtiyaç duyulan bir sistemdir (Karaoğlu 2012). Bu sistem, rekombinant olarak ifade edilen proteinlerin salgılanması esnasında istenen proteinin hücre içerisindeki yabancı proteinlerden korunması, hücreyi parçalamaya gerek kalmadan kolay bir şekilde saflaştırılması ve fermentasyon teknolojisi kullanılarak doğal proteinin yüksek seviyede elde edilmesi gibi bazı avantajlar sunar (Sharma vd 2009). Ayrıca *P. pastoris* tarafından herhangi bir toksik protein ekstrasellüler olarak besiyerine salgılanmadığından bu durum farmasötik kullanım için büyük bir avantaj olarak görülmektedir (Kaymak 2008). Böylelikle pek çok endüstriyel enzimin ve farmasötik olarak ilgili proteinlerin başarılı ekspresyonu, metilotrofik maya *P. pastoris*'i en uygun ve güçlü protein üretim konakçı sistemlerinden biri haline getirmiştir. Aynı zamanda, kimyasal senteze yeni bir alternatif olabilecek membran

proteinlerinin ve küçük biyoaktif ve antimikrobiyal peptitlerin ekspresyonu için önemli bir konakçı durumundadır (Ahmad vd 2014a).

Araştırma Şirketi Teknolojiler (RCT)'nin *Pichia* Ekspresyon Platformu, çok çeşitli protein ürünlerinin terapötik ve endüstriyel kullanımlar için pazara girmesini sağlamıştır. *Pichia*'da üretilen çeşitli biyofarmasötik ürünler, FDA gibi düzenleyici kurumlar tarafından insan kullanımı için onaylanmıştır. Piyasada bulunan veya geliştirme aşamasında olan 70'den fazla ürünün bazıları Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. *P. pastoris*'te Piyasada Bulunan Ürünlerden Bazıları (www.pichia.com)

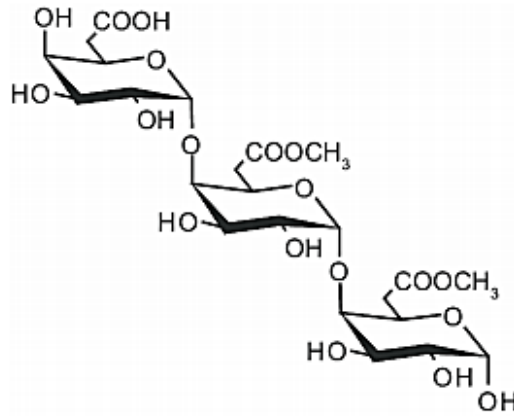
Ürün	Kullanım alanı	Şirket
Kalbitor® (DX-88 ecallantide, rekombinant bir kallikrein inhibitör proteini)	Kalıtsal anjiyoödem tedavisi	Dyax(Cambridge, Massachusetts)
Insugen® (rekombinant insan insülini)	Diyabet tedavisi	Biocon (Hindistan)
Medway (rekombinant insan serum albümini)	Kan damarı hacmi genişlemesi	Mitsubishi Tanabe Pharma (Japonya)
Shanvac™(rekombinant hepatit B aşısı)	Hepatit B'nin önlenmesi	Shantha/Sanofi (Hindistan)
Shanferon™(rekombinant interferon-alfa 2b)	Hepatit C ve kanser tedavisi	Shantha/Sanofi (Hindistan)
Ocriplasmin (rekombinant mikrop plazmin)	Vitreomaküler adezyon (VMA) tedavisi	ThromboGenics (Belçika)
Rekombinant kollajen	Tıbbi araştırma reaktifleri/dermal dolgu maddesi	Fibrogen (San Francisco, Kaliforniya)
Purifin (rekombinant fosfolipaz C)	Yüksek fosforlu yağların zamkının giderilmesi	Verenium/DSM (San Diego, Kaliforniya/Hollanda)
AQUAVAC IPN (rekombinant bulaşıcı pankreas nekroz virüsü kapsid proteinleri)	Somon balığındaki bulaşıcı pankreas nekrozu için aşı	Merck/Schering Plough Animal Health (Summit, New Jersey)
Nanobody® ALX-0061 (rekombinant anti-IL6 reseptörü monoklonal antikor parçası)	Romatoid artrit tedavisi	Ablynx (Belçika)
Nanobody® ALX00171 (rekombinant anti-RSV monoklonal antikor parçası)	Respiratory syncytial virus (RSV) enfeksiyon tedavisi	Ablynx (Belçika)
Heparin bağlayıcı EGF benzeri büyüme faktörü (HB-EGF)	İnterstisyel sistit tedavisi/ mesane ağrısı sendromu (IC / BPS) tedavisi	Trillium (Kanada)
Rekombinant tripsin	Proteinlerin parçalanması	Roche Applied Science (Almanya)
Rekombinant fitaz	Hayvan yemi katkı maddesi	Phytex, LLC (Sheridan, Indiana)
Rekombinant nitrat redüktaz	Su testi ve su arıtımı için enzim bazlı ürünler	The Nitrate Elimination Co. (Lake Linden, Michigan)
Rekombinant insan sistatinC	Araştırma reaktifi	Scipac (Birleşik Krallık)

P. pastoris rekombinant protein üretiminde büyük bir öneme sahip olsa da bazı dezavantajlara sahiptir. Bu ekspresyon sistemi ile yüksek seviyede heterolog protein üretimi için AOX1 promotörünün metanol ile indüklenmesi gerekir. Ancak bu promotörün kontrolünde heterolog protein üretiminin gerçekleşmesi için indükleyici olarak besi ortamına ilave edilen metanol, büyük ölçekli fermentasyon endüstrisinde toksisitesi ve yanıcılığı açısından potansiyel olarak tehlikelidir. Metanol katabolizması, önemli ölçüde ısı salınımı ile birlikte yüksek miktarda oksijen gerektirir. Yüksek oksijen kaynağı ve ısı giderme ihtiyacı ise üretim maliyetini arttırır. Bu durumda ısı alışverişi ve oksijen transfer kapasiteleri düşük olduğunda ölçek büyütmede zorluklar meydana gelir. Ayrıca, metanolün maliyeti, petrol krizi geldiğinde kesinlikle artacaktır (Wang vd 2017). *P. pastoris*'te metanolün vazgeçilmezliğinden kaçınmak için, P_{GAP} , P_{ICL1} ve P_{PH089} gibi alternatif promotörlerin kullanılması önerilmiştir. Ancak bu promotörler, geliştirmeden sonra bile, çoğunlukla zayıf ekspresyon yetenekleri veya kontrolsüz davranışları nedeniyle P_{AOX1} kadar yaygın olarak kullanılmamıştır (Wang vd 2017). Şimdilerde bu ekspresyon sisteminin kullanıcılarının ve araştırmacılarının genel ilgi alanlarından biri, endüstriyel ölçekli fermentasyonlarda indüksiyon için metanolün yerini alacak etkili alternatifler bulmaktır. Diğer yandan, *P. pastoris*'te rekombinant proteinlerin üretim seviyelerinin, tek promotör bazlı sistemlere kıyasla, ikili (dual) promotör sistemleri aracılığıyla yedi kata kadar iyileştirildiği bildirilmiştir (Öztürk vd 2017). Örneğin, yapılan bir çalışmada insan granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (hGM-CSF)'ün yapısal ve indüklenebilir şekilde ifade edilmesi için *P. pastoris* hücreleri, hem P_{GAP} hem de P_{AOX1} kontrolündeki hGM-CSF ile transforme edilmiş ve metanol indüksiyonu altında ikili promotör sistemi, GAP bazlı sisteme göre iki kat daha yüksek hGM-CSF üretimi ve %10 daha az hücre biyokütlesi sağlamıştır (Wu vd 2003). Benzer şekilde, *Bacillus acidicola*'nın asidik α -amilaz geni ve *Sporotrichum thermophile*'in asit stabil ve termostabil fitaz geni, *P. pastoris*'te ikili promotör sistemi ile ifade edilmiş, yalnızca P_{AOX1} bazlı amilaz ve fitaz üretim platformlarına kıyasla α -amilaz ve fitaz üretiminde sırasıyla 1.8 ve 1.3 kat artış görülmüştür (Parashar ve Satyanarayana 2016). Yine yapısal ve indüklenebilir ikili promotör sistemi tarafından *Rhizomucor miehei*'nin lipaz gen ürünü, yalnızca indüklenebilir ve yalnızca yapısal promotör bazlı *P. pastoris* strainleriyle karşılaştırıldığında altı ila yedi kat daha fazla üretilmiştir (He vd 2015).

Pektin

Pektin, yüksek bitkilerin hücre duvarlarında bulunan ve diğer hücre duvarı elementleriyle etkileşime girerek bitkilere esneklik ve mekanik güç kazandıran bir polisakkarittir. Yoğunlaştırıcı, tekstüre edici, emülsifiye edici, stabilize edici ve jelleştirici olarak gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitkilerde bulunan

pektik bileşenler ilk olarak 1790'da Fransız kimyager Louis Nicolas Vauquelin tarafından tanımlanmış ve 1825'te Fransız kimyager Henri Braconnot tarafından izole edilmiştir. Pektin, jelleştirici ve stabilize edici bir ajan olarak kullanılan ve yüksek değerli bir fonksiyonel gıda bileşeni olan hücre duvarının çok işlevli bir bileşenidir. Esas olarak bir α -1,4-D-galakturonik asit kalıntısından oluşur. Suda çözünür ve uygun koşullar altında şeker ve asit ile jel oluşturabilir. Farklı meyve ve sebzelerde farklı nitelik ve miktarlarda bulunur ve pektinin özellikleri izole edilen kaynağa bağlıdır (Güzel vd 2020). Pektin molekülünün yapısı Şekil 1 'de verilmiştir.



Şekil 1. Pektin molekülünün yapısı

Pektik Enzimler

Bitki patogenezeninden sorumlu pektinazların bakteri, mantar, böcek, nematod ve protozoa gibi çok sayıda organizma ve bitki tarafından üretildiği bildirilmiştir (Uçan ve Akyıldız 2012). Etki mekanizmalarına göre dört gruba ayrılırlar;

Poligalakturonaz (PG)

α -1,4-glikozidik bağlarını hidrolitik olarak parçalamaktadır. Endo ve ekzo olmak üzere iki tipi vardır. Ekzo-PG tipi, substrata indirgen olmayan uçtan, endo-PG ise rastgele etki etmektedir ve depolimerizasyon sonunda meyve suyunun viskozitesi düşmektedir (Uçan ve Akyıldız 2012). Bütün pektinolitik enzimler arasında en çok bulunan poligalakturonazlar ,asit zincirini su ilavesiyle hidroliz etme yeteneğine sahiptir (Jayani vd 2005).

Pektat liyaz (PEL)

β -eliminasyonla esterleşmemiş galakturonat birimlerinin kırılmasını katalizlemektedir. Hem ekzo-PEL ve hem de endo-PEL türleri vardır (Payasi vd 2006; Uçan ve Akyıldız 2012).

Pektin liyaz (PNL)

β -eliminasyonla esterleşmiş galakturonat birimlerinin kırılmasını katalizlemektedir (Jacob ve Prema 2006; Uçan ve Akyıldız 2012).

Pektin metilesteraz (PME) (Pektin pektinhidrolaz, pektin esteraz)

Yüksek bitkilerde yaygın olarak bulunur ve metil ester gruplarını hidroliz ederek pektini de-esterifiye eder. Böylece metanol açığa çıkararak yüksek metoksilpektinleri, pektatlar ve poligalakturonik asitler gibi düşük metoksilpektinlere dönüştürür. Muhtemeldir ki, Dünya'daki ana metanol kaynağı, bitki PME enzimi tarafından gerçekleştirilen pektin demetilasyonudur (Fall ve Benson 1996; Hüve vd 2007).

Pektin Çeşitleri

Düşük metoksilli pektin

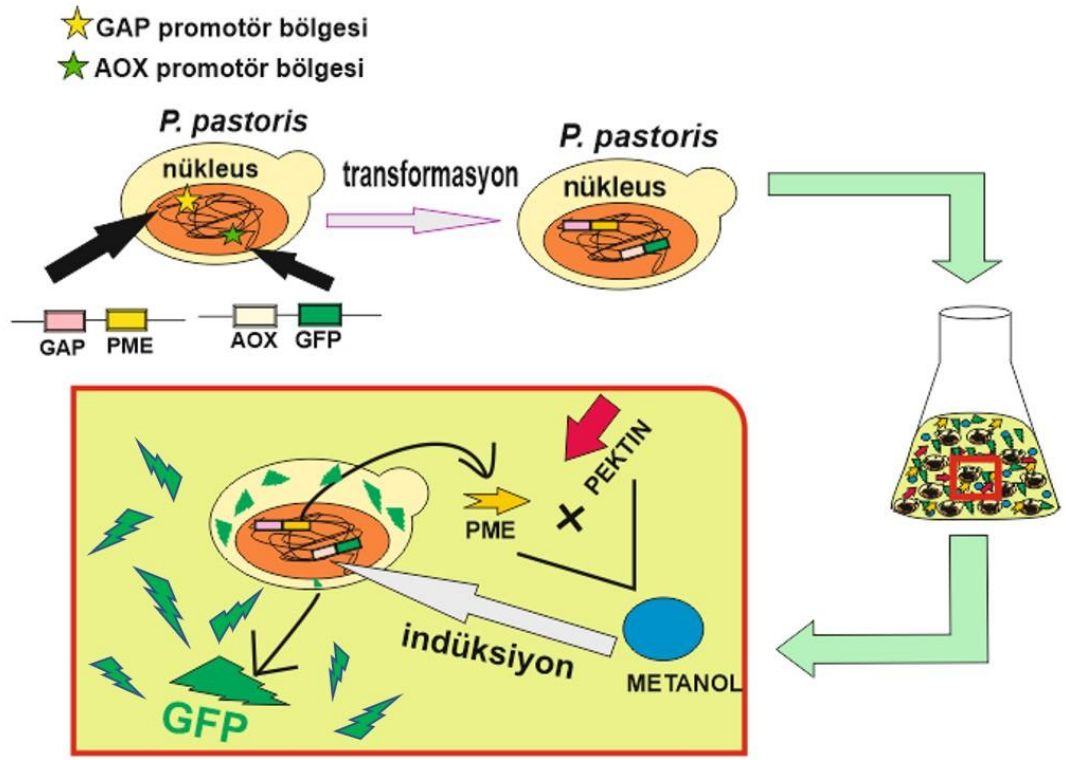
Pektin molekülündeki galakturonik asit ana zincirindeki karboksil gruplarının %50'sinden azının metil grubuyla esterleşmesiyle düşük metoksilli pektin jelleşmesi meydana gelmektedir.

Yüksek metoksilli pektin

Pektin molekülünün galakturonik asit ana zincirindeki karboksil gruplarının %50'sinden fazlasının metil grubuyla esterleşmesiyle yüksek metoksilli pektin meydana gelir. Yüksek metoksilli pektinlerin jel oluşturma mekanizması düşük metoksilli pektinlerin jel oluşturma mekanizmasından tamamen farklıdır. Şeker konsantrasyonunun en az %55 olması, yüksek metoksilli pektinin jelleşmesi için gerekliyken düşük metoksilli pektinler şekersiz ortamda jelleşebilir. Yüksek metoksilli pektin jelleşmesi için ortamın asidikliği (pH<3,6) önemli bir faktördür (Syetkhajy 2017).

Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasının amacı, rekombinant protein üretiminde sıklıkla kullanılan *Pichia pastoris*'te kendinden indüklenebilir bir ekspresyon sisteminin geliştirilmesidir. Böylece, literatürde ilk defa kültür ortamına metanol ilave etmeden, kendinden indüklenebilir ekspresyon sistemi kullanılarak alkol oksidaz (AOX) promotörü kontrolünde çeşitli proteinlerin üretiminin gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Kendinden indüklenebilir sistemin şematik gösterimi Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2. *P. pastoris*'te kendinden indüklenebilir ekspresyon sisteminin şematik gösterimi

KURAMSAL TEMELLER

Uehara vd (2000) yaptıkları çalışmada faredeki α -amilaz genini *P. pastoris*'te ifade etmişlerdir. Fare α -amilaz genini, bir *Pichia* ekspresyon vektörü pPIC9'un çoklu klonlama bölgesine yerleştirip yeni bir ekspresyon vektörü (pME624) elde etmişlerdir. Vektörün maya genomuna entegre olduğunu göstermek için Southern blot analizi yapmışlardır. 53 transformant arasından en yüksek aktiviteyi gösteren G2 transformantı ile üretim gerçekleştirmişlerdir. *P. pastoris*'te elde ettikleri ekspresyon seviyesini, fare α -amilaz genini ifade eden rekombinant *Saccharomyces cerevisiae* ile karşılaştırdıklarında spesifik enzim aktivitesinin 8 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Dorokhov vd (2012) yaptıkları çalışmada, insanın metanole duyarlı genlerini (MRG: Methanol-Responsive Genes) ortaya çıkarmak için, ADH içermeyen ve metanole maruz bırakılan HeLa hücrelerinin cDNA kütüphanelerini kullanmışlardır. Bu tasarımda, formaldehit ve formik asit detoksifikasyonunda yer alan genleri, analizlerden hariç tutmuşlardır. MRG'leri belirleyerek plazmadaki metanol içeriğindeki artışlar ile gönüllüler tarafından taze salatalık tüketildikten sonra insan lökosit MRG mRNA düzeylerindeki değişiklikler arasında bir korelasyon ortaya çıkarmışlardır. Daha sonra, farelerin gastrointestinal kanalında pektin / PME kompleksi tarafından üretilen metanolün, beyin MRG mRNA'sının up ve down düzenlenmesini indüklediğini göstermişlerdir. İki seçimli tahlillerde yaralı bitki buharlarını soluyan farelerin lokomotor davranışını ölçmek için uyarlanmış bir Y labirenti kullanmışlardır. Farelerin metanol kokusunu diğer bitki uçucu maddelerine tercih ettiğini ve metanolün fare beynindeki MRG mRNA birikimini değiştirdiğini göstermişlerdir.

Prielhofer vd (2013) yaptıkları çalışmada *P. pastoris*'te metanolsüz indüksiyon için yeni bir promotör üzerine çalışmışlardır. Gen ekspresyon modellerini analiz etmek ve potansiyel promotörleri metanolsüz üretim stratejisine tanımlamak için DNA mikroarray kullanmışlardır. Gliserollü ve glikozlu kültürlerde büyüyen *P. pastoris* vahşi tip hücrelerinin, hem gliserol üzerinde güçlü baskılanma hem de besleme fazında yüksek seviyeli ekspresyonu sağlayan genlerin tanımlanması için DNA mikroarray analizini kullanmışlardır. Hücre içi raportör EGFP'yi ifade etmek için altı yeni glikoz limiti indüklenebilir promotörü başarıyla uygulamışlardır. Ön kültürde güçlü baskılanmayla birlikte en yüksek ifade seviyelerini, yeni promotörler olan P_{G1} ve P_{G6} ile elde etmişlerdir. Promotörleri karakterize etmek için endüstriyel olarak salgılanan bir protein olan insan serum albüminini (HSA) kullanmışlardır. İki gen

kopyasına sahip bir P_{G1} klonu ile aynı gen kopya sayısına sahip bir P_{GAP} klonuna kıyasla glikoza dayalı üretim fermentasyonda biyokütleye özgü HSA titresinin yaklaşık %230'una ulaştığını ve P_{G6} klonu ile yalnızca %39'una ulaştığını göstermişlerdir. Sırasıyla P_{G1} ve P_{G6}'nın kontrolü altında HSA'yı ifade eden ve yüksek kopyaya sahip iki klonu, transformasyon sonrası vektör amplifikasyonu ile oluşturmuşlardır. Eşit üretim şartlarında sırasıyla yaklaşık 1.0 ve 0.7 g/L⁻¹ HSA üretmişlerdir. Üretim proseslerindeki uygunluk, P_{G1} için HyHEL antikör Fab fragmanı ve P_{G6} için domuz karboksipeptidaz B ile de doğrulanmıştır. Sonuç olarak, çalışmada metanolsüz indüksiyonu mümkün kılan bir dizi yeni düzenlenmiş promotör, DNA mikroarrayleri kullanılarak başarıyla tanımlanmıştır.

Liu vd (2014) yapmış oldukları çalışmada yeşil floresan protein (EGFP: Enhanced green fluorescent protein) geninin artan kopyalarını taşıyan maya klonlarından oluşan bir panelde α -faktör sekansı doğrultusunda, EGFP genini ifade ederek protein sekresyonu üzerindeki gen dozaj etkisinin (1-6 kopya) doğrudan tespitini açıklamışlardır. Bunun için maya ekspresyon vektörü pPICZ α A'ya yerleştirdikleri EGFP geniyle elde ettikleri pPICZ α A-EGFP rekombinant plazmitini lineer hale getirerek kompetent *P. pastoris* X-33 hücrelerine transfer etmişlerdir. Doğru transformantları bulabilmek için öncelikle 100 μ g/mL zeosin içeren plaklarda seçilen koloniler PCR ile doğrulanmıştır. Çoklu kopya taşıyan transformantları belirlemek için 1 ve 2 μ g/mL zeosin içeren YPD agar plaklarda seçim yapıp PCR ile doğrulamışlardır. Elde ettikleri transformantlarda kopya sayısı belirlemek amacıyla Real Time PCR yapıp, 1'den 6'ya kadar kopya sayısına sahip kolonileri belirlemişlerdir. Floresan mikroskobu altında doğrudan incelediklerinde, bir kopya ve iki kopyaya sahip hücrelerin kültür ortamına nispeten daha düşük EGFP salgılandığını, üç kopyaya sahip hücrelerin protein salgılamasında önemli iyileşme olduğunu, dört ve beş kopyaya sahip hücrelerin protein salgılama azaldığını görmüşlerdir. Bu sonuçlara göre, 1-4 kopyaya kadar GFP geninin ekspresyonunda artış olduğu, 4 kopya üstünün ise transkripsiyonun azalmasına yol açtığını belirlemişlerdir.

Parashar ve Satyanarayana (2016) yaptıkları çalışmada *P. pastoris* 'te, iki farklı vektör kullanarak karışık kültür ortamında üretim yapmışlardır. İlk olarak pGAPZ α A vektöründen zeosin seçim markırını çıkararak yerine kanamisin seçim markırı koymuşlardır. Elde ettikleri bu vektöre pGAPK α A adını vermişlerdir. İkinci vektör olarak, pPICZ α A vektörünü kullanmışlardır. Bu iki vektöre amilaz (Amy:amylase) ve fitaz (Phy:phytase) enzimlerini üretmek için gerekli genleri yerleştirmişlerdir. Elde ettikleri pPICZ α A-Amy , pGAPK α A-Amy ve pPICZ α A-Phy , pGAPK α A-Phy vektörlerini *P. pastoris* hücrelerine transfer etmişlerdir. Transformasyon sonrası vektörü aldığı doğrulanmış maya hücrelerinde kopya sayısını belirlemek için Real Time PCR yapmışlardır. Daha sonra karışık kültür ortamında protein

üretimi yapmış ve üretimde AOX promotörü kullanıldığı için her 24 saatte bir %0,5 metanolle indüklemişlerdir. AOX-Amy ve AOX-Phy suşlarındaki enzim titrelerinin, yabani tip suşlara göre yaklaşık olarak 13 ve 40 kat daha yüksek olduğunu görmüşlerdir. Ayrıca, Amy GAP-AOX ve Phy-GAP-AOX suşlarında amilaz ve fitazın klonlanması ve ekspresyonunun, AOX-Phy ve AOX-Amy'ye kıyasla amilaz ve fitaz üretiminde 1.8 ve 1.3 kat iyileşmeye yol açtığını görmüşlerdir.

Wang vd (2017) yaptıkları çalışmada P_{AOX1} 'in trans-etkili elemanlarının fonksiyonlarını test ederek ve bunların kombinasyonunu yaparak, içinde üç transkripsiyon baskılayıcısının tanımlandığı, silindiği ve bir transkripsiyon aktivatörünün aşırı eksprese edildiği metanol içermeyen bir P_{AOX1} başlangıç suşunu başarıyla oluşturmuşlardır. Suşun, metilotrofik mayalara kıyasla gliserolde %77 GFP seviyeleri ifade ettiğini görmüşlerdir. Daha sonra, başka bir model olarak, metanol içermeyen yeni bir glikoz-gliserol-kayması ile indüklenen P_{AOX1} kontrolünde insülin öncüsünü (IP) ifade etmişlerdir. 40g/L glikozlu bir üretim fazı, ardından 20g/L'den düşük olmayan ortamda kalan glikozun kontrol edilmesinin, hücre büyümesini desteklemek ve P_{AOX1} 'i baskılamak için uyumlu olduğunu gözlemlemişlerdir. Daha sonra glikoz tüketildikten sonra gliserol indüksiyonunu başlatmışlardır. Buna göre, metanolde büyütülen vahşi tip ile karşılaştırıldığında oksijen tüketiminde ve ısı oluşumunda çarpıcı bir düşüş görmüşler ve 5 L'lik bir biyoreaktörde 2.46 g/L'lik yüksek bir IP üretimi için optimal bir biyoproses belirlemişlerdir.

Chang vd (2018) yaptıkları çalışmada, zayıf bir AOX2 promotörü (P_{AOX2}) tarafından düzenlenen Mxr1'in sentetik bir pozitif geri besleme devresinin eklenmesiyle yeniden programlanmış bir *P. pastoris* oluşturmuşlardır. Bu yeni yaklaşım ile P_{AOX1} 'in gliserol açlığı veya karbon içermeyen koşullar altında indüklenmesini sağlamak için ekstra Mxr1 sağlayarak ve değiştirilebilir Mxr1 ekspresyonu oluşturarak P_{AOX1} verimliliğini arttırmışlardır. Ek olarak, gliserolün P_{AOX1} üzerindeki inhibitör etkisini korumuşlardır. Bu yeniden programlanmış *P. pastoris* suşunun, hem metanol indüksiyonu hem de gliserol açlığı altında yeniden programlanmamış hücrelere göre daha güçlü floresan yoğunluğuna sahip olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, model protein olarak tek zincirli değişken fragman (scFv) kullandıklarında, metanol indüksiyonu ve gliserol açlığı altında Mxr1 ile yeniden programlanmış hücrelerde hücre dışı scFv üretkenliğinde, yeniden programlanmamış hücrede metanol indüksiyonuna göre sırasıyla %98 ve 269'luk artışlar gözlemlemişlerdir.

Unver vd (2018) tarafından yapılan çalışmada telomeraz inhibitörü olan insan PinX1 geninin (hPinX1) *P. pastoris*'te over-ekspresyonunu sağlamışlardır. Bu doğrultuda ilk olarak hPinX1'i pPICZαA vektörüne yerleştirip daha sonra *E. coli* One Shot TOP10 hücrelerinde

klonlayarak pPICZαA-hPinX1 rekombinant vektörünü elde etmişlerdir. Elde edilen rekombinant vektör ile LiCl metodunu kullanarak *P. pastoris* hücrelerinin transformasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Geni alan doğru transformantların seçimi için 100 µg/mL zeosin içeren YPD agar plaklara ekim yaparak gelişen kolonileri PCR ile doğrulamışlardır. Heterolog geni taşıdığı belirlenen koloni ile gerçekleştirilen 48 saatlik üretim sonunda hücre peleti ve kültür süpernatantından yaptıkları western blot analizinde sadece hücre ekstraktında bant gözlemlemişlerdir. Bu proteinin üretimi için yaptıkları süre, metanol konsantrasyonu ve pH optimizasyon çalışmalarında ise üretimin en fazla olduğu süre 48 saat olarak belirlenirken; indüklemeye için gerekli metanol konsantrasyonu ve başlangıç kültür pH'ı ise sırasıyla %3 ve 5,0 olarak belirlenmiştir.

Shirvani vd (2019) yaptıkları çalışmada insan granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktörü (hGM-CSF), doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin çoğalmasında ve farklılaşmasında önemli bir rol oynayan önemli bir farmasötik proteini hGM-CSF'nin hücre dışı ekspresyonu için metanolsüz bir ekspresyon platformu geliştirmişlerdir. Bu doğrultuda gliserol derepresyonu ile rekombinant ekspresyonu düzenleyen FMD promotörünü taşıyan yeni yapılandırılmış ekspresyon vektörü pEP (a) 101 tasarlamışlardır. Optimize edilmiş hGM-CSF geni, pEP (a) 101'e klonlanmış ve *P. pastoris*'e transfer edilmiştir. Üç farklı kültür ortamında rhGM-CSF ekspresyonunu araştırmışlardır. SDS-PAGE ve western blot üzerinde gözlemlenen heterojen glikozilasyon modeline göre glikoproteinlerden, karbonhidrat birimlerini uzaklaştırmak için deglikozile etmişlerdir.

Şensoy Gün (2019) yaptığı çalışmada *P. pastoris* ekspresyon sisteminde sıklıkla kullanılan ve metanolla indüklenebilen AOX (alkol oksidaz) promotörünün kontrolü altında azurin proteininin üretimini gerçekleştirmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* genomik DNA'sını kullanarak amplifiye ettiği ve pPICZαA ekspresyon vektörüne yerleştirdiği azurin genini, *E. coli* One Shot TOP10 hücrelerinde klonlamış ve lineer hale getirdiği rekombinant vektörü, *P. pastoris* X-33 hücrelerine transfer etmiştir. Genomlarında azurin geninin çoklu kopyasını taşıyan kolonilerin seleksiyonu için antibiyotik direnç testi ve koloni PCR yapmış ve seçilen rekombinant transformantların protein üretim kapasitelerini karşılaştırmıştır. Katı besiyerinde 48-72 saat inkübasyona bıraktığı hücreleri, gliserol içeren ön kültür besiyerlerine inoküle edip inkübasyon sonrası santrifüjle çöktürdüğü hücreleri, %0,5 metanol ve %1 sorbitol içeren üretim besiyerlerine aktararak 48 saat boyunca çalkalamalı inkübasyona bırakmıştır. 24 saat sonra kültür ortamlarına promotör indükleyicisi olarak %0,5 metanol ilave etmiştir. İnkübasyon sonrası elde ettiği kültür süpernatantları ve hücre lizatları ile gerçekleştirdiği western blot analizi ile transformantların tümünde rekombinant proteinin hem ekstrasellüler hem de

intraselüler üretimini gözlemlemiştir. Ayrıca her iki üretim tipine göre, 1. koloniyi oluşturan hücrelerin protein üretim kapasitesinin diğer kolonileri oluşturan hücrelerin üretim kapasitesinden daha yüksek olduğunu gözlemlemiştir. Rekombinant *P. pastoris* hücreleri tarafından üretilen ekstraselüler azurin proteininin molekül kütlesinin yaklaşık 20 kDa olduğunu tespit etmiştir.

Acar (2020) yaptığı çalışmada PME enziminin hücre dışı üretilmesi için yapısal promotör olan GAP promotörü kontrolü altında *P. pastoris* ekspresyon sistemi kullanmıştır. Bu amaçla ilk olarak hücre dışı salgılama sinyali olan α -faktör sinyal sekansını pGKB ekspresyon vektörüne yerleştirilerek pGKB α vektörünü elde etmiştir. Daha sonra vektöre yerleştirilmek üzere *Pectobacterium chrysanthemi* PME gen dizisini, pGKB α vektörüne yerleştirmiştir. *E. coli* JM109 hücrelerinde klonlayarak elde ettiği bu rekombinant vektörü (pGKB α -PME), restriksiyon enzimleriyle lineer hale getirip LiCl metodu ile *P. pastoris* hücrelerine transfer etmiştir. Transformasyon sonrası genomlarında PME genini taşıyan doğru maya transformantlarını belirlemek için seçtiği kolonilerden genomik DNA'ları izole edilerek PCR için kullanmıştır. PME genini taşıyan pozitif kolonileri seçerek üretim besiyerine alıp PME enziminin üretimini gerçekleştirmiştir. Elde ettiği proteini konsantre ederek agaroz plak kuyularına yüklemiş ve aktivite zonu oluşumuna bakmıştır. En büyük zon oluşumuna sahip koloniye ait kültür sıvısında SDS-PAGE analizi ile proteinin varlığını belirlemiştir.

MATERYAL ve METOT

Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve markaları Tablo 5’te verildi.

Tablo 5. Kullanılan Cihazlar ve Markaları

KULLANILAN CİHAZLAR	MARKALARI
Buzdolabı (+4 °C ve -20 °C)	Arçelik
Çalkalayıcı inkübatör	IKA KS 3000i ve JSR
Çeker ocak	Tolkim
Floresan spektrofotometre	Agilent
Hassas terazi	Shimadzu-ATX224
Isıtıcıly manyetik karıştırıcı	Heidolph
İnkübatör	Memmert
Jel görüntüleme cihazı	Bio-Rad
Jel blotlama cihazı	Bio-Rad
Kar üretme cihazı	Scotsman
Mikroplaka okuyucu (nanodrop)	BioTek Epoch
Mikroskop	ZEISS
Mikrodalga fırın	Arçelik
Mini santrifüj	IKA mini G
Otoklav	HMC Hirayama
PCR cihazı	Applied Biosystems ProFlex
pH metre	Mettler Toledo
Saf su cihazı	MILLIPORE Direct-Q 8 UV
Soğutmalı santrifüj	Beckman Coulter-Allegria X30R
Soğutmalı sirkülatörlü su banyosu	Vivo iTherm Polyscience
Steril kabin	ESCO
SDS-PAGE sistemi	Bio-Rad
Su banyosu	Memmert
UV görüntüleme cihazı	Bio-Rad Gel Doc™ XR ⁺
UV spektrofotometre	Shimadzu UV 1800
Vorteks	Heidolph
- 86 °C derin dondurucu	Nuaire

Kimyasallar ve Besiyerler

Bu tez çalışmasında kullanılan besiyerler, kitler, DNA, protein markırları, antikorlar ve pektin ile diğer tüm kimyasallar, ThermoFisher Scientific (Invitrogen), Sigma, Merck, Fluka, ChemCruz, Gibco, Intron, Biosynth Carbosynth, Origene, Abcam, Oxoid ve Ampliqon firmalarından tedarik edildi.

Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılan *P. pastoris* X-33 mayası ve One Shot™ TOP10 kompetent *E. coli* bakterisi ThermoFisher Scientific (Invitrogen) firmasından temin edildi. Ayrıca Acar 2020 tarafından yapılan tez çalışmasında genomuna pGKB α -PME vektörü yerleştirilmiş olan rekombinant *P. pastoris* hücreleri (pGKB α -PME/X-33) kullanıldı.

Kullanılan Primerler

Aequorea victoria (denizanası) yeşil floresan proteinine ait (Green Fluorescent Protein; GFP) kodon optimize geni amplifiye etmek üzere Tm Calculator programı (www.thermofisher.com) kullanılarak dizayn edilen forward ve reverse primerler ile vektör DNA'ya ait primerler Tablo 6'da verildi.

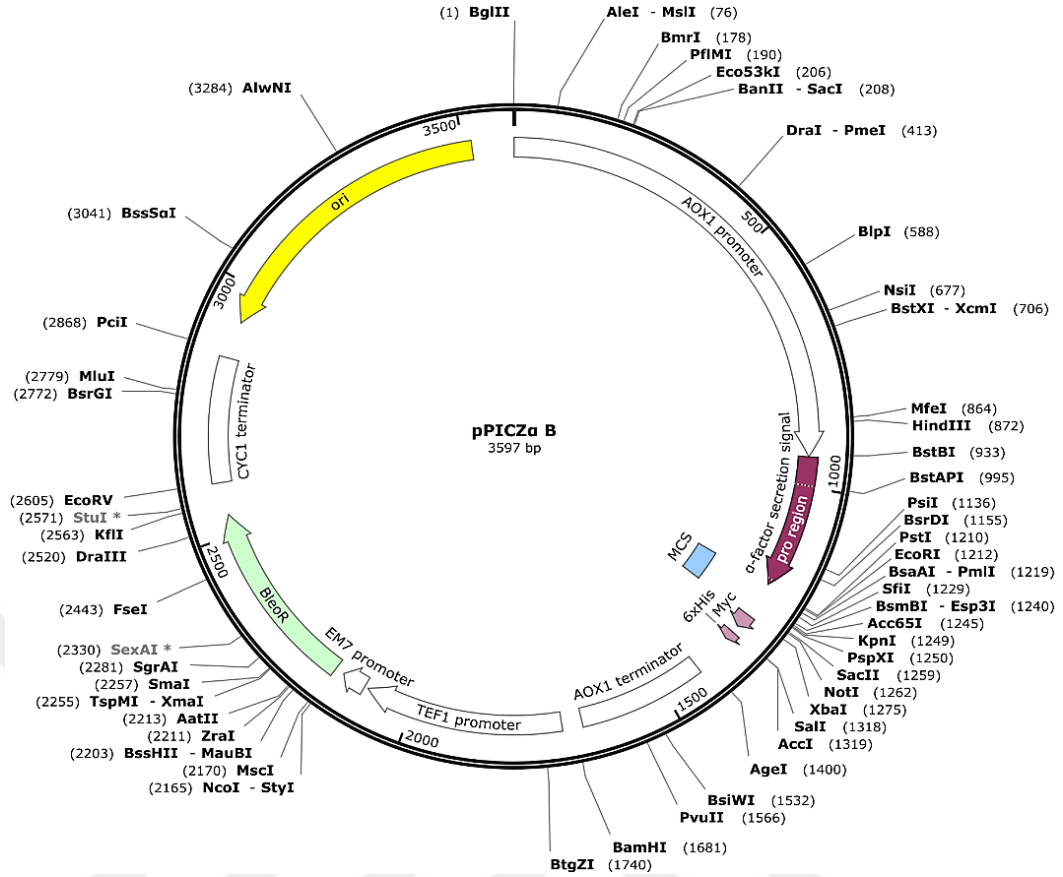
Tablo 6. Çalışmada Kullanılan Primerler

Primer adı	Sekansı	Tm(°C)		%GC	Uzunluk(bç)
		Taq polimeraz	HF polimeraz		
<i>EcoRI</i> -GFP Forward Primer	CGCGAATTCATGTCTAAAGGTGAAGA	57,7	60	42,3	26
<i>KpnI</i> -GFP Reverse Primer	GGGGTACCTTTGTACAATTCATCCAT	57,2	60	42,3	26
5' AOX-F primer	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	59	-	47,6	21
3' AOX-R primer	GCAAATGGCATTCTGACATCC	59	-	47,6	21

*Altı çizili bölgeler enzim tanıma bölgeleri

Çalışmada Kullanılan pPICZ α B vektör DNA'sı

pPICZ α B vektörü, ThermoFisher Scientific (Invitrogen) firmasından temin edildi. Vektörün şekli ve gen haritası Şekil 3 ve Şekil 4'te verildi.



Şekil 3. pPICZαB vektörü (Invitrogen 2012)

- 5' AOX1 promotör; metanolle indüklenir aynı zamanda rekombinant gen ekspresyonunu düzenler.
- α sekresyon sinyal faktörü; üreme ortamına rekombinant proteinin salınmasını sağlar.
- BleoR; antibiyotik bağlayıcı proteini kodlar, bleomisin, fleomisin ve zeosin antibiyotiklerine direnç sağlar.
- PUC orijini (Ori); *E.coli*'de yüksek kopya replikasyonu sağlar.
- Çoklu klonlama bölgesi (MCS); restriksiyon enzimlerinin tanıma sekanslarını içerir.
- AOX1 terminatör bölgesi; etkili transkripsiyon terminasyonu için gerekli bölgedir.
- C-terminal polihistidin (6xHis) kuyruğu; rekombinant proteinin kolay saflaştırılması için gereklidir.

5' end of AOX1 mRNA

811 AACCTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT ACTTTCATAA TTGCGACTGG TTCCAATTGA

871 CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTAAACGA CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT

931 ATTCGAAACG **ATG** AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala

983 TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA
Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala

1034 CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC
Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe

1085 GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe

1136 ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC
Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu

1187 GAG AAA AGA GAG GCT GAA GC **TGCAG** GAATTCAC GTGGCCAG CCGGCCGTC TCGGA
Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala

1243 TCGGTACCTC GAGCCGCGGC' GGCCGCCAGC TTTCTA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu

1300 GAG GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTGTA
Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His ***

1352 GCCTTAGACA TGACTGTTCC TCAGTTCAAG TTGGGCACTT ACGAGAAGAC CGGTCTTGCT

1412 AGATTCTAAT CAAGAGGATG TCAGAATGCC ATTGCTCTGA GAGATGCAGG CTTCATTTT

1472 GATACTTTT TATTTGTAAC CTATATAGTA TAGGATTTT TTGTCTATT TGTTCCTCT

5' AOX1 priming site

3' AOX1 priming site

3' polyadenylation site

α-factor signal sequence

Kex2 signal cleavage

Ste13 signal cleavage

c-myc epitope

polyhistidine tag

Xho I

Asp718 | Kpn I Xho I

Sac II Not I

Pst I EcoRI Pml I Sfi I BsmB I

Xba I

Şekil 4. pPICZαB vektöründe bulunan çoklu klonlama bölgesinin nükleotid sekansı (Invitrogen 2012)

Çalışmada Kullanılan Restriksiyon Endonükleazlar

GFP genini kesmediği belirlenen restriksiyon enzimleri belirlendi (www.restrictionmapper.org). Kullanılan enzimler, tanıma sekansları ve kesim noktaları Tablo 7'de verildi.

Tablo 7. Restriksiyon Endonükleazların Tanıma Sekansları ve Kesim Noktaları

Enzim	Hedef bölge
<i>EcoRI</i>	5'-G [^] AATTC-3'
<i>KpnI</i>	5'-GGTAC [^] C-3'
<i>MssI</i>	5'-GTTT [^] AAAC-3'

Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltilerin Hazırlanışı

E.coli TOP10 hücrelerinin transformasyon işleminin ardından, doğru transformantların seçilmesi ve bakteri hücrelerinin büyütülmesi için zeosin antibiyotiği içeren LS-LB agar ve LB sıvı besiyerleri; rekombinant *E. coli* transformantlarından izole edilen pPICZαB-GFP vektörünün *P. pastoris* hücrelerine transfer edilmesinin ardından maya transformantlarının büyütülmesi için zeosin antibiyotiği içeren YPD (Yeast Pepton Dextrose) agar ve YPD sıvı

besiyerleri; metanol indüksiyonu ve kendinden indüklenebilir sistem ile rekombinant protein üretimi için kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanışı Tablo 8’de verildi.

Tablo 8. Tez Çalışmasında Kullanılan Besiyerler ve Çözeltilerin Hazırlanışı

ÇÖZELTİ VE BESİYER ADI		HAZIRLANIŞI
1.	LS-LB Agar	90 mL saf suya 1 g tripton, 0,5 g NaCl, 0,5 g maya ekstraktı ve 1,5 g agar eklenip çözündürüldü. pH:7,5’e ayarlanıp son hacim 100 mL’ye tamamlanarak otoklavlandı.
2.	LB Sıvı	100 mL saf su içerisine 2,5 g LB Broth eklenerek otoklavlandı.
3.	YPD Agar Besiyeri	5 g YPD broth ve 2 g agar 70 mL saf suda çözündürüldü. Son hacim saf su ile 100 mL’ye tamamlanarak otoklavlandı.
4.	YPD Sıvı	5 g YPD broth 70 mL saf suda çözündürüldü. Son hacim saf su ile 100 mL’ye tamamlanarak otoklavlandı.
5.	BMGY Besiyeri	Besiyer %2 pepton ve %1 maya ekstraktı içerecek şekilde hazırlandı ve otoklavlandı. Daha sonra, %1 gliserol, %1,34 YNB ve 1 M KH_2PO_4 (pH:6) steril filtreden geçirilerek eklendi.
6.	BMMY Besiyeri	Besiyer %2 pepton ve %1 maya ekstraktı içerecek şekilde hazırlandı ve otoklavlandı. Daha sonra, %0,5 metanol, %1,34 YNB ve 1 M KH_2PO_4 (pH:6) steril filtreden geçirilerek eklendi.
7.	Üretim Besiyeri	Besiyer %2 pepton ve %1 maya ekstraktı içerecek şekilde hazırlandı ve otoklavlandı. %1,34 YNB 1 M KH_2PO_4 (pH:6), %1 kazaminoasit ve %1 sorbitol steril filtreden geçirilerek eklendi. Pektin ilave edilecekse; 5 mL, 0,02 mol/L sitrik asit, 0,04 mol/L Na_2HPO_4 (pH:5) hazırlanan çözelti otoklavlandı. Otoklav sonrası hazırlanan çözeltide çözödürülen pektin üretim besiyerine eklendi.
8.	TCA Çözeltisi	3,5 mL saf suda 5 g TCA çözödürüldü. + 4 °C de saklandı.
9.	%10 PER Çözeltisi	0,5 g amonyum persulfat 4,5 mL saf suda çözödürüldü.
10.	2X SDS-PAGE Yükleme Tamponu	0,5 M Tris-HCl (pH:6,8) çözeltisinden 2,5 mL alınıp üzerine 200 µL gliserol (%100), 0,4 µL β-merkaptoetanol, 0,02 g bromofenol blue ve 0,4 g SDS karıştırılıp son hacim steril saf su ile 10 mL’ye tamamlandı. Aliquotlara ayrılarak -20 °C’de saklandı.
11.	1 M Tris/HCl (pH:8,8 veya pH:6,8)	90 mL saf su içerisinde 12,1 g tris çözödürölerek 1 M HCl ile pH:8,8 ve pH:6,8’e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 100 mL’ye tamamlandı.
12.	%30’luk Akrilamid-Bisakrilamid Çözeltisi	12 g akrilamid ve 0,32 g bisakrilamid 27,68 mL saf suda çözödürüldü.
13.	%10’luk SDS	1 g SDS tartılıp 9 mL saf suda çözödürüldü.
14.	1X SDS-PAGE Yürütme Tamponu	1,5 g tris, 7,2 g glisin ve 0,5 g SDS 400 mL saf suya eklenerek çözödürüldü. Son hacim saf su ile 500 mL’ye tamamlandı.
15.	1X TAE Çözeltisi	20 mL 50X TAE çözeltisi 980 mL saf su ile karıştırılarak hazırlandı
16.	%1’lik Agaroze Jel	80 mL 1X TAE içerisine 0,8 g agaroz eklendi. Karışım mikrodalgada eritilip biraz soğutulduktan sonra nükleik asit boyası eklendi ve jel katılaşmaya bırakıldı.

Tablo 8. (Devamı)

17.	10X YNB (Yeast Nitrogen Base)	3,35 g YNB saf su ile 25 mL'de çözündürülüp filtreden geçirilerek hazırlandı. +4 °C'de saklandı.
18.	1 M Potasyum Fosfat (KH₂PO₄) Tamponu	Bir miktar saf su içerisinde 13,6 g KH ₂ PO ₄ çözündürüldü. KOH ile pH:6'ya ayarlanıp son hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı ve otoklavlandı. +4 °C'de saklandı.
19.	10X Transfer Çözeltisi	900 mL saf suya, 58 g tris, 29 g glisin ve 3,7 g SDS eklenip çözündürüldükten sonra pH:8,3'e ayarlandı. Son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.
20.	1X Transfer Çözeltisi	100 mL 10X transfer çözeltisine 700 mL saf su ve 200 mL metanol eklenerek hazırlandı.
21.	1X PBST Çözeltisi	140 mL saf su içerisinde 0,03 g KCl, 1,2 g NaCl, 0,036 g KH ₂ PO ₄ ve 0,213 g Na ₂ HPO ₄ çözündürüldü. Otoklavlandıktan sonra 75 µL Tween-20 eklendi. Son hacim saf su ile 150 mL'ye tamamlandı.
22.	%5 veya %2,5'lik Bloklama Çözeltisi	20 mL 1X PBST çözeltisi içerisinde 1,5 g veya 0,75 g yağsız süt tozu çözündürüldü. Son hacim saf su ile 30 mL'ye tamamlandı.
23.	Tespit Çözeltisi	60 mL saf su, 30 mL %96'lık etanol ve 10 mL asetik asit karıştırılarak hazırlandı.
24.	Redüksiyon Çözeltisi	4,8 g C ₂ H ₃ NaO ₂ , 45 mL etanol ve 80 mL saf su ile karıştırıldı. Asetik asitle pH: 6'ya ayarlandıktan sonra 150 mg sodyum tiyosülfat ve 3 mL glutaraldehit eklendi ve karıştırıldı. Son hacim saf su ile 150 mL'ye tamamlandı.
25.	Boyama Çözeltisi	100 mL saf su, 30 µL formaldehit karıştırıldı. Üzerine 100 mg gümüş nitrat eklenerek çözündürüldü.
26.	Yıkama Çözeltisi 1	270 mL saf su içerisine 120 µL formaldehit ve 3,75 g Na ₂ CO ₃ eklenerek çözündürüldü.
27.	Yıkama Çözeltisi 2	200 mL saf suya 1 mL gliserol ve 12,5 mL asetik asit eklendi. Son hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.
28.	SCED Tamponu	10 mM sodyum sitrat (pH:7,5), 1 M sorbitol, 10 mM EDTA, 10 mM DTT olacak şekilde hazırlandı ve +4 °C'de saklandı.
29.	Zimoliyaz (3 mg/mL stok solüsyon)	3 mg zimoliyaz 900 µL saf suda çözündürüldü. Son hacim saf su ile 1 mL'ye tamamlandı. -20 °C'de saklandı.
30.	Sabitleme Çözeltisi	%50 izopropanol, %10 TCA ve %40 saf su olacak şekilde hazırlandı.
31.	Boyama Çözeltisi	%0,1 Coomassie brilliant blue G-250, %10 asetik asit, %50 metanol ve %40 saf su olacak şekilde hazırlandı.
32.	Yıkama Çözeltisi	%10 asetik asit, %50 metanol ve %40 saf su olacak şekilde hazırlandı.

pPICZαB-GFP Vektörünün Elde Edilmesi

Kodon optimize GFP genine ait sekansın çoğaltılması

Yıldız (2020) tarafından yapılan tez çalışmasında kodon optimizasyonu yapılan GFP geni, Tablo 6'daki gibi dizayn edilen primer ve Tablo 9'da verilen PCR karışımı kullanılarak, Tablo 10'da belirtilen şartlarda amplifiye edildi.

Tablo 9. GFP Geninin PCR İle Amplifikasyonu

PCR Reaksiyon Karışımı	Miktar (μL)
Kalıp DNA (kodon opt. gen)	1,7
dNTP mix (40 mM)	1,6
MgCl ₂ (50mM)	0,3
<i>Eco</i> RI-GFP-F primer (10 pmol/μL)	1
<i>Kpn</i> I-GFP-R primer (10 pmol/μL)	1
5X füzyon HF tamponu	4
ddH ₂ O	10,4
*HF DNA Polimeraz	0,2
Toplam Hacim	20

* Phusion High-Fidelity DNA Polymerase

Tablo 10. PCR Şartları

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

PCR reaksiyonu sonrası elde edilen ürünler %1'lik agaroz jele (Tablo 8) yüklenerek 60V'de 90 dakika yürütüldü. Yürütme işlemi sonrası bantlar UV görüntüleme cihazında görüntülendi.

Elde edilen PCR ürününün saflaştırılması

Jelde yürütülüp doğrulanan PCR ürünü, kesim reaksiyonu öncesi 'MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA Purification Kit' kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırma işleminde ilk olarak PCR ürünü üzerine toplam hacminin 5 katı BNL tamponu eklendi ve vorteksenerek iyice karışması sağlandı. Elde edilen karışım, MEGAquickspin™ kolonuna transfer edilerek

13.000 rpm’de 1 dakika santrifüjlendi. Kolondan inen sıvı uzaklaştırılıp kolona 700 µL yıkama tamponu eklendi. 13.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Kolondan inen yıkama tamponu uzaklaştırıldı ve kolon boş olarak tekrar 13.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolon, steril mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Kolonun merkezine 30 µL elüsyon tamponu konularak 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. İnkübasyon sonrası kolon 13.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Elüsyon tüpündeki DNA’nın konsantrasyonu nanodrop spektrofotometre cihazında ölçüldü.

Saflaştırılan PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi

Kesim enzimlerine ait tanıma sekanslarını taşıyan kodon optimize GFP geni saflaştırıldıktan sonra *EcoRI* ve *KpnI* enzimleri ile kesim reaksiyonu için Tablo 11’de verilen kesim reaksiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 11. GFP Geni Kesim Reaksiyon Karışım İçeriği

Reaksiyon Karışım İçeriği	Miktar (µL)
ddH ₂ O	18
10X Fast Digest tampon	2
PCR ürünü	8 (~200 ng)
Fast Digest <i>EcoRI</i>	1
Fast Digest <i>KpnI</i>	1
Toplam hacim	30

Hazırlanan karışım 37 °C’de 30 dakika inkübe edildikten sonra enzim inaktivasyonu için 5 dakika boyunca 80 °C’de bekletildi. Süre sonunda kesim reaksiyon ürünü fenol-kloroform ile ekstrakte edildi (Yıldız 2020).

Vektör DNA’nın (pPICZaB) restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi

Vektör DNA’nın kesim reaksiyonu için Tablo 12’de verilen karışım hazırlandı. Kesim sonrası vektör DNA’nın 5’ ucundaki fosfat gruplarını uzaklaştırmak için CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) enzimi kullanıldı.

Tablo 12. Vektör DNA Kesim Reaksiyon Karışım İçeriği

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar (µL)
ddH ₂ O	24
10xFast Digest tampon	2
Vektör DNA	2 (~1 µg)
Fast Digest <i>EcoRI</i>	1
Fast Digest <i>KpnI</i>	1
Toplam Hacim	30

Hazırlanan karışım, 37 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 80 °C’de 5 dakika enzimin inaktivasyonunu gerçekleştirilip, 1µL CIAP ilave edilerek 50 °C’de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon sonucu vektör DNA’nın lineer hale getirilip getirilmediğini teyit etmek için %1’lik agaroz jele yüklendi. Yüklenen örnekler, 80 V’de 45 dakika yürütüldü.

Vektör DNA’nın jelden ekstraksiyonu

Kesim reaksiyonu sonrası agaroz jele yüklenip yürütülen örnekler, jelden ekstrakte edildi. Vektör DNA’nın jelden ekstraksiyonu için PureLink® Quick Gel Extraction Kit kullanıldı. Özetle; jelde yürütülen DNA, kesilerek jelden alındı ve bant ağırlığının 3 hacmi kadar jel çözme tamponu (L3) eklenerek 50 °C’de 10 dakika inkübe edildi. Jel tam olarak çözündükten sonra inkübasyona 50 °C’de 5 dakika daha devam edildi. İnkübasyon sonrası 1 jel hacmi kadar izopropanol eklendi ve karıştırıldı. Elde edilen karışım kolona yüklendi ve 14.000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi. Kolondan inen sıvı uzaklaştırıldı. Kolona 500 µL yıkama tamponu (W1) eklenerek 14.000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi. Kolondan inen sıvı uzaklaştırıldı. Kolon boş olarak maksimum hızda (20.000 x g) 2 dakika santrifüj edildi. Kolon yeni bir steril tüpe yerleştirilip, kolonun merkezine 50 µL elüsyon tamponu (E5) eklendi. 14.000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi. Elüe edilen DNA’nın konsantrasyonu nanodrop spektrofotometrede ölçüldü.

Ligasyon reaksiyonu

Vektöre yerleştirilecek (insört) gen ve vektör DNA (pPICZαB), aynı restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra Tablo 13’te verilen ligasyon reaksiyon karışımına ilave edilerek reaksiyon, 16 °C’de 16 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

Tablo 13. Ligasyon Reaksiyonu

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar (µL)
10X ligasyon tamponu	4
İnsört DNA	3,1 (140 ng)
Kesilmiş vektör DNA	10,5 (67 ng)
T4 DNA ligaz	1,5
ddH ₂ O	1,5
Toplam hacim	20,6

***E. coli* One Shot TOP10 Hücrelerinin Transformasyonu**

Elde edilen ligasyon ürününün bakteri hücrelerine transfer edilmesi için kompetent olan bakteriler -80 °C'den alınarak buz üzerinde çözündürüldü. Çözünen hücrelerin 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 42 °C'de 30 saniye bekletildi. Süre sonunda, 42 °C'den alınarak buz üzerinde 2 dakika bekletildi. Daha sonra tüpe steril ortamda önceden ısıtılan SOC besiyerinden 250 µL ilave edildi. Kapağı sıkıca kapatılarak çalkalamalı inkübatörde, 225 rpm'de 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Önceden ısıtılmış LS-LB zeosin agara, transformasyon karışımından 100-200 µL yayılarak 37°C'de gece boyunca inkübe edildi (Invitrogen 2012).

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

Inkübasyon sonrası gelişen antibiyotik direncine sahip kolonilerden rastgele 15 tanesi seçildi. Seçilen koloniler ve GFP genine spesifik primerler ile PCR yapıldı (Kaymak 2008). Elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütüldü ve UV görüntüleme cihazında görüntülendi. Koloni PCR için reaksiyon karışım içeriği ve PCR şartları Tablo 14 ve Tablo 15'te verildi. Reaksiyon sonucu elde edilen ürünler, agaroz jele yüklenerek 80 V'de 30 dakika yürütüldü ve görüntülendi.

Tablo 14. Koloni PCR İçin Kullanılan Karışım İçeriği

PCR karışım içeriği	Miktar (µL)
dNTP mix (10 mM)	0,8
MgCl ₂ (50 mM)	1
<i>Eco</i> RI-GFP-F primer / 5' AOX-F primer	1
<i>Kpn</i> I-GFP-R primer / 3' AOX-R primer	1
10xPCR tamponu	1
ddH ₂ O	6,6
Taq DNA polimeraz	0,6
Toplam hacim	12

Tablo 15. Koloni PCR Şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
1	94	10
35	94	1
	56/59	1
	72	1
	72	5
1	4	∞

GFP genine ait primerlerle yapılan koloni PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntülemesi sonucu seçilen koloniler (7, 10, 12, 14, 15) kullanılarak vektör primerleri ile PCR yapıldı. Reaksiyon sonucu elde edilen ürünler agaroz jele yüklenerek, 80 V'de 45 dakika yürütüldü ve UV görüntüleme cihazında görüntülendi.

Muhtemel rekombinant vektörün sekans analizi ile doğrulanması

pPICZαB vektör DNA'sına yerleştirilen sekansın doğruluğunu kontrol etmek için seçilen koloniler LB sıvı besiyerlerinde çoğaltıldı. Plazmitler 'PureLink-Hi-Pure plazmit DNA saflaştırma kiti' (Invitrogen) kullanılarak saflaştırıldı.

Özet olarak saflaştırma işlemi şu şekilde yapıldı. 37 °C'de 150 rpm'de gece boyu inkübe edilen 7. koloniyi oluşturan bakteri kültüründen steril mikrosantrifüj tüpüne 4,5 mL alındı. Alınan kültür sıvısı 4.000 x g'de 8 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peletine 0,4 mL RNaz'lı resüspansiyon tamponu ilave edildi. Karışım süspanse edilerek homojen yapıldı. Üzerine 0,4 mL lizis tamponu ilave edilen lizat karışımı, yavaşça alt üst edilerek homojen olunca oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası üzerine 0,4 mL presipitasyon tamponu ilave edilip tüp alt-üst edilerek homojen oluncaya kadar karıştırıldı. Elde edilen lizat 16.000 x g'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant önceden dengelenen kolonlara yüklendi. Yükleme sonrası kolondaki solüsyonun akıp kuruması beklendi. Kolon 2,5 mL yıkama tamponu ile iki kez yıkandı. Kolondaki tamponun akması beklendi. Altta toplanan sıvılar döküldü. Steril elüsyon tüpünü kolonun altına yerleştirilip 0,9 mL elüsyon tamponu eklenerek solüsyonun akması ve kuruması beklendi. Sıvı aktıktan sonra kolon uzaklaştırılarak elüsyon tüpüne 0,63 mL izopropanol eklenerek karıştırıldı. Tüp 16.000 x g'de, 4 °C'de, 30 dakika santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırıldı. DNA içeren pelete 1 mL %70'lik etanol eklenip süspanse edildikten sonra 16.000 x g'de 4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. 10 dakika süreyle oda sıcaklığında kurutulan DNA peleti, 50 µL nükleaz içermeyen suda süspanse edildi. Saflaştırılan vektör DNA konsantrasyonları nanodrop spektrofotometrede ölçüldü. Saflaştırılarak elde edilen vektörün

çift yönlü Sanger sekans analizi yaptırıldı. Diğer yandan, Şensoy Gün (2019) tarafından yapılan tez çalışmasında elde edilen rekombinant pPICZαA-Azu vektör DNA'sı da yukarıda tarif edilen şekilde stoktan alınan bakteri hücrelerinden saflaştırıldı.

pPICZαB-GFP Rekombinant Vektörünün *P. pastoris*'e Transfer Edilmesi

pPICZαB-GFP rekombinant vektörün lineer hale getirilmesi

Bakteri hücrelerinden saflaştırılan rekombinant vektörler (pPICZαB-GFP ve pPICZαA-Azu), *MssI* (*PmeI*) enzimi ile kesim reaksiyonuna bırakılarak lineer hale getirildi (Şensoy Gün 2019).

***P. pastoris* hücrelerinin transformasyonu**

P. pastoris X-33 hücreleri ve Acar (2020) tarafından yapılan tez çalışmasında elde edilen ve genomlarında *Pectobacterium chrysanthemi* pektin metilesteraz (PME) genini taşıyan *P. pastoris* X-33 hücreleri (pGKBα-PME/X-33) YPD agar besiyerine ekilerek 30°C'de 48 saat boyunca büyümeye bırakıldı. Büyüyen mayalardan YPD sıvı besiyerlerine tek koloni alınarak inoküle edildi ve hücreler LiCl ile kompetent hale getirildi. Kompetent hücrelerin transformasyon işlemi, LiCl metodu ile gerçekleştirildi (Acar 2020). Transformasyon işlemleri sırasında lineer pPICZαB-GFP ve pPICZαA-Azu rekombinant vektörleri, *P. pastoris* X-33 ve pGKBα-PME/X-33 hücrelerine ayrı ayrı transfer edildi. *P. pastoris* pPICZαA-Azu/X-33 hücreleri ise stoktan temin edildi (Şensoy Gün 2019).

***P. pastoris* transformantlarından genomik DNA (gDNA) izolasyonu**

Transformasyon sonrası antibiyotiğe dirençli pPICZαB-GFP ve pGKBα-PME+ pPICZαB-GFP rekombinant vektörlerini taşıyan *P. pastoris* kolonilerinden rastgele 7'şer tane, seçilip 100 µg/mL zeosin içeren YPD agara çizildi. İnkübasyon sonrası gelişen kolonileri oluşturan hücrelerden genomik DNA'lar izole edildi. 'GeneJET Genomic DNA Purification Kit' (Thermo Scientific™) kiti kullanılarak gerçekleştirilen gDNA izolasyon işleminde seçilen her koloniye ait transforme maya hücreleri YPD sıvı besiyerine inoküle edilip, 30 °C'de 150 rpm'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda OD₆₀₀ değeri 0,8-1,0'e ulaşan kültürlerden 1'er mL mikrosantrifüj tüplerine alınarak maksimum hızda (≥12.000 x g) 10 saniye santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peletine 500 µL SCED tamponu (Tablo 8) eklenerek hücreler süspanse edildi ve hücrelerin üzerine 66 µL zimoliyaz (3 mg/mL) ve cam boncuk (425-600 µm) eklenerek vortekslendi. 1 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilen hücreler 15 dakikada bir vortekslendi. Daha sonra 3.000 x g'de 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pelete 180 µL parçalama solüsyonu eklenip süspanse edildi ve üzerine 20 µL

proteinase K solüsyonu eklendi. Karışım iyice homojen oluncaya kadar vortekslendikten sonra 56 °C’de 45 dakika inkübasyona bırakıldı ve ara ara vortekslendi. Üzerine 20 µL RNase A Solüsyonu eklenerek iyice vortekslendi ve karışım 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Karışımın üzerine 200 µL lizis solüsyonu eklendi ve homojen oluncaya kadar 15 saniye boyunca iyice vortekslendi. Karışım üzerine 400 µL %50’lik etanol eklenip vortekslendi. Elde edilen lizat karışımı kolona yüklendi. 1 dakika 6.000 x g’de santrifüj edildi. Atık içeren tüp atılarak kolon yeni bir tüpe yerleştirildi. Kolona 500 µL yıkama tamponu I eklenerek 1 dakika 8.000 x g’de santrifüjlendi. Tüpteki atık uzaklaştırılarak kolon aynı tüpe tekrar yerleştirildi. Kolona 500 µL yıkama tamponu II eklenerek 3 dakika maksimum hızda ($\geq 12.000 \times g$) santrifüjlendi. Tüpteki atık uzaklaştırılarak kolon aynı toplama tüpüne tekrar yerleştirildi. Kolon boş olarak maksimum hızda 1 dakika santrifüjlendi. Kolon yeni bir steril mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Kolonun merkezine 80 µL elüsyon tamponu eklendi ve 1 dakika 8.000 x g’de santrifüjlendi. Elüe edilen gDNA’ların konsantrasyonları nanodrop spektrofotometrede ölçüldü.

PCR

İzole edilen gDNA’ların kalıp DNA olarak kullanıldığı iki farklı PCR gerçekleştirildi. Bu reaksiyonlarda 5’AOX-F ve *KpnI*-GFP-R primerleri ile *EcoRI*-GFP-F ve *KpnI*-GFP-R primerleri kullanıldı. Reaksiyon karışım içeriği ve şartları Tablo 16 ve Tablo 17’de verildi. Ayrıca PGKBa-PME+pPICZαA-Azu rekombinant vektörünü taşıyan 5 maya kolonisiyle de Tablo 14’te verilen reaksiyon karışımı, Tablo 15’deki şartlar ve vektöre spesifik primerler (5’AOX-F ve 3’AOX-R) kullanılarak koloni PCR yapıldı.

Tablo 16. PCR Karışım İçeriği

PCR karışım içeriği	Miktar (µL)
Kalıp DNA	x (40 ng)
dNTP mix (10 mM)	1
5’AOX-F primer / <i>EcoRI</i> -GFP-F primer	1
<i>KpnI</i> -GFP-R primer / <i>KpnI</i> -GFP-R primer	1
10x Amonyum tamponu	1,2
ddH ₂ O	hacmi 15 µL’ye tamamlayacak miktar
Taq DNA Polimeraz	0,6
Toplam hacim	15

Tablo 17. PCR Şartları

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

Maya transformantlarının antibiyotik ile seçilimi

PCR sonucu genomlarında rekombinant vektörleri (pPICZαB-GFP ve pPICZαA-Azu) taşıdıkları belirlenen mayalardan yüksek dozda antibiyotiğe dirençli transformantların belirlenmesi için seçim yapıldı. Bunun için YPD agar besiyerinde 48 saat boyunca inkübasyona bırakılan mayalar inkübasyon sonrası YPD sıvı besiyerine transfer edildi ve hücreler 30°C’de bir gece çalkalamalı inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kültür sıvılarından 3’er µL alınarak önceden hazırlanan 1 mg/mL ve 2 mg/mL konsantrasyonlarda zeosin antibiyotiği içeren YPD agar plaklarına transfer edildi. Plaklar, 30°C’de inkübasyona bırakıldı. 72 saat sonra plakların fotoğrafları çekildi.

İndüklenebilir Sistem ile GFP Ekspresyonunun Gerçekleştirilmesi

pPICZαB-GFP için yüksek dozda antibiyotiğe dirençli olduğu belirlenen maya transformantlarının üç tanesi (G2, G3 ve G4) seçilerek rekombinant protein üretimleri karşılaştırıldı. Üretim için öncelikle YPD agar plaklarda 48 saat boyunca büyütülen pPICZαB-GFP ve pPICZαB vektörlerini taşıyan rekombinant *P. pastoris* kolonileri özeyle toplanarak 12,5 mL BMGY ön yetiştirme besiyerine alındı. 30 °C’de, 225 rpm’de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültür sıvıları 5.000 x g’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası maya hücreleri steril saf suyla yıkanarak tekrar 5.000 x g’de 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra hücreler, %1 kazaminoasit ve %1 sorbitol içeren BMMY üretim besiyerine (25 mL) transfer edilerek, 30 °C’de, 280 rpm’de 144 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sırasında kültür ortamına her 24 saatte bir %0,5 saf metanol ilave edildi ve her 24 saatte bir örnek toplandı.

SDS-PAGE Analizi

Üretime alınan G2, G3 ve G4 kolonilerini oluşturan hücrelerin rekombinant protein üretim kapasitelerini karşılaştırmak için SDS-PAGE analizi yapıldı. Bunun için toplanan kültür

sıvıları Amicon (Milipore) filtre ile 20 kat konsantre edildi. Ayrıca GFP genini içermeyen boş vektör (pPICZαB) taşıyan hücrelerin kültür sıvısı da kontrol olarak kullanıldı. Bu işlem için ilk olarak elektroforez plakaları ve aparatları temizlendi ve jel hazırlama aparatına konuldu. Cam plakalar arasına pipetle hazırlanan ayırma jeli döküldü. Ayırma jeli: 2500 µL 1M Tris-HCl (pH:8,8), 2200 µL akrilamid bisakrilamid, 100 µL %10'luk SDS, 65 µL TEMED, 1565 µL saf su ve 35 µL %10'luk PER karıştırılarak hazırlandı. Dökülen jelin üzerine izopropanol ilave edildi. Ayırma jeli polimerleşip, izopropanol uzaklaştırıldıktan sonra polimerleşen jelin üzerine yığma jeli döküldü. Yığma jeli: 220 µL 1 M Tris-HCl (pH:6,8), 400 µL akrilamid-bisakrilamid, 15 µL %10'luk SDS, 15 µL TEMED, 1225 µL saf su ve 20 µL %10'luk PER karıştırılarak hazırlandı. Yığma jeline tarak yerleştirildi. Jel polimerleştikten sonra sonra tarak çıkarılarak cam plakalar elektroforez tankına konuldu. Üzerine yürütme tamponu ilave edildi. Hazırlanan örnekler jel kuyularına 15'er µL olacak şekilde yüklendi. Örnekler önce 60 V'de 30 dakika, daha sonra 120 V'de 60 dakika oda sıcaklığında yürütüldü (Laemli 1970). Örnekler yürütüldükten sonra cam plakalar arasındaki jel çıkarılarak Coomassie brilliant blue G-250 ile boyama aşamasına geçildi. Boyama için öncelikle jel, sabitleştirme çözeltisi'ne alınarak 45 dakika yavaşça çalkalandı. Süre sonunda jel, boyama çözeltisi'ne alınarak gece boyu çalkalanarak boyandı. Boyamadan işleminden sonra yıkama çözeltisi'ne alınan jel 2 saat boyunca çalkalanarak yıkandı. Daha sonra saf su ile yıkanarak görüntüleme cihazı ile görüntülendi (Acar 2020) (Kullanılan çözeltiler Tablo 8'de verildi).

Küçük Ölçekli GFP Üretimi

Genomunda pPICZαB-GFP vektörünü taşıyan 3.koloniye oluşturan maya hücreleri (G3) tarafından üretilen rekombinant GFP'nin floresan yoğunluğunu belirlemek için küçük ölçekli üretimi yapıldı. Üretim için öncelikle hücreler YPD agar plakta 48 saat boyunca büyütüldü. Daha sonra hücreler özeyle toplanarak 12,5 mL BMGY ön yetiştirme besiyerine alındı. 30°C'de, 225 rpm'de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültür sıvıları 5.000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası steril saf suyla maya hücreleri yıkanarak tekrar 5.000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücreler, 1 mL BMMY'de süspanse edildi. Elde edilen süspansiyonun 100 µL'si U tabanlı 1,5 cm çapındaki cam tüplerde hazırlanan %1 kazaminoasit ve %1 sorbitol içeren 1300 µL BMMY üretim besiyerine inoküle edilerek, 30 °C'de, 280 rpm'de çalkamalı inkübasyona bırakıldı. Kontrol olarak pPICZαB vektörlerini taşıyan maya hücreleri kullanıldı. İnkübasyon sırasında kültür ortamına 24 saatte bir %0,5 saf metanol ilave edildi ve her 24 saatte bir örnek toplandı. Örnek alma işlemine 144. saate kadar devam edildi. Santrifüjleme sonrası elde edilen kültür sıvıları steril saf su ile 5 mL'ye tamamlanıp 20 kat konsantre edildi. Farklı inkübasyon sürelerinde rekombinant olarak üretilen GFP'nin floresan

yoğunluklarını karşılaştırmak amacıyla, 100 µL konsantre kültür sıvısı 100 µL %30'luk glikoz-fosfat tamponuyla karıştırıldı. Tampon kısaca şu şekilde hazırlandı; 15 mL 10 mM potasyum fosfat (dibazik) hazırlandı. Üzerine toplam hacmin %30'u glikoz olacak şekilde 6 gr D-glikoz eklenerek çözündürüldü. pH:6'ya ayarlandıktan sonra son hacim 20 mL'ye tamamlandı (Penna vd 2005). Kör olarak boş vektör taşıyan hücre kültür sıvısı kullanıldı. Hazırlanan karışımların floresan spektrofotometrede (uyarma dalga boyu; Ex, 475 nm; emisyon filtresi; Em, 510 nm) ölçümü yapıldı. Diğer yandan konsantre edilen kültür sıvıları, SDS-PAGE analizinde gümüş boyama ile görüntülendi.

SDS-PAGE analizi ve gümüş boyama

Daha önce anlatıldığı gibi SDS-PAGE jeli hazırlandı. Hazırlanan numunelerden jel kuyularına 15 µl yüklendi ve 60 V'de 30 dakika ardından 120 V'de 60 dakika oda sıcaklığında yürütüldü. Süre sonunda cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Çıkarılan jel, tespit çözeltisi'ne alınarak 30 dakika yavaşça çalkalandı. Süre sonunda redüksiyon çözeltisi'ne alınıp 30 dakika çalkalandıktan sonra jel 3 kez saf su ile 5 dakika çalkalanarak yıkandı. Daha sonra boyama çözeltisi'ne alınarak 20 dakika çalkalanmaya bırakıldı. Boyamadan işlemi sonrası jel 2 kere saf su ile yıkanarak yıkama-1 çözeltisi'ne alındı. Standart protein bantları görününceye kadar yavaşça çalkalandı. Bantlar görüldükten sonra yıkama-2 çözeltisi'ne alınarak zemin rengi açılıncaya kadar bekletildi. İşlem sonrası saf su içerisine alınan jel görüntülendi (Ünver 2014) (Kullanılan çözeltiler Tablo 8'de verildi). Boyama sonrası jel fotoğrafı kullanılarak hesaplanan Rf değerlerine dayanarak logMK-Rf standart grafiği çizildi.

Kendinden İndüklenebilir Sistem ile GFP Ekspresyonunun Gerçekleştirilmesi

Kendinden indüklenebilir sistem ile GFP ekspresyonunu gerçekleştirmek için 2 mg/mL zeosin antibiyotikğine direnç gösteren pGKB α -PME+pPICZ α B-GFP/X-33 hücreleri (1.koloniye oluşturan: PG1) farklı konsantrasyonlarda pektin (citrus) içeren üretim besiyerinde üretime alındı. Bu işlem için ilk olarak YPD agar besiyerinde 48 saat boyunca yetiştirilen hücreler, ön kültür için hazırlanan 25 mL'lik BMGY besiyerine inoküle edilerek gece boyu 30 °C'de, 225 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültür sıvısı 5.000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası maya hücreleri steril saf suyla yıkanarak tekrar 5.000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edilen hücreler, üretim besiyerine (25 mL) inoküle edildi ve gece boyu inkübasyona bırakıldı. Daha sonra üretim ortamlarına %0,4 ve %0,6 pektin ilave edildi. (Hücrelerin üretim besiyerine inokülasyonu sonrası 30 °C'de, 280 rpm'de 240 saat boyunca inkübasyon devam ettirildi). İnkübasyonun 120. saatinde ortama %1 kazamino asit ilave edildi. Kontrol olarak, PG1 kolonisini oluşturan hücreler pektin içermeyen %1 kazaminoasit ve %1

sorbitol içeren BMMY üretim besiyerinde (25 mL) inkübasyona bırakıldı ve her 24 saatte bir %0,5 metanolle indüklendi. Üretim ortamına pektin ilave edildikten 10 saat sonra kültür ortamlarından hücreler (200 mg) toplandı. Alınan hücreler ile hazırlanan lizatlar western blot analizinde kullanıldı. Diğer taraftan 120., 168. ve 240. saatte alınan örnekler, kültür ortamında metanol varlığının tespiti, GFP floresan yoğunluklarının belirlenmesi ve SDS-PAGE analizi için kullanıldı.

Western blot Analizi

Hücre lizatının hazırlanması

Üretim besiyerinde başlatılan inkübasyondan 10 saat sonra PG1 kolonisini oluşturan hücrelerin farklı pektin konsantrasyonlarını içeren ve metanolle indüklenen kültür ortamlarından toplanan hücreler (yaş ağırlık, 200 mg) parçalandı. Parçalama işlemi için öncelikle 50 mM NaH₂PO₄, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA ve %5 gliserol (pH:7,4) karıştırılarak parçalama tamponu hazırlandı. Hazırlanan tampondan hücre peletleri üzerine 400'er µL eklendi. Toplam hacmi iki katına çıkaracak kadar cam boncuk ilave edilerek 8 kere 30 saniye vortekslenip 30 saniye buzda bekletildi. İşlem sonrası tüpler, 13.000 rpm'de 5 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatantlar yeni steril ependorf tüplere alındı. Elde edilen hücre lizatlarının 15 µL'si eşit hacimde SDS-PAGE jel yükleme tamponuyla karıştırıldı. 5 dakika 95 °C'de bekletildi. Daha sonra 15 µL örnek jele yüklenerek western blot analizi yapıldı.

Blotlama

Eşit miktarda alınan hücre lizat örnekleri, daha önce anlatıldığı gibi SDS-PAGE jelinde yürütüldü ve western blot analizi yapıldı. Bu işlem için; yürütülen jel, 1X transfer tamponu'nda 5 dakika bekletildi. PVDF membran, jel boyutunda kesildikten sonra öncelikle saf metanol ile 5 dakika boyunca çalkalandı. Süre sonunda metanol dökülerek 1X transfer tamponu eklendi. Bu tamponda da membran 5 dakika boyunca çalkalandı. Süre sonunda Semidry Blotlama cihazına sırası ile 2 parça blot kağıdı, nitroselüloz membran, jel ve 2 parça blot kağıdı konuldu. Ardından cihaz kapatılarak 25 Watt elektriksel alanda 7 dakika blotlama işlemi yapıldı. Süre sonunda membran alınıp, membranın ön yüzüne 10 mL bloklama tamponu (%2,5'lik süt tozu) eklenerek 1 saat oda sıcaklığında çalkalamaya bırakıldı. Çalkalama sonrası membran, 20 mL PBST (pH:7,2) ile 2 kez 5 dakika çalkalayıcıda yıkandı. Yıkama sonrası bloklama tamponuna 1:3000 oranında 'Alcohol Oxidase rabbit polyclonal antibody' (OriGene Technologies Inc., Rockville, MD, USA) ilave edildi. Membran antikör içeren tamponda 1 gece +4 °C'de inkübe edildi. Süre sonunda membran PBST ile yavaşça çalkalanarak 3 kez 5 dakika yıkandı. Bloklama tamponuna 1:5000 oranında ikinci antikör olarak HRP bağlı Goat Anti-Rabbit IgG eklendi.

Membran konjuge antikor içeren tamponla muamele edilerek 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda PBST tamponuyla 6 kez 5 dakika çalkalayıcıda yıkandı. Daha sonra membran, Femto ve Pico substratları (ECL reagent) ile antikorun kimyasal sinyal oluşturmaya sağlanarak görüntülendi (Budak 2009).

GC-MS Analiziyle Metanol Varlığının Belirlenmesi

GC-MS analiziyle metanol varlığını belirlemek için, %0,4 ve %0,6 pektin içeren üretim besiyerlerinde 240 saate kadar yapılan üretim sırasında kültür ortamlarından 120. ve 240. saatlerde alınan 1'er mL'lik kültür sıvıları kullanıldı. Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM)'nde uzman yardımı ile gerçekleştirilen GC-MS analizinde polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) sabit fazına sahip fiber kullanıldı. Fiber, vial içerisinde 1 mL'lik kültür sıvısıyla beraber 70 °C'de 10 dakika bekletildi. Süre sonunda karışımda buharlaşan moleküller fiber uca bağlandı. Fiber uca bağlanan bu moleküller enjeksiyon kısmında analiz edildi. Enjeksiyon için kolon fırın sıcaklığı 35 °C, enjeksiyon sıcaklığı 220 °C'ye ayarlandı ve enjeksiyon modu, 'split' olarak seçildi. Flow kontrol modu ise 'çizgisel hız' (linear velocity) olarak ayarlandı. Basınç 47,7 kPa, total flow 24 mL/dakika, kolon flowu 1 mL/dakika, çizgisel hız 36 cm/saniye, tahliye akışı (purge flow) 3 mL/dakika ve split oranı 20'ye ayarlandı. Fırın sıcaklık programı şu şekilde ayarlandı; 35 °C'de 5 dakika bekle daha sonra dakikada 10 °C artarak 100 °C'ye çık ve 1,5 dakika bekle. Molekül kütlesini belirlemek için başlangıç zamanı 0 dakika, bitiş zamanı 13 dakika ve veri toplama modu (ACQ) SIM olarak ayarlandı. Ch1-m/v 32, Ch2-m/v 31 ve Ch3-m/v 29 olarak ayarlandı.

GFP Floresan Yoğunluğunun Belirlenmesi

GFP floresan yoğunluğunun belirlenmesi için 120., 168. ve 240. saatte toplanıp konsantre edilen kültür sıvıları %30'luk glikoz-fosfat tamponuyla karıştırıldı. Hazırlanan örneklerde GFP floresan yoğunluğunun belirlenmesi için floresan spektrofotometrede (uyarma dalga boyu; Ex, 475 nm; emisyon filtresi; Em, 510 nm) ölçüm yapıldı. Elde edilen sonuçlar kullanılarak OriginPro 8.5 yazılımı ile grafik elde edildi. Tek yönlü ANOVA ile analiz edilerek tüm verilerin ortalama $\pm$ standart hata olarak sunuldu. P değerleri <0.05 anlamlı olarak kabul edildi. İstatistiksel olarak önemli değişiklikler '*' sembolü ile gösterildi.

SDS-PAGE Analizi ve Gümüş Boyama

%0,4 ve %0,6 pektin içeren üretim besiyerinde 240 saate kadar yapılan üretim sırasında kültür ortamından 120., 168., ve 240. saatlerde alınan kültür sıvıları 16 kat konsantre edildi ve

protein bantları daha önce anlatıldığı gibi SDS-PAGE analizi ve gümüş boyama ile görüntülendi. Burada boyama öncesi farklı olarak, jele yüklenen örneklerle birlikte bulunan pektinin veya pektinin PME ile de-esterifikasyonu sonucu oluşan ürünlerin uzaklaştırılması için jel, 10 mM KH_2PO_4 tamponu ile (pH:8) 45 dakika boyunca yıkandı. Daha sonra gümüş boyama ile boyanan jel görüntülendi.

Kendinden İndüklenebilir Sistem İle Azurin Ekspresyonunun Gerçekleştirilmesi

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen kendinden indüklenebilir sistem ile rekombinant GFP üretiminin yanı sıra rekombinant azurin protein üretiminin de gerçekleştirilebilirliğinin gösterilmesi için 1mg/mL zeosin antibiyotigine direnç gösteren pGKB α -PME+pPICZ α A-Azu/X-33 hücreleri, YPD agar besiyerinde 48 saat boyunca yetiştirildi. Hücreler ön kültür için hazırlanan 12,5 mL'lik BMGY besiyerine inoküle edilerek gece boyu 30 °C'de, 225 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültür sıvısı 5.000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası maya hücreleri steril saf suyla yıkanarak tekrar 5.000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjle toplanan hücrelerin yarısı üretim besiyerine (25 mL) inoküle edildi. Gece boyu üretim besiyerinde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra %0,4 pektin üretim besiyerine eklendi ve hücreler pektin içeren üretim besiyerinde 240 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sırasında 120. saatte üretim besiyerlerine %1 kazaminoasit eklendi. Kontrol olarak, santrifüjle toplanan hücrelerin diğer yarısı, pektin içermeyen %1 kazaminoasit ve %1 sorbitol içeren BMMY besiyerine (25 mL) inoküle edildi. Her 24 saatte bir %0,5 metanol ile indüklenen hücreler 240 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sırasında 120. saatte ortama %1 kazaminoasit eklendi. Daha sonra 120., 168. ve 240. saatte toplanan kültür sıvıları 16 kat konsantre edilerek western blot analizi yapıldı.

Western blot Analizi

Daha önce western blot analizi ve blotlama kısmında anlatıldığı gibi aynı işlemler yapıldı. Burada blotlama öncesi farklı olarak, jele yüklenen örneklerle birlikte bulunan pektinin veya pektinin PME ile de-esterifikasyonu sonucu oluşan ürünlerin uzaklaştırılması için jel, 10 mM KH_2PO_4 tamponu ile (pH:8) 45 dakika boyunca yıkandı. Yıkanan jel PVDF membrana blotlandı. Daha sonra bloklama tamponuna (%5'lik süt tozu) ilk antikor olarak 1:5000 oranında Anti-Azurin antikor (SICGEN) ilave edildi. Membran tamponla muamele edilerek +4 °C'de 1 gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası membran 20 mL PBST ile 2 kere 5 dakika çalkalanarak yıkandı. Süre sonunda bloklama tamponuna 1:5000 oranında Anti-Goat IgG H&L (HRP) ikinci antikor eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı.

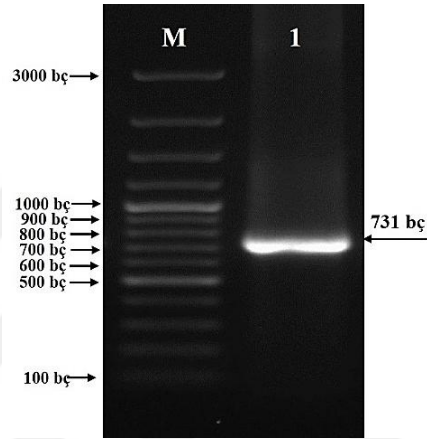
İnkübasyon sonrası membran PBST ile 6 kere 5'er dakika çalkalanarak yıkandı. Membran, Femto ve Pico substratlar (ECL reagent) ile görüntülendi (Budak 2009).



ARAŞTIRMA BULGULARI

Kodon Optimize GFP Geninin PCR ile Amplifikasyonu

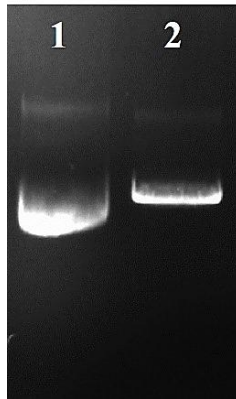
Kodon optimize GFP geninin Phusion High-Fidelity (HF) DNA Polimeraz enzimi ile amplifikasyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrası elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde 60 V'de 90 dakika yürütülerek UV görüntüleme cihazında görüntülendi (Şekil 5). Görüntüleme sonucunda GFP geni için beklenen boyutta bant (731 bç) görüldü.



Şekil 5. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır, 1. kuyu: GFP genine ait PCR ürünü)

GFP Geninin ve pPICZαB Vektör DNA'nın Kesilmesi ve Görüntülenmesi

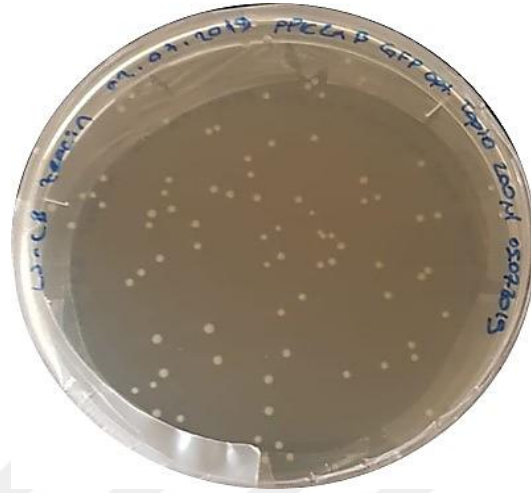
PCR sonucu elde edilen GFP geni saflaştırılarak *EcoRI* ve *KpnI* enzimleri ile kesildi. Vektör DNA'da aynı enzimlerle kesildi. Elde edilen ürünler, agaroz jele yüklenerek 80 V'de 45 dakika yürütüldü ve görüntülendi (Şekil 6). Görüntüleme sonrası vektör DNA'nın kesildiği doğrulandı.



Şekil 6. Kesilmiş vektör DNA'nın agaroz jel elektroforez görüntüsü (1. ve 2. kuyular: sırasıyla; kesilmemiş pPICZαB ve kesilmiş pPICZαB)

***E. coli* TOP10 Hücrelerinin Transformasyonu**

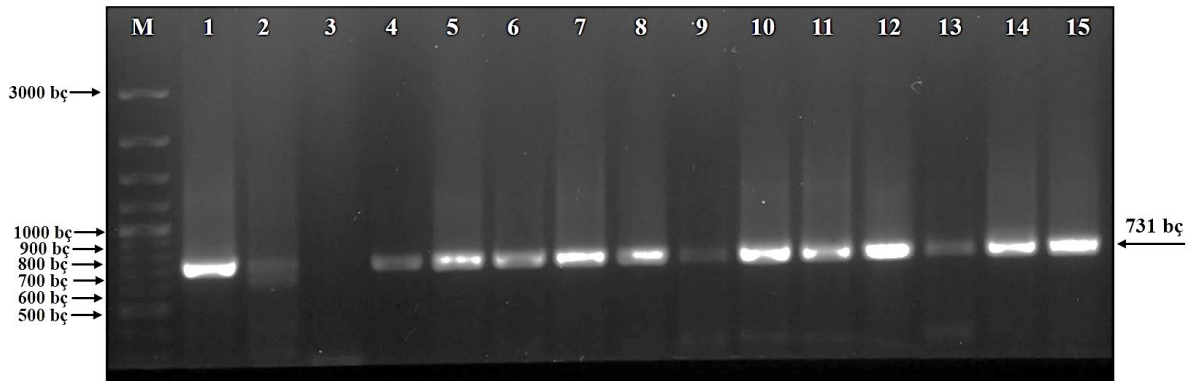
Gen ve vektör DNA'nın kesim işleminin ardından yapılan ligasyon reaksiyonu sonrası elde edilen ürün, kompetent *E. coli* TOP10 hücrelerine transfer edildi. Transformasyon sonrası LS-LB zeosin agar besiyerine yayılan hücreler, 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı ve kolonilerin gelişimi gözlemlendi (Şekil 7).



Şekil 7. LS-LB zeosin agarda inkübasyon sonrası gelişen koloniler

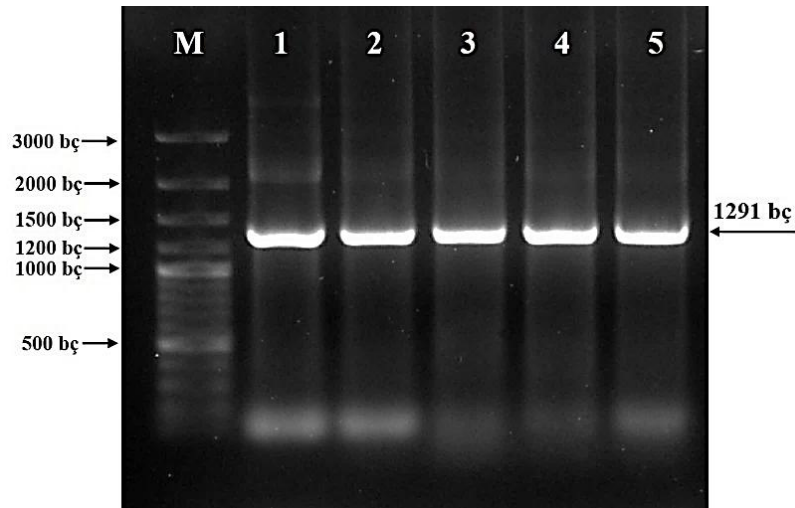
Geni Taşıyan Doğru Transformantların Koloni PCR ile Seçimi

Transformasyon sonrası besiyerinde gelişen kolonilerden 15 tanesi ile gene spesifik primerler kullanılarak koloni PCR yapıldı. Reaksiyon sonucu elde edilen ürünler, agaroz jel elektroforezinde 80 V'de 30 dakika yürütülerek görüntülendi (Şekil 8).



Şekil 8. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır, 1.-15. kuyular: sırasıyla; 1'den 15'e kadar seçilen kolonilere ait PCR ürünleri)

Elde edilen PCR sonucuna göre seçilen 7, 10, 12, 14 ve 15 numaralı koloniler ile vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak PCR yapıldı. PCR sonrası ürünler agaroz jele yüklendi, 80V'de 45 dakika yürütülerek görüntülendi. Görüntüleme sonucu beklediği gibi 1291 bp uzunluğunda bant görüldü (Şekil 9). Böylece seçilen bütün kolonilerin muhtemel rekombinant vektörü taşıdığı tespit edildi.



Şekil 9. Vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak yapılan koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır, 1.-5. kuyular: sırasıyla; 7., 10., 12., 14. ve 15. kolonilere ait PCR ürünleri)

Muhtemel Rekombinant Vektörün Sekans Analizi İle Doğrulanması

Yapılan klonlamanın doğruluğunu kontrol etmek için 7. koloniyi oluşturan hücreler 10 mL LB sıvı besiyerine transfer edilerek çoğaltıldı. Çoğalan bakteri hücrelerinden plazmit saflaştırıldı. Saflaştırılan plazmite ait nükleotid sekansı, vektöre ait forward ve revers primerler ile blastlandığında (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) benzerliklerin %100 olduğu görüldü (Şekil 10 ve Şekil 11). pPICZαB-GFP olarak adlandırılan rekombinant vektörün şekli Şekil 12'de verildi.

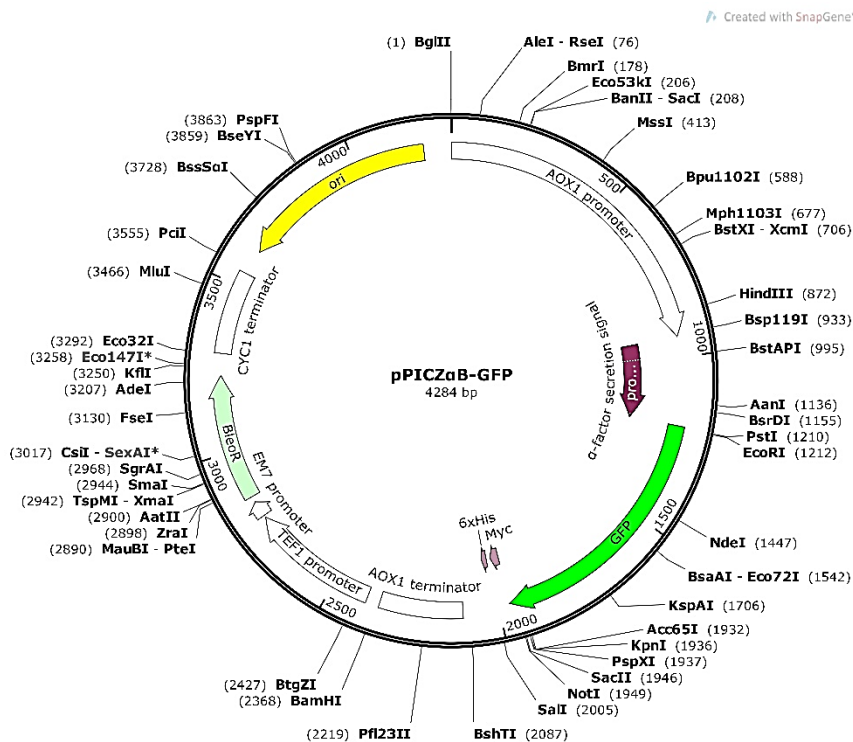
Download		Graphics	
Sequence ID: Query_17309		Length: 1524	
Number of Matches: 1			
Range 1: 329 to 1042		Graphics	
Score	Expect	Identities	Gaps
1319 bits(714)	0.0	714/714(100%)	0/714(0%)
Strand	Plus/Plus		
Query 1	ATGTC TAAAGGTGAAGAATTGTTCACTGGTGTGTTTCCAAATTTGGTTGAATTGGATGGT	60	
Sbjct 329	ATGTC TAAAGGTGAAGAATTGTTCACTGGTGTGTTTCCAAATTTGGTTGAATTGGATGGT	388	
Query 61	GATGTTAATGGTCAAAAATTCTCTGTTTCTGGTGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGT	120	
Sbjct 389	GATGTTAATGGTCAAAAATTCTCTGTTTCTGGTGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGT	448	
Query 121	AAATTGACCTTGAAATTTATTTGCACTACTGGTAAGTTGCCTGTTCCATGGCCAACATTG	180	
Sbjct 449	AAATTGACCTTGAAATTTATTTGCACTACTGGTAAGTTGCCTGTTCCATGGCCAACATTG	508	
Query 181	GT TACTACTTTCTCTTATGGTGTTCATGCTTTTCTAGATACCCAGATCATATGAAACAG	240	
Sbjct 509	GT TACTACTTTCTCTTATGGTGTTCATGCTTTTCTAGATACCCAGATCATATGAAACAG	568	
Query 241	CATGAC TTTTCAAGTCTGCCATGCCGGAAGGTTATGTTCAAGGAAAGAACTATATTTTAC	300	
Sbjct 569	CATGAC TTTTCAAGTCTGCCATGCCGGAAGGTTATGTTCAAGGAAAGAACTATATTTTAC	628	
Query 301	AAAGATGACGGTAACTACAAGACACGTGCTGAAGTTAAGTTTGAAGGTGATACCTTGGTT	360	
Sbjct 629	AAAGATGACGGTAACTACAAGACACGTGCTGAAGTTAAGTTTGAAGGTGATACCTTGGTT	688	
Query 361	AATAGAATCGAGTTGAAAGGTTATGATTTTAAAGAAGATGGTAACATTTGGGTGACAAA	420	
Sbjct 689	AATAGAATCGAGTTGAAAGGTTATGATTTTAAAGAAGATGGTAACATTTGGGTGACAAA	748	
Query 421	ATGGAATACAAC TATAACTCTCATAATGTTTACATCATGGCAGACAAAACAAAGAAATGGT	480	
Sbjct 749	ATGGAATACAAC TATAACTCTCATAATGTTTACATCATGGCAGACAAAACAAAGAAATGGT	808	
Query 481	ATCAAAGTTAACTTCAAATTTAGACACAAACATTAAAGATGGTTCTGTTCAATTGGCAGAC	540	
Sbjct 809	ATCAAAGTTAACTTCAAATTTAGACACAAACATTAAAGATGGTTCTGTTCAATTGGCAGAC	868	
Query 541	CATTATCAACAAATACTCCAATTGGTGATGGTCTGTTTGTGTCAGACAAACATTAC	600	
Sbjct 869	CATTATCAACAAATACTCCAATTGGTGATGGTCTGTTTGTGTCAGACAAACATTAC	928	
Query 601	TTGCTACACAATCTGCCTTGTCTAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGATCACATGATCTTG	660	
Sbjct 929	TTGCTACACAATCTGCCTTGTCTAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGATCACATGATCTTG	988	
Query 661	TTGGAGTTTGTACAGCTGCTGGTATTACACATGGTATGGATGAATTGTACAAA	714	
Sbjct 989	TTGGAGTTTGTACAGCTGCTGGTATTACACATGGTATGGATGAATTGTACAAA	1042	

Şekil 10. Vektör DNA'ya ait forward primer ile gerçekleştirilen sekans analizi ile kodon optimize GFP genine ait nükleotid dizisinin blast sonucu (Query: Sorgulanan nükleotid dizisi Sbjct: Kodon optimize nükleotid dizisi)

▼ [Next Match](#) ▲ [F](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1319 bits(714)	0.0	714/714(100%)	0/714(0%)	Plus/Minus	
Query 1	ATGTCTAAAGGTGAAGAAT	TGTTCACTGGTGT	TGTTCCAAATTTGGTTGAAT	TGGATGGT	68
Sbjct 880	ATGTCTAAAGGTGAAGAAT	TGTTCACTGGTGT	TGTTCCAAATTTGGTTGAAT	TGGATGGT	821
Query 61	GATGTTAATGGTCAAAAAATCTCTGTTTCTGGTGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGT				120
Sbjct 820	GATGTTAATGGTCAAAAAATCTCTGTTTCTGGTGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGT				761
Query 121	AAATTGACCTTGAATAATTTATTTGCACTACTGGTAAGTTGCCGTGTTCATGGCCAAACATTTG				180
Sbjct 760	AAATTGACCTTGAATAATTTATTTGCACTACTGGTAAGTTGCCGTGTTCATGGCCAAACATTTG				701
Query 181	GTTACTACTTTTCTCTATGGTGTTCGAATGCTTTTCTAGATACCCAGATCATATGAAACAG				240
Sbjct 700	GTTACTACTTTTCTCTATGGTGTTCGAATGCTTTTCTAGATACCCAGATCATATGAAACAG				641
Query 241	CATGACTTTTTCAAGTCTGCCATGCCCGAAGGTTATGTTCAAGGAAAGAACATATATTTTAC				300
Sbjct 640	CATGACTTTTTCAAGTCTGCCATGCCCGAAGGTTATGTTCAAGGAAAGAACATATATTTTAC				581
Query 301	AAAGATGACGGTAACTACAAGACAGTGCTGAAGTTAAGTTGAAGGTGATACCTTGGTT				360
Sbjct 580	AAAGATGACGGTAACTACAAGACAGTGCTGAAGTTAAGTTGAAGGTGATACCTTGGTT				521
Query 361	AATAGAATCGAGTTGAAAGGTTATGATTTTAAAGAAGATGGTAACATTTTGGGTACAAAA				420
Sbjct 520	AATAGAATCGAGTTGAAAGGTTATGATTTTAAAGAAGATGGTAACATTTTGGGTACAAAA				461
Query 421	ATGGAATACAACATATAACTCTCATAATGTTTACATCATGGCAGACAAACCAAAGAAATGGT				480
Sbjct 460	ATGGAATACAACATATAACTCTCATAATGTTTACATCATGGCAGACAAACCAAAGAAATGGT				401
Query 481	ATCAAAGTTAACTTCAAAATTAGACACAACATTAAAGATGGTCTGTTCATTTGGCAGAC				540
Sbjct 400	ATCAAAGTTAACTTCAAAATTAGACACAACATTAAAGATGGTCTGTTCATTTGGCAGAC				341
Query 541	CATTATCAACAAAATACTCCAATTTGGTGATGGTCTGTTTGTGTTGCCAGACAACATTAC				600
Sbjct 340	CATTATCAACAAAATACTCCAATTTGGTGATGGTCTGTTTGTGTTGCCAGACAACATTAC				281
Query 601	TTGTCTACACAATCTGCCTTGCTTAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGATCACATGATCTTG				660
Sbjct 280	TTGTCTACACAATCTGCCTTGCTTAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGATCACATGATCTTG				221
Query 661	TTGGAGTTTGTTCACAGCTGCTGGTATTACACATGGTATGGATGAATTTGTACAAA				714
Sbjct 220	TTGGAGTTTGTTCACAGCTGCTGGTATTACACATGGTATGGATGAATTTGTACAAA				167

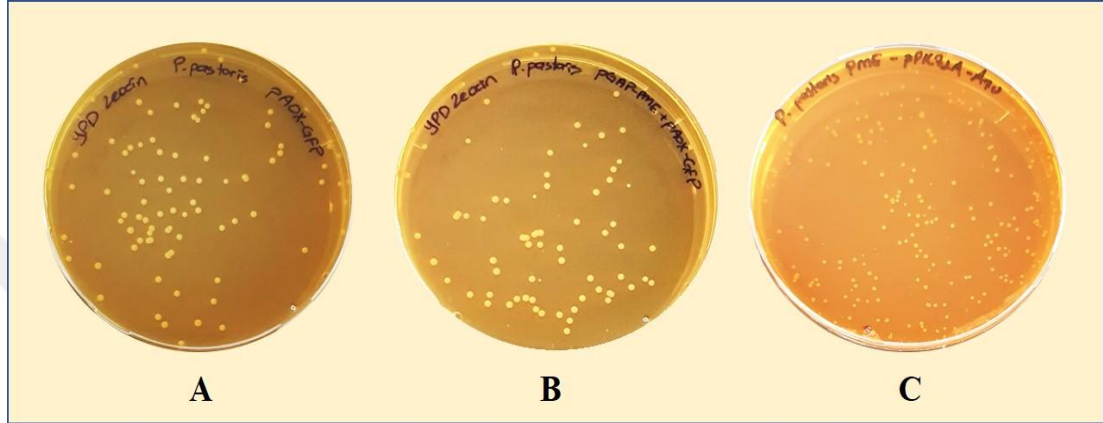
Şekil 11. Vektör DNA'ya ait reverse primer ile gerçekleştirilen sekans analizi ile kodon optimize GFP genine ait nükleotid dizisinin blast sonucu (Query: Sorgulanan nükleotid dizisi
Sbjct: Kodon optimize nükleotid dizisi)



Şekil 12. pPICZ α B-GFP vektörü

***P. pastoris* Hücrelerinin Transformasyonu ve Doğru Transformantların Tespiti**

P. pastoris X-33 ve genomunda pGKB α -PME rekombinant vektörünü taşıyan *P. pastoris* hücrelerinin (pGKB α -PME/X-33) transformasyonu için, saf olarak elde edilen pPICZ α B-GFP, ve pPICZ α A-Azu, *MssI* (*PmeI*) enzimi kullanılarak kesildi ve elde edilen lineer DNA'lar LiCl metodu ile *P. pastoris* X-33 ve pGKB α -PME/X-33 hücrelerine transfer edildi. Transformasyon işleminden 4 saat sonra hücreler 100 μ g/mL zeosin içeren YPD agar plaklara yayıldı. 48 saatlik inkübasyondan sonra kolonilerin gelişimi gözlemlendi (Şekil 13).



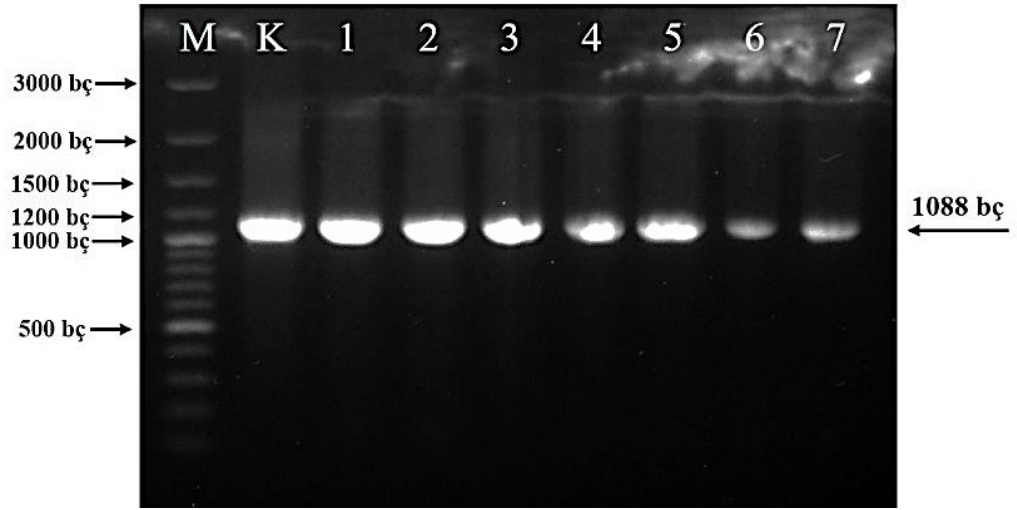
Şekil 13. Transformasyon sonrası gelişen maya kolonilerinin görüntüsü (A: pPICZ α B-GFP, B: pGKB α -PME+pPICZ α B-GFP, C: pGKB α -PME+ pPICZ α A-Azu ile transforme edilen hücreler)

***P. pastoris* Hücrelerinin Seçilimi ve gDNA İzolasyonu**

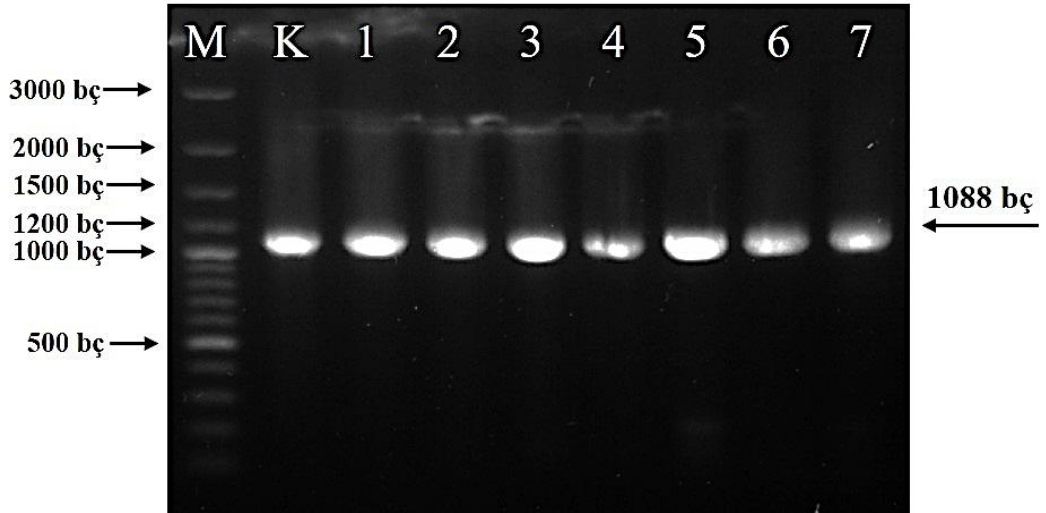
pPICZ α B-GFP ile transforme edilen ve pGKB α -PME/X-33 hücrelerine ait rastgele seçilen 7'şer koloni YPD-zeosin içeren plaklara transfer edildi. Büyüyen kolonilerden genomik DNA izole edildi. Elüe edilen gDNA'lar agaroz jele yüklenerek 60V'de 70 dakika yürütüldü. Yürütme işlemi sonrası jel UV görüntüleme cihazında görüntülendi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonları

İzole edilen gDNA'lar kalıp olarak kullanıldığı, Tablo 16'daki karışım içeriğinde ve Tablo 17'de verilen reaksiyon şartlarında çapraz PCR gerçekleştirildi. PCR sonunda elde edilen ürünler, agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Görüntüleme sonucunda kolonilerde beklenen boyutta bant (1088bp) görüldü (Şekil 14 ve Şekil 15).

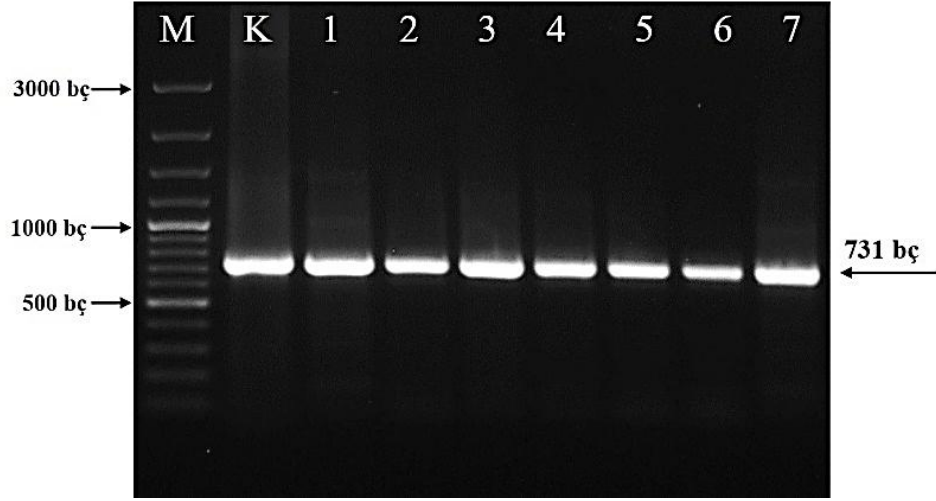


Şekil 14. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M:Markır, K: Kontrol (pPICZ α B-GFP vektörü), 1.-7. kuyular: sırasıyla; pPICZ α B-GFP rekombinant vektörü ile transforme edilen 1-7 no'lu kolonilerine ait gDNA'lar ile gerçekleştirilen PCR ürünleri)

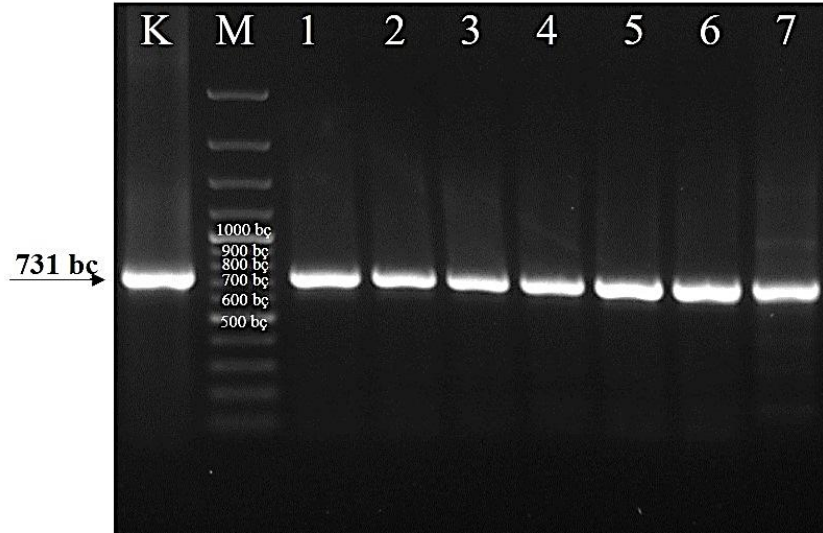


Şekil 15. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır, K: Kontrol (pPICZ α B-GFP vektörü) 1.-7. kuyular: sırasıyla; pPICZ α B-GFP ile transforme edilen 1.-7 no'lu pGKB α -PME/X-33 kolonilerine ait gDNA'lar ile gerçekleştirilen PCR ürünleri)

Elde edilen çapraz PCR sonrası ikinci bir doğrulama için gDNA'lar kalıp olarak kullanılarak, gen (GFP) primerleriyle PCR gerçekleştirildi. PCR sonrası elde edilen ürünler agaroz jele yüklendi ve yürütülerek UV görüntüleme cihazında görüntüsü alındı. Görüntüleme sonrası beklenen yerde bant (731bp) görüldü (Şekil 16 ve Şekil 17).

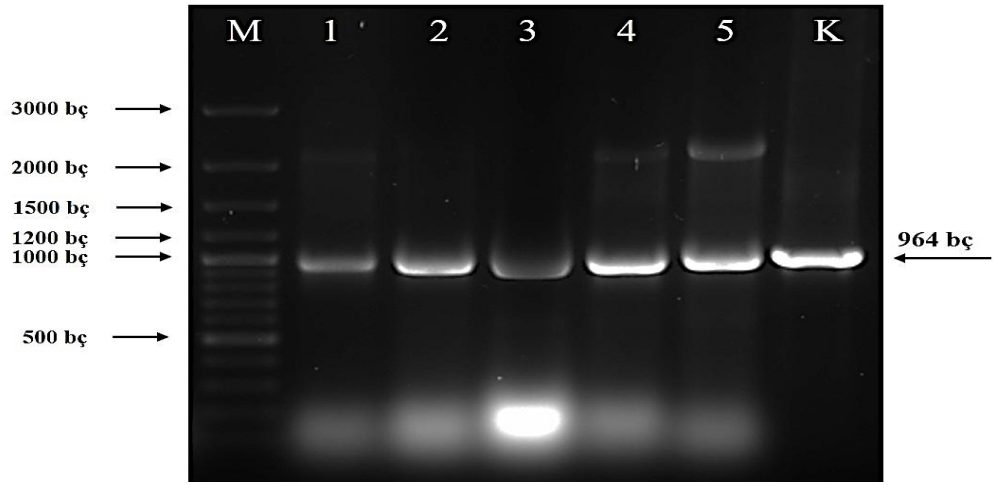


Şekil 16. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır, K: Kontrol sentetik DNA (GFP), 1.ve 7. kuyular: sırasıyla; pPICZ α B-GFP ile transforme edilen *P. pastoris* X-33 1.-7. no'lu kolonilere ait gDNA'lar ile gerçekleştirilen PCR ürünleri)



Şekil 17. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (K: Kontrol sentetik DNA (GFP), M: Markır, 1. ve 7. kuyular: sırasıyla; pPICZ α B-GFP ile transforme edilen PGK β α -PME/X-33 1.-7. no'lu kolonilere ait gDNA'lar ile gerçekleştirilen PCR ürünleri)

pPICZ α A-Azu ile transforme edilen PGK β α -PME/X-33 hücrelerinin oluşturduğu antibiyotiğe dayanıklı kolonilerden rastgele 5 tanesi seçilerek vektöre ait primerler ile koloni PCR yapıldı. PCR sonrası ürünler agaroz jele yüklendi. 60 V'de 90 dakika yürütüldü ve UV görüntüleme cihazında görüntülendi. Görüntüleme sonrası beklenen yerde (964 bp) bant görüldü (Şekil 18).

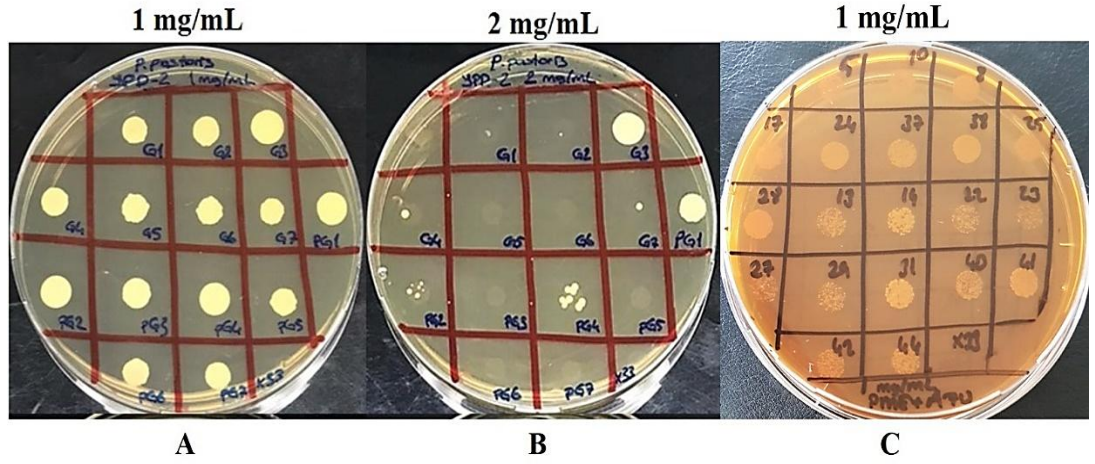


Şekil 18. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır, 1.-5. kuyular: sırasıyla; 8., 10., 17., 24. ve 38. numaralı pPICZαA-Azu ile transforme edilen pGKBα-PME/X-33 kolonilerine ait PCR ürünleri, K: Kontrol (pPICZαA-Azu vektörü))

Yapılan PCR ve görüntülemeler sonucu genomlarında pPICZαB-GFP DNA'sını taşıyan *P. pastoris* X-33 hücreleri, “pPICZαB-GFP/X-33”, genomlarında pPICZαB-GFP ve pGKBα-PME DNA'sını taşıyan *P. pastoris* hücreleri “pGKBα-PME+pPICZαB-GFP/X-33, genomlarında pPICZαA-Azu ve pGKBα-PME DNA'sını taşıyan *P. pastoris* hücreleri ise “pGKBα-PME+pPICZαA-Azu/X-33” olarak adlandırıldı.

Maya Transformantlarının Antibiyotik ile Seçilimi

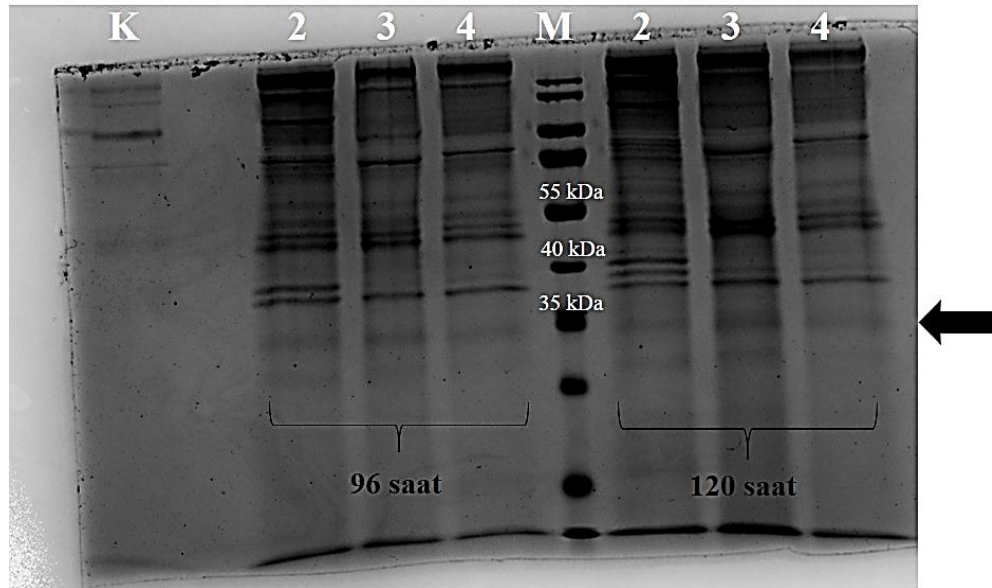
PCR sonrasında genomlarında rekombinant vektörleri taşıdığı belirlenen her üç hücre tipi (pPICZαB-GFP/X-33, pGKBα-PME+pPICZαB-GFP/X-33 ve pGKBαPME+pPICZαA-Azu/X-33) antibiyotiğe dirençli transformantların tespiti için 1mg/L ve 2mg/L zeosin antibiyotiği içeren YPD agara transfer edildi. İnkübasyona bırakılan mayaların 72. saatte antibiyotikli ortamda gelişimleri gözlemlendi (Şekil 19). Bu aşamada farklı pPICZαB-GFP/X-33 kolonilerinin isimleri sırasıyla G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7 ve pGKBα-PME+pPICZαB-GFP/X-33 kolonilerinin isimleri ise sırasıyla PG1, PG2, PG3, PG4, PG5, PG6, PG7 olarak kısaltıldı.



Şekil 19. İnkübasyon sonrası gelişen mayalar (A ve B: G1-G7: pPICZαB-GFP/X-33 1.-7. koloniler PG1-PG7: pGKBα-PME+pPICZαB-GFP/X-33 1.-7. koloniler, C: pGKBα-PME+pPICZαA-Azu/X-33 kolonileri)

SDS PAGE Analizi

G2, G3 ve G4 hücreleri rekombinant protein üretim kapasitelerinin karşılaştırılması için SDS-PAGE analizi yapıldı. Üretim besiyerinde 120 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası elde edilen kültür sıvıları konsantre edilerek SDS-PAGE analizi için eşit miktarda jele yüklendi. SDS-PAGE elektroforezinde yürütülen örnekler, Coomassie brilliant blue G-250 ile boyanarak görüntülendi (Şekil 20). Görüntüye bakıldığında özellikle 120 saatlik inkübasyon sonrası G3 kolonisinin diğer kolonilere göre rekombinant proteinini kültür ortamına daha fazla salgıladığı görüldü.

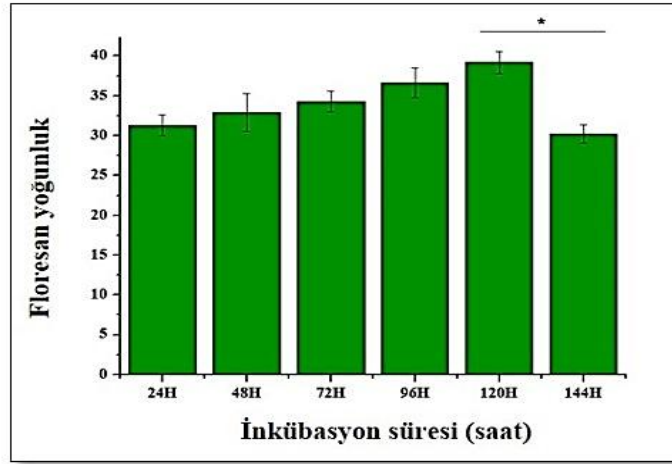
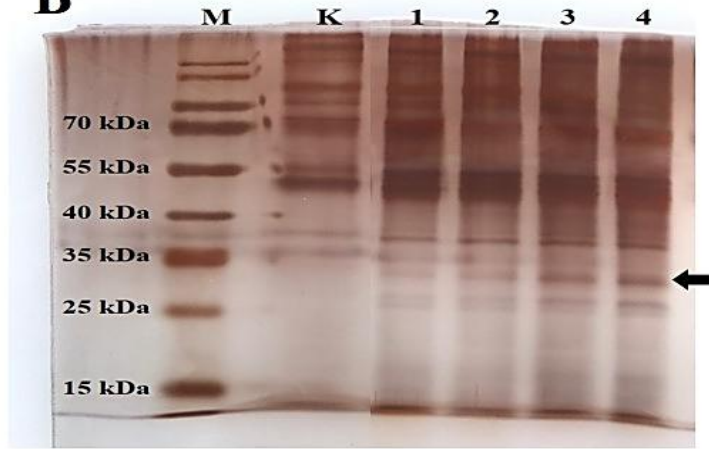
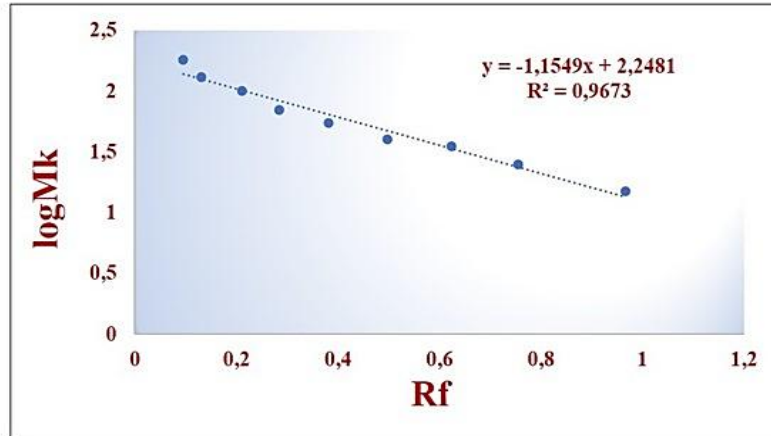


Şekil 20. Ekstrasellüler rekombinant proteinin SDS-PAGE analizi (K: Kontrol (pPICZαA/X-33) 2, 3 ve 4. kuyular: sırasıyla; pPICZαB-GFP/X-33 2., 3. ve 4. koloni, M: Markır)

Küçük Ölçekli Rekombinant Protein Üretimi

Coommassie brilliant blue G-250 ile boyanarak sonuçları alınan ve genomunda pPICZαB-GFP vektörünü taşıyan 3. koloniyi oluşturan maya hücreleri (G3) ile rekombinant GFP'nin floresan yoğunluğunu belirlemek için küçük ölçekli üretimi yapıldı. Üretim 144 saat boyunca devam etti. Kontrol olarak pPICZαB vektörünü içeren hücrelerle üretim yapıldı. İnkübasyon sırasında kültür ortamlarına 24 saatte bir %0,5 saf metanol ilave edildi ve her 24 saatte bir örnek toplandı. Konsantre edilen kültür sıvıları %30'luk glikoz-fosfat tamponuyla karıştırılarak saatlere göre GFP floresan yoğunluğu, floresan spektrofotometrede ölçülerek belirlendi (Şekil 21 A). Daha sonra konsantre kültür sıvıları eşit miktarlarda jele yüklenerek SDS-PAGE elektroforezinde yürütüldü. Jel, gümüş boyama yapılarak görüntülendi (Şekil 21 B).



A**B****C**

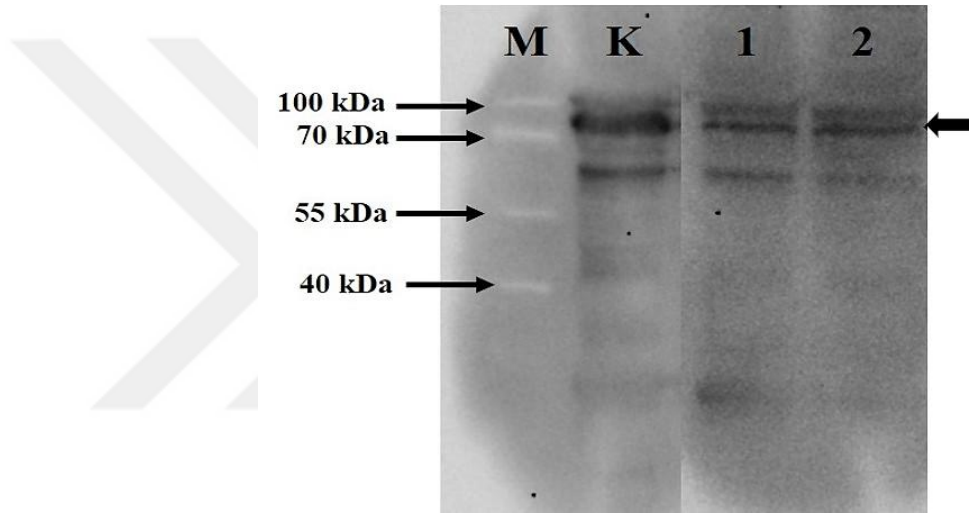
Şekil 21. Rekombinant GFP üretimi (A: Farklı inkübasyon sürelerine ait GFP floresan yoğunluğu, B: Gümüş boyama sonrası jel görüntüsü, (M: Markır, K: Kontrol (pPICZαB/X-33), 1.ve 4. kuyular: sırasıyla; 72., 96., 120., 144. saatte toplanıp konsantre edilen kültür sıvıları, C: logMk/Rf grafiği)

Floresan spektrofotometrede GFP floresan yoğunluğunun belirlenmesi ve SDS-PAGE ile jelin gümüş boyanarak görüntülenmesi sonucunda rekombinant proteinin en iyi salgılandığı saatin 120. saat olduğu belirlendi. Gümüş boyanan jel fotoğrafı kullanılarak standart proteinin

Rf değeri hesaplandı ve logMK-Rf standart grafiği çizildi (Şekil 21 C). Grafik çizildikten sonra proteinin Rf değerleri de hesaplandı. Rekombinant GFP'nin molekül kütlelerinin yaklaşık 33 kDa olduğu belirlendi (Şekil 21 C).

Pektin içeren Ortamda *P. pastoris* İkili Promotör Sistemi Tarafından GFP Üretimi

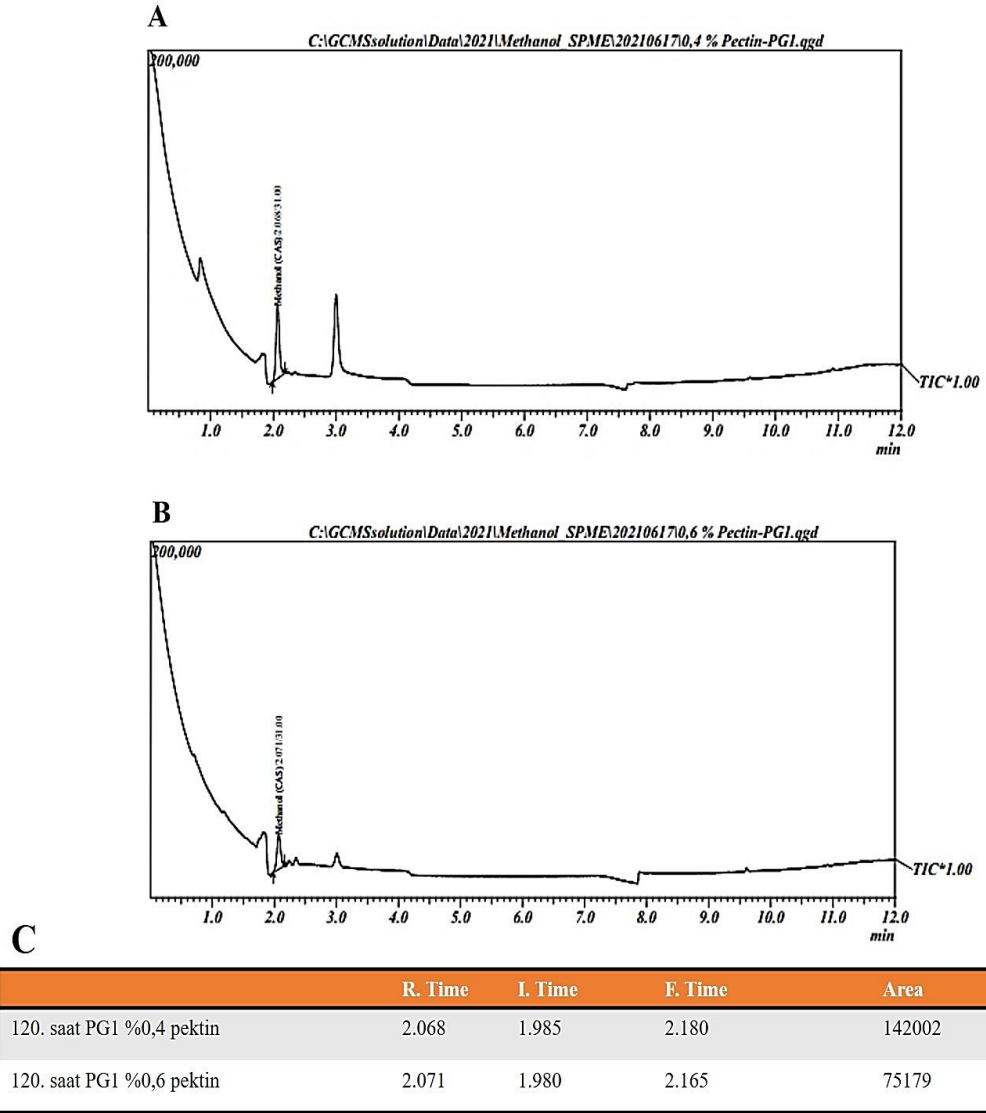
P_{GAP} kontrolünde PME, P_{AOX} kontrolünde GFP ile transforme edilen PG1 hücreleri ile %0,4 ve %0,6 pektin içeren ortamda 240 saat boyunca rekombinant GFP üretimi yapıldı. Üretim ortamına pektin ilavesinden 10 saat sonra toplanan hücreler parçalanarak hazırlanan lizatta Alcohol oxidase rabbit polyclonal antibody ve görüntüleme için HRP bağlı Goat Anti-Rabbit IgG ile western blot analizi yapıldı. Membran kemilüminesans olarak görüntülendi ve beklenen yerde (74 kDa) proteine ait bantlar görüldü (Van Der Klei vd 1991) (Şekil 22).



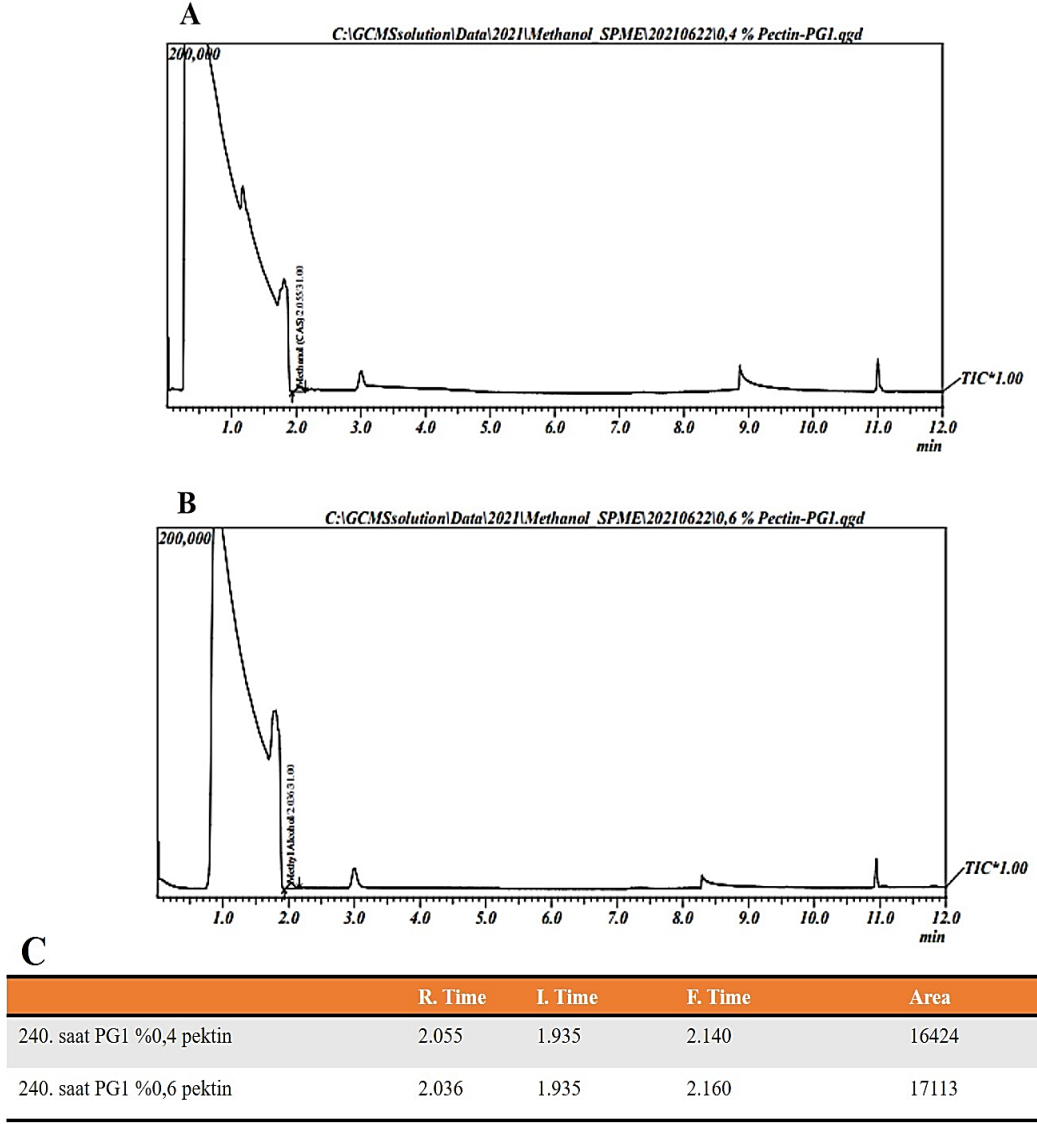
Şekil 22. Western blot analiz sonucu (M: Markır, K: Kontrol, 1.-2. kuyular: sırasıyla; %0,4 ve %0,6 pektin içeren ortamdan alınan hücrelere ait lizat örnekleri)

GC-MS Analiziyle Metanol Varlığının Belirlenmesi

Kendinden indüklenebilir sistem ile rekombinant GFP ekspresyonu için %0,4 ve %0,6 pektin içeren ortamda gerçekleştirilen inkübasyonun 120. ve 240. saatinde alınan kültür sıvılarında GC-MS analizi ile metanol varlığı belirlendi. Elde edilen 120. saatteki grafiksel ve tablosal sonuçlar Şekil 23'te ve 240. saatteki grafiksel ve tablosal sonuçlar ise Şekil 24'te verildi.



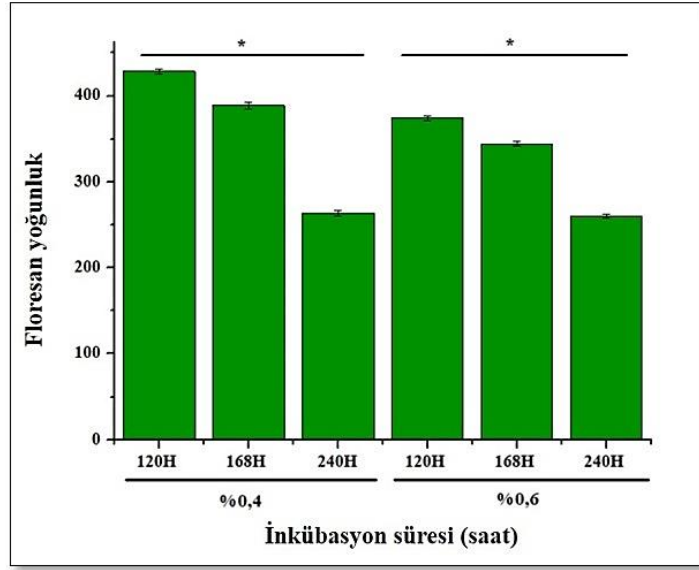
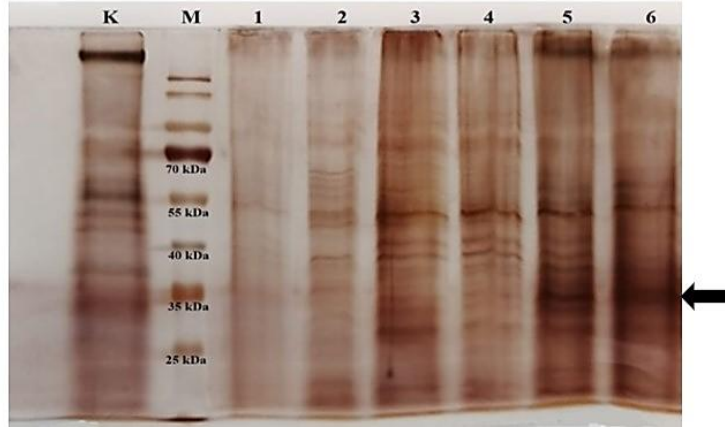
Şekil 23. GC-MS sonuçları (A: 120. saatte alınan %0,4 pektin içeren kültür sıvısı, B: 120. Saatte alınan %0,6 pektin içeren kültür sıvısı, C: Grafiksel sonuçların tabloda gösterimi)



Şekil 24. GC-MS sonuçları (A: 240. saatte alınan %0,4 pektin içeren kültür sıvısı, B: 240. Saatte alınan %0,6 pektin içeren kültür sıvısı, C: Grafiksel sonuçların tabloda gösterimi)

GFP Floresan Yoğunluğunun Belirlenmesi ve SDS-PAGE Analizi

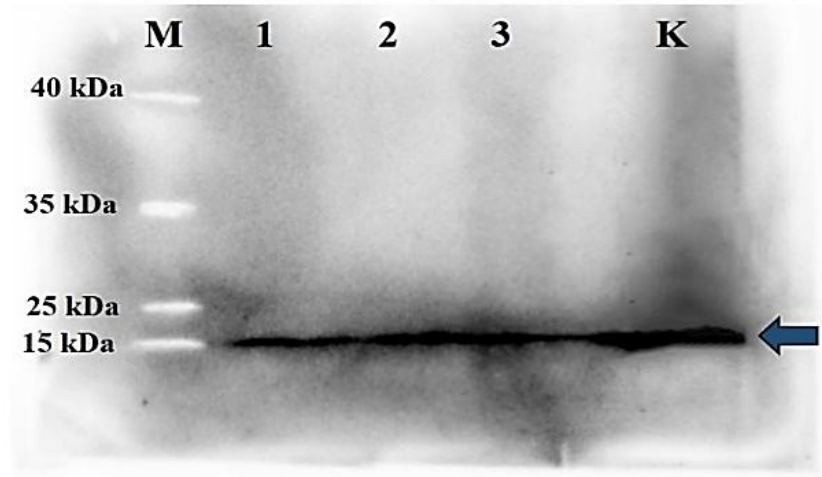
Kendinden indüklenebilir sistem ile rekombinant GFP ekspresyonu için %0,4 ve %0,6 pektin içeren ortamda gerçekleştirilen inkübasyonun 120., 168. ve 240. saatte alınan kültür sıvılarında GFP floresan yoğunluğunu belirlemek için floresan spektrofotometrede ölçüm yapıldı ve aynı örneklerle SDS-PAGE analizi yapılarak gümüş boyama ile görüntülendi (Şekil 25 A ve Şekil 25 B).

A**B**

Şekil 25. Kendinden indüklenebilir sistem ile rekombinant GFP üretimi (A: 120., 168. ve 240. saatlerde alınan %0,4 ve %0,6 pektin içeren kültür sıvılarının GFP floresan yoğunluğu, B: Gümüş boyama sonrası jel görüntüsü, (K: Kontrol (%0,5 metanolle indüklenen PG1), M: Markır, 1, 3, 5. kuyular: sırasıyla; %0,4 pektin içeren 120., 168. ve 240. saatte alınan kültür sıvıları, 2, 4, 6. kuyular: sırasıyla; %0,6 pektin içeren 120., 168., 240. saatte alınan kültür sıvıları)

Pektin İçeren Ortamda *P. pastoris* İkili Promotör Sistemi Tarafından Azurin Üretimi

P_{GAP} kontrolünde PME, P_{AOX} kontrolünde azurin ile transforme edilen hücreler ile %0,4 pektin içeren ortamda 240 saat boyunca rekombinant azurin üretimi yapıldı. 120., 168. ve 240. saatte kültür sıvısı örnekleri toplandı. Western blot analizi sonrası proteine ait bantlar görüldü (Şekil 26).



Şekil 26. Rekombinant azurin proteinin western blot analiz sonucu (M: Markır, 1.-3. kuyular: sırasıyla; 120. saat, 168. saat ve 240. saatteki %0,4 pektin içeren konsantre kültür sıvıları K: Kontrol (%0,5 metanolle indüklenen pGKB α -PME+pPICZ α A-Azu/X-33 120. saatte alınan kültür sıvısı)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Biyomoleküllerin kaynağından başka bir organizmada üretimi, istenen ürünün üretiminden sorumlu hedef genin klonlanmasıyla gerçekleştirilen rekombinant DNA teknolojisinde, uygun vektör DNA'ya çeşitli kaynaklardan arzu edilen bir gen dizisine sahip DNA parçalarının eklenmesini içerir (Nielsen ve Villadsen 1994). Rekombinant DNA, farklı kaynaklardan elde edilen genetik materyallerin genetik mühendisliği metotları ile bir araya getirilmesi sonucu meydana gelen, biyolojik organizmalarda doğal olarak bulunmayan DNA molekülüdür. Elde edilen rekombinant DNA'nın bir konakçı hücrede ekspresyonu sonucu üretilen protein ise rekombinant (heterolog) protein olarak adlandırılmaktadır (Karaoğlu 2012).

Proteinlerin doğal kaynaklardan elde edilmesinin zorlukları ve dezavantajlarından dolayı daha güvenilir ve uygun maliyetli bir alternatif olarak rekombinant protein üretimi geliştirilmiştir (Lai vd 2019). Elde edilen rekombinant proteinler; farmasötikler, teşhis, gıda, deterjanlar, biyoyakıtlar, tekstil, polimerler, kağıt ve kağıt hamuru dahil olmak üzere endüstri alanında çok çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Biyofarmasötik protein komplekslerinden endüstriyel enzimlere kadar rekombinant proteinler için pazar, istikrarlı bir şekilde büyümekte ve biyofarmasötik pazarının 2019 yılı sonunda %10,6 bileşik yıllık büyüme oranıyla 386,7 milyar dolara ulaşması beklenmiştir. Endüstriyel enzim pazarının ise %4,7 bileşik yıllık büyüme oranıyla 2021 yılında 6,3 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir. Yüksek talep ve sürekli pazar genişlemesi, hem yeni proteinlerin üretilmesini sağlamak hem de mevcut süreçlerin üretim maliyetlerini azaltmak için protein üretim platformlarını iyileştirmeye yönelik teşvikler sağlamaktadır (García-Ortega vd 2019).

Rekombinant protein üretimi için uygun hücre seçimi çok önemlidir ve biyoproses tasarımının başlangıcında ele alınması gereken en zorlu ve kritik adımlardan biridir. Genel olarak bakteriler, glikozile edilmiş veya kapsamlı bir şekilde modifiye edilmiş formda sentez gerektirmeyen proteinler için mükemmel bir ekspresyon sistemi sağlayarak hızlı ve ucuz üretim proseslerine izin verir (García-Ortega vd 2019). Ancak, bakteriyel konakçıların doğru bir protein işleme yeteneğinden yoksun olduğu çoğu durumda heterolog proteinlerin bakteri hücrelerinde inklüzyon cisimcikleri oluşturduğu ve sıklıkla proteinlerin enzimatik aktivitelerini/üç boyutlu yapılarını kaybetmelerine neden olduğu bilinir. Yanlış yapılarının bir

sonucu olarak, *in vitro* ortamda doğru bir şekilde yeniden katlanmadıkları sürece bu tür proteinlerin insanlarda kullanımı mümkün görülmemektedir (Porro ve Mattanovich 2004).

Mayalar ilk olarak, 1981 yılında *S. cerevisiae*'nin kullanılmasıyla bir rekombinant protein platformu olarak görüldü. O zamandan beri, diğer mayalar, yakın zamanda *Komagataella phaffii* olarak yeniden sınıflandırılan *P. pastoris* ve ayrıca *Hansenula polymorpha* veya *Kluyveromyces lactis* gibi diğer mayalar dahil olmak üzere, bazı avantajlar sunan alternatif hücreler olarak geliştirildi. *P. pastoris*, genellikle güvenilir olarak tanınan (GRAS) bir organizma olarak tanımlanır ve şu anda heterolog proteinlerin üretimi için en etkili ve çok yönlü sistemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu metilotrofik organizma, 1985 yılında bir konakçı sistem olarak geliştirilmiştir. Hâlihazırda *P. pastoris* sisteminde 5000'den fazla rekombinant protein ifade edilmiştir. Olumlu özelliklerinden dolayı, 300'ün üzerinde endüstriyel proses lisanslanmıştır ve şu anda piyasada *P. pastoris*'te üretilen 70'ten fazla ticari ürün bulunmaktadır. Bu ürünlerin uygulama alanları endüstriyel enzimlerden (nitrat redüktaz), hayvan yemi katkı maddelerine (fitaz) ve biyofarmasötik proteinlere kadar çok geniştir. Ayrıca iki biyofarmasötik ürün (Kalbitor® ve Jetrea®), ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa Komisyonu tarafından onaylanmıştır ve 20'den fazla terapötik ürün adayı halen klinik üretim sürecindedir (García-Ortega vd 2019).

P. pastoris, AOX1 ve AOX2 olarak adlandırılan, alkol oksidaz proteinini kodlayan iki gene sahiptir. Bu mikroorganizmada rekombinant protein ekspresyonu, AOX1 promotörü (P_{AOX1}) kontrolünde gerçekleşir. Bu promotörün bilimsel çalışmalarda sıklıkla kullanılan promotör olmasının sebebi, *P. pastoris*'te karakterize edilen ilk promotör olması, karbon kaynakları tarafından çok sıkı bir şekilde düzenlenmesi ve çok güçlü olmasıdır. P_{AOX1} kontrolünde ekspresyon yapabilen suşlar, metanolü kullanarak gen indüksiyonunu, biyokütlenin arttırılmasını ve protein üretiminin gerçekleştirilmesini sağlarlar (Looser vd 2014). P_{AOX1} , metanol tarafından kuvvetli şekilde indüklenirken gliserol, asetat, glikoz, ve etanol gibi karbon kaynakları tarafından da baskılanmaktadır. Diğer yandan, bu promotör, alanin, mannitol ve sorbitol ile baskılanmasa da indüksiyon için metanole ihtiyaç duyulmaktadır (Inan ve Meagher 2001). Yani bu sistem tarafından yüksek seviyede rekombinant protein üretimi, AOX1 promotörünün metanol tarafından indüklenmesi sonucu gerçekleştirilebilmektedir. *P. pastoris* ekspresyon sisteminde çoğunlukla kullanılan P_{AOX1} haricinde P_{AOX2} , P_{DAS} , P_{GAP} , P_{ICL1} , P_{FLD1} , P_{PEX8} , P_{TEF1} , P_{PGK1} ve P_{YPT1} gibi indüklenebilir promotörler de bulunmaktadır. Bu promotörlerden biri olan P_{FLD1} , P_{AOX1} 'e göre alternatif olarak görülmesine rağmen, indüksiyon için toksik ve yanıcı olan formaldehit veya metilamine gerek duyulmaktadır. AOX1 promotörünün diğer promotörlere göre yaygın olarak kullanılmasının

sebebi ise heterolog genin yüksek seviyede ekspresyonunu sağlamasıdır. Örneğin, yapılan bir çalışmada üç farklı promotör kontrolünde β -glukuronidazın ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmış, P_{YPT1} kontrolündeki protein ekspresyon seviyesi, yapısal P_{GAP} (Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz) ve indüklenebilir P_{AOX1} kontrolündeki ekspresyon seviyesinden daha az bulunmuştur. En yüksek protein üretimi ise metanolde büyütülen ve P_{AOX1} arkasına yerleştirilen geni taşıyan hücrelerde gözlenmiştir (Sears vd 1998).

Pektin, tüm bitkilerin hücre duvarında ve hücreleri arasında bulunan hücre duvarının en önemli bileşenidir. D-galakturonik asit birimlerinin glikozidik bağlarla birbirlerine bağlanmasıyla oluşan pektin, doğrusal bir ana zincirden ve bu ana zincire glikozidik bağlarla bağlanmış ramnoz moleküllerinden oluşur (Güzel ve Akpınar 2017). Çeşitli meyve ve sebzelerden farklı yöntemlerle elde edilen pektin, genel olarak jelleşme özelliğine göre iki ana sınıfa ayrılır. Pektin molekülünün galakturonik asit ana zincirindeki karboksil gruplarının %50'den fazlası metil grubuyla esterleşmiş ise yüksek metoksilli pektin, karboksil gruplarının %50'den azı metil grubuyla esterleşmiş ise düşük metoksilli pektin olarak bilinir (Viseux vd 2005). Toplam galakturonik asit birimindeki esterleşmiş karboksil gruplarının toplam karboksil gruplarına oranı ise esterleşme (metoksillenme) derecesi olarak ifade edilir ve doğal yüksek esterli pektinler, en fazla %75 esterleşme derecesine sahiptir. Meyve ve sebzeler, yaygın olarak pektik maddeler içerdiğinden, pektik maddeleri parçalayan ve bitki patogenezinin sorumlu olan pektinazlar için önemli doğal substratlardır (Gummadi ve Panda 2003). Pektinolitik enzimlerden biri olan pektin metilesteraz (PME) (Pektin pektilhidrolaz, EC 3.1.1.11), yüksek bitkilerde yaygın olarak bulunur ve metil ester gruplarını hidroliz ederek pektini de-esterifiye eder. Böylece metanol açığa çıkararak yüksek metoksilli pektinleri, pektatlar ve poligalakturonik asitler gibi düşük metoksilli pektinlere dönüştürür. Muhtemeldir ki, Dünya'daki ana metanol kaynağı, bitki PME enzimi tarafından gerçekleştirilen pektin de-metilasyonudur (Fall ve Benson 1996; Hüve vd 2007).

Bu tez çalışmasında *P. pastoris* ile rekombinant protein üretiminde metanol kullanılmadan P_{AOX1} kontrolünde kendinden indüklenebilir bir ekspresyon sisteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, önceki çalışmada elde edilen genomunda pGKBa-PME vektörünü taşıyan rekombinant *P. pastoris* hücrelerine, bu tez kapsamında elde edilen pPICZaB-GFP ve Şensoy Gün (2019) tarafından elde edilen pPICZaA-Azu vektör DNA'larının ayrı ayrı transfer edilmesi, pektin içeren besi ortamında büyütülen hücrelerin P_{GAP} kontrolünde kültür ortamına pektin metilesteraz (PME) salgılaması, salgılanan PME'nin kültür ortamındaki pektinden metanol açığa çıkarması ve bu sayede P_{AOX1} kontrolünde GFP veya azurin ekspresyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir. P_{AOX1} taşıyan maya hücrelerinde kendinden

indüklenebilir bir ekspresyon sistemi geliştirme aşamasında öncelikle kültür ortamına PME enzimini salgılayarak metanol açığa çıkaracak rekombinant maya hücrelerine pPICZαB-GFP veya pPICZαA-Azu transfer edildi. Literatürde alfa faktör sinyal sekansını içeren ekspresyon vektörleri kullanılarak *P. pastoris*'te birçok rekombinant proteinin üretilip hücre dışına salgılanması sağlanmıştır. Örneğin; Ünver (2014) ve Şensoy Gün (2019) yaptıkları çalışmalarda pPICZαA ekspresyon vektörünü kullanarak *P. pastoris* hücreleri ile P_{AOX1} kontrolünde sırasıyla, insan paraoksonaz 1 (PON1) ve azurin proteininin ekstrasellüler üretimini gerçekleştirirken Acar (2020) ise elde ettiği pGKBa ekspresyon vektörüne *Pectobacterium chrysanthemi* PME genini yerleştirmiş ve *P. pastoris* hücreleri ile P_{GAP} kontrolünde PME'nin ekstrasellüler üretimini gerçekleştirmiştir.

Bu tez çalışmasında öncelikle pPICZαB vektör DNA'sında yer alan P_{AOX}'un downstream bölgesine GFP geni yerleştirilerek bakteri hücrelerinde klonlandı. Bunun için, kodon optimize GFP geni dizayn edilen primerler kullanılarak belirlenen şartlarda PCR ile amplifiye edildi. Amplifikasyon sonrası agaroz jele yüklenen PCR ürünü görüntülendi (Şekil 5) ve GFP geni için beklenen boyutta (731 bp) bant görüldü. PCR ile çoğaltılan GFP geni saflaştırıldı ve saf olarak elde edilen gen, *EcoRI* ve *KpnI* restriksiyon enzimleri ile kesildi. Kesim reaksiyonu sonrası elde edilen ürünün fenol/kloroform ile ekstraksiyonu yapıldı. Aynı enzimlerle kesilen vektör DNA (pPICZαB), CIAP ile muamele edildikten sonra agaroz jeline yüklenerek yürütüldü ve görüntülendi. Vektör DNA'nın lineer formu, kapalı formundan daha yavaş yürüdüğü için kesilen vektör DNA'ya ait bant daha yukarıda görüldü ve böylece vektör DNA'nın kesildiği teyit edildi (Şekil 6). Kesim işlemi sonrasında vektör DNA'nın jelden ekstraksiyonu yapılarak saflaştırıldı. Kesilen ve ligasyona hazır hale getirilen vektör DNA (pPICZαB) ile GFP nükleotid sekansı, T4 DNA ligaz kullanılarak birleştirildi. Ligasyon işlemi sonrası elde edilen ürün, kompetent *E. coli* TOP10 hücrelerine transfer edildi. Elde edilen transformantlar LS-LB zeosin agar besiyerine transfer edilip inkübasyon sonrası zeosin antibiyotiğine dirençli olan kolonilerin gelişimi gözlemlendi (Şekil 7). Bakteri kolonilerinden 15 tanesi seçilerek GFP genine ait primerler kullanılarak PCR yapıldı. PCR sonrası ürünler, agaroz jele yüklenerek yürütüldü ve görüntülendi (Şekil 8). Elde edilen sonuçlara göre, beklenen yerde bant veren (731 bp) ve geni taşıdığı tespit edilen kolonilerden 5 tanesi seçilip bu koloniler ile vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak PCR yapıldı. PCR ürünleri agaroz jele yüklenerek yürütüldü ve beklenen boyutta (1291 bp) bant görüldü (Şekil 9). Klonlama işleminin doğruluğunu kontrol etmek için LB sıvı besiyerinde büyütülen bir koloniden plazmit izole edildi. Daha sonra vektöre yerleştirilen genin çift yönlü nükleotid dizilemesi yaptırıldı. Elde edilen dizileme sonucu ile kodon optimize GFP geninin nükleotid dizisi blastlandığında, her iki

nükleotid dizisi arasında %100 benzerlik görüldü (Şekil 10 ve Şekil 11). Böylelikle, pPICZαB-GFP elde edilmiş oldu (Şekil 12).

Transformasyon terimi ilk olarak Griffith tarafından tanımlanmıştır. Transformasyon hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda DNA alımını tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Griffith transformasyon terimini tanımladıktan sonra, çeşitli mantar ve birçok organizmada genetik transformasyon üzerinde çalışılmıştır (Gietz ve Woods 2001). Fungal genetik transformasyonda kullanılan çok fazla metot bulunmaktadır. Bunlar, elektroporasyon, biyolistik (partikül bombardımanı veya gen tabancası tekniği), cam boncuklarla çalkalama, şok dalgaları, sferoplast ve lityum (LiAc; lityum asetat, LiCl; lityum klorür) yöntemidir (Griffith 1966; Gietz ve Woods 2001; Kawai vd 2010). Bu yöntemlerden biriyle lineer (doğrusal) hale getirilen DNA'nın hücrelere transfer edilmesi sonucu genomda homoloji gösteren bölgeler arasında gerçekleşen homolog rekombinasyon yoluyla *P. pastoris*'in kalıcı transformantları oluşturulabilir (Cregg vd 1989; Invitrogen 2012). AOX promotörüne gen ekleme işlemi, vektör üzerindeki lokus ve AOX1 bölgesi arasındaki tek bir çaprazlama olayından kaynaklanır. *P. pastoris* transformasyonunda LiAc işe yaramadığı için transformasyon işleminin LiCl kullanılarak yapılması gerekmektedir (Invitrogen 2012). Bu bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında elde edilen pPICZαB-GFP ve önceki çalışmada elde edilen pPICZαA-Azu vektör DNA'ları, *MssI* (*PmeI*) enzimi ile AOX1 promotör bölgesinden kesilerek lineer hale getirildi. Lineer pPICZαB-GFP ve pPICZαA-Azu vektör DNA'ları, LiCl metodu kullanılarak maya hücrelerine transfer edildi. Transformasyon işleminde ilk olarak pPICZαB-GFP, *P. pastoris* X-33 hücrelerine transfer edildi. Daha sonra, önceki çalışmada pGKBα-PME ile transforme edilen maya hücrelerine pPICZαB-GFP ve pPICZαA-Azu ayrı ayrı transfer edildi. Bu işlemde seçim için zeosin antibiyotik direnç geni kullanıldı. Transformasyon sonrası elde edilen bu üç tip transforme maya hücrelerinden 100 µg/mL zeosin içeren YPD agar plaklara yayıldı ve gelişimleri gözlemlendi (Şekil 13). Gelişen kolonilerden pPICZαB-GFP ve pGKBα-PME+pPICZαB-GFP vektör DNA'ları taşıdığı düşünülen maya kolonilerinden 7'şer tane seçilerek (1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. koloniler) YPD zeosin agar besiyerine ekim yapıldı. Gelişen kolonilerden gDNA'lar izole edildi. gDNA'lar ile belirlenen şartlarda vektöre ait forward primer ve gene ait reverse primer kullanılarak çapraz PCR yapıldı. PCR ürünleri agaroz jele yüklenerek yürütüldü. Görüntüleme sonrası elde edilen sonuçlarda beklenen uzunlukta (1088 bp) bantlar görüldü (Şekil 14 ve Şekil 15). İkinci bir doğrulama için gDNA'lar ile gene ait primerler kullanılarak PCR yapıldı. PCR ürünleri agaroz jele yüklenerek yürütüldü. Görüntülemede beklenen uzunlukta (731bp) bantlar görüldü (Şekil 16 ve Şekil 17). Böylece seçilen 7'şer koloninin hepsinin genomunda pPICZαB-GFP'nin varlığı doğrulandı. Doğrulanmış kolonilerden pPICZαB-GFP taşıyan pPICZαB-GFP/X-33 hücreleri, G1, G2, G3, G4, G5, G6

ve G7 şeklinde isimlendirirken pGKB α -PME+pPICZ α B-GFP/X-33 hücreleri PG1, PG2, PG3, PG4, PG5, PG6 ve PG7 olarak isimlendirildi. Antibiyotik direnç testi, artan antibiyotik konsantrasyonuna direnç gösteren maya hücrelerinin genomlarında, hedef genin birden fazla kopya sayısına sahip olduklarını göstermektedir. Bu nedenle yapılan testte yüksek miktarda rekombinant protein üretimi gerçekleştirmek için fazla miktarda hedef genin kopya sayısına sahip olan kolonilerin belirlenmesini sağlar (Karaaslan 2017). Bu tez çalışmasında antibiyotik direnç testi yapmak için PCR sonucu genomlarında GFP genini taşıdıkları belirlenen pPICZ α B-GFP/X-33 ve pGKB α -PME+pPICZ α B-GFP/X-33 transformantlarının 7'ser tanesi ile elde edilen kültür sıvılarının 3'er μ L'si, farklı konsantrasyonlarda (1 mg/mL ve 2 mg/mL) zeosin içeren YPD agar plaklara damlatıldı. 72 saatlik inkübasyon sonrası transformantların tümü 1 mg/mL antibiyotik konsantrasyonuna direnç gösterirken, 2 mg/mL antibiyotik konsantrasyonuna sadece G3 ve PG1 kolonilerini oluşturan hücrelerin dirençli gösterdiği görüldü (Şekil 19). Elde edilen bu sonuç, G3 ve PG1 kolonilerinin diğerlerinden daha yüksek sayıda hedef gen kopya sayısına sahip olduklarını düşündürdüğünden, GFP üretimi için bu koloniler tercih edildi. Benzer şekilde, Athmaram vd (2012) tarafından yapılan çalışmada *P. pastoris*'te heterolog hemaglutinin (HA) proteininin ekspresyon seviyeleri üzerine kopya sayısının etkisi araştırılmıştır. Araştırmacılar, seçim plaklarında 0,25, 0,5 ve 0,75 mg/mL konsantrasyonlarında genetisin antibiyotiği içeren besiyerlerine ekilen *P. pastoris* transformantlarının gelişimini gözlemlemişlerdir. Seçim plaklarında yetişen klonların, sırasıyla düşük, orta ve yüksek kopyaya sahip olduğunu kabul etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada rekombinant genin artan kopya sayılarını içeren *Pichia* klonlarını genetisin direnç testi ve SYBR green kantitatif Real-Time PCR ile seçmişlerdir. Bu stratejiler ile transgenin en fazla dört ila altı kopyasını içeren rekombinant transformantları belirlemişler ve HA rekombinant protein üretimine geçmişlerdir. Sonuç olarak, rekombinant proteindeki ekspresyon seviyesinde görülen artışın, gen kopya sayısındaki artışla orantılı olduğunu bildirmişlerdir. Karaaslan (2017) yaptığı çalışmada pHIL-S1-LeExp1 ve pPIC9K-LeExp1 plazmitlerini *P. pastoris* hücrelerine transfer etmiş ve antibiyotik direnç testi yapmıştır. Bu testte, 4 mg/mL genetisin konsantrasyonuna sahip plaklarda büyüyen maya kolonilerini, 0,5, 1 ve 2 mg/mL genetisin konsantrasyonlarına sahip plaklarda gelişen maya kolonilerinden daha fazla gen kopya sayısı içerdiğinden dolayı seçmiş ve bu konsantrasyona dayanan maya hücreleri ile rekombinant protein üretimini gerçekleştirmiştir.

Bu tez çalışmasında ayrıca, pGKB α -PME/X-33 hücrelerine pPICZ α A-Azu transfer edildi. Transformasyon sonrası seçilen koloniler ile vektöre ait primerler kullanılarak PCR yapıldı. PCR ürünleri agaroz jele yüklendi ve görüntülendi. Görüntüleme sonucu beklenen uzunlukta (964 bp) bant görülen (Şekil 18) kolonilerin, 1 mg/mL antibiyotik konsantrasyonuna

direnç gösterdiği görüldü (Şekil 19). pGKB α -PME+pPICZ α A-Azu/X-33 kolonilerinden biri üretim için tercih edildi.

Metanol ile indüklenebilir sistemde pPICZ α B-GFP/X-33 hücreleri ile rekombinant GFP üretimi için 2., 3., 4. kolonileri oluşturan hücreler (G2, G3 ve G4) ve boş vektör (pPICZ α B) taşıyan koloniye oluşturan hücreler ile rekombinant protein üretimi yapıldı. Bu amaçla ilk olarak YPD agar besiyerinde 2 gün boyunca büyütülen mayalar BMGY ön yetiştirme besiyerine inoküle edildi. 24 saat büyütülen hücreler, %1 kazamino asit ve %1 sorbitol içeren BMMY üretim besiyerine inoküle edildi.

Endojen proteinleri minimal düzeyde salgılayan *P. pastoris* hücreleri, rekombinant proteinleri kültür ortamına yüksek seviyelerde salgılayabilir (Macauley-Patrick vd 2005). Ancak, kültür ortamında bu proteinlerin proteolitik bozunması kalıcı bir problem olarak bilinmektedir (Zhou ve Zhang 2002). Bu durumu bertaraf etmede, proteaz eksikliği olan suşların kullanımı veya proteinlerin bozunmasını önlemek için kültür ortamına proteaz inhibitörleri veya kazamino asit eklenmesi gibi çeşitli öneriler sunulmuştur (Goodrick vd 2001). Özellikle kültür ortamlarına kazamino asit takviye edilerek proteolitik aktivitede azalmanın sağlanabileceği ve ayrıca bu takviyenin hücre büyümesi için nitrojen ve alternatif karbon kaynağı olduğu bildirilmiştir (Macauley-Patrick vd 2005; Mukaiyama vd 2009). Dolayısıyla, kültür ortamına salgılanan rekombinant proteinlerin proteolitik bozunmasının önüne geçilmesi amacıyla BMMY üretim besiyerine %1 kazamino asit ilave edildi.

Pichia ile fermentasyonda hücre gelişiminde gerekli olan karbon kaynakları gliserol ve sorbitol iken, proteinlerin ekspresyonunda kullanılanlar ise metanol ve metilamindir (Çalık 2010). AOX promotörü için baskılayıcı olmayan karbon kaynağı olarak bilinen sorbitol, daha yüksek bir protein üretimi ve biyokütle verimi üretebilir (Xie vd 2005; Jungo vd 2007; Zhu vd 2013; Ünver 2014). Thorpe vd (1999) ise gliserol-metanol ve sorbitol-metanol besleme stratejilerini karşılaştırmış, her iki stratejiye ait ürün miktarında fark gözlemlememiş ve promotör baskılayıcı özelliğinden dolayı gliserol yerine sorbitol-metanol besleme stratejisinin kullanılabileceğini bildirmiştir. Dolayısıyla, bu çalışmada, yüksek verimde rekombinant protein elde etmek için üretim ortamına %1 sorbitol eklenmiştir.

BMMY üretim besiyerine hücre inokülasyonu sonrası 120 saate kadar üretim yapıldı ve kültür ortamına her 24 saatte bir %0,5 metanol ilave edildi. Daha sonra 96. ve 120. saatte alınan örnekler ile SDS-PAGE analizi yapıldı. Poliakrilamid jele yüklenerek yürütülen örnekler, Coomassie brilliant blue G-250 ile boyanarak görüntülendi. Görüntüleme sonucu kontrolle karşılaştırıldığında, en iyi ekstrasellüler GFP üretim kapasitesine sahip olan koloninin G3 olduğu gözlemlendi. (Şekil 20). *Aequorea victoria*'den izole edilen GFP geninin, 238 amino asitlik

bir proteini kodladığı ve molekül kütlelerinin yaklaşık 27 kDa olduğu bildirilmiştir (Niedenthal vd 1996). Üretici firmanın (Invitrogen) bildirdiği üzere c-myc epitopu ve histidin kuyruğu (6X His) rekombinant proteine 2,5 kDa ilave ettiğinden geri kalan farkın rekombinant proteinin glikozillenmiş kısmından kaynaklandığı düşünülmektedir. *P. pastoris*'te rekombinant protein üretimi gerçekleştirilen diğer çalışmalarda da üretilen proteinlerin gerçek moleküler kütlelerinin üzerinde bulunmasının sebebi, hücrelerin gerçekleştirdiği glikozilasyon olayı ile açıklanmıştır. Soyaslan (2010) yaptığı çalışmada insan eritropoietinini *P. pastoris*'te ekstrasellüler olarak üretmiş ve üretim sonrası proteinin 34-38,5 kDa yerine, 43-55 kDa aralığında moleküler kütleyle sahip olduğunu bildirmiştir. Benzer şekilde, Arruda vd (2016) yaptıkları çalışmada 54 kDa moleküler kütleyle sahip *Bacillus subtilis* α -amylase proteinini *P. pastoris*'te ekstrasellüler olarak üretilen proteinin moleküler kütlelerini 60 kDa civarında bulmuşlardır.

G3 kolonisini oluşturan hücreler ile küçük ölçekli üretim yapıldı. Üretim, 144 saate kadar devam ettirildi. Kültür ortamına her 24 saatte bir %0,5 metanol ilave edildi ve kültür sıvıları toplandı. GFP floresan yoğunlukları belirlendi (Şekil 21 A). Kültür sıvılarından SDS-PAGE analizi yapılarak jel, gümüş boyama ile görüntülendi (Şekil 21 B). Rekombinant GFP'nin yaklaşık 33 kDa molekül kütlelerine sahip olduğu belirlendi (Şekil 21 C).

Yabani tip *Aequorea victoria* proteini, tüm GFP'lerin en karmaşık spektrumuna sahiptir. 395 nm'deki tepe noktası, 475 nm'deki küçük bir tepe noktasından genlik olarak yaklaşık üç kat daha yüksek olan büyük bir uyarıma sahiptir. Normal çözeltide, 475 nm'de uyarma, 503 nm'de maksimum emisyon piki vermesi gerekirken, 395 nm'de uyarma, 508 nm'de emisyon piki verirken, (Tsien 1998). Ayrıca, Patterson vd (1997) tarafından yapılan çalışmada pH:6-10 arasındaki solüsyonda GFP'nin ışığı uyarma ve emisyon dalga boylarının 490-650 nm olduğu gösterilmiştir. Bu verilere göre, bu tez çalışmasında her 24 saat sonunda toplanan kültür sıvılarının GFP floresan yoğunluğu, 475-510 nm dalga boyunda (Ex: 475 nm, Em: 510 nm) floresan spektrofotometrede ölçüldü. Ölçüm sonucu elde edilen verilere göre, üretilen GFP'nin her 24 saat sonrasında şiddetinin arttığı, en yüksek şiddetin 120. saatte olduğu ve 144. saatte GFP floresan yoğunluk şiddetinin azaldığı görüldü (Şekil 21 A.). Diğer yandan, yapılan SDS-PAGE analizi ve gümüş boyama sonucu, boş vektör taşıyan hücre (pPICZ α B/X-33) kültür sıvısında proteine ait bant görülmezken, 144. saate kadar artan yoğunlukta proteine ait bantlar görüldü (Şekil 21 B).

İkili promotör kontrolünde kendinden indüklenebilir sistem ile GFP üretimi için, pGKB α -PME+pPICZ α B-GFP/X-33 hücreleri (PG1) üretim besiyerinde 1 gece inkübasyona bırakıldı. Daha sonra kültür ortamına %0,4 ve %0,6 pektin eklenerek 240 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Kontrol olarak PG1, %1 kazamino asit ve %1 sorbitol içeren BMMY

besiyerinde inkübasyona bırakıldı ve her 24 saatte bir %0,5 metanol ilave edildi. Hücrelerin üretim besiyerlerinde inkübasyonu sırasında 10. saatte toplanan hücre peletlerinden lizat hazırlandı. Hücre lizatları SDS-PAGE jelinde yürütülerek western blot analizi yapıldı. Analiz sonucunda görüntülenen membranda metanol ilave edilmeyen ve pektin içeren kültür ortamından alınan hücreler ile metanol ilave edilen kültür ortamından alınan hücrelerin lizatlarında AOX proteinine ait beklenen yerde bant (74 kDa) gözlemlendi (Şekil 22). Liu vd (2012) yaptıkları çalışmada alkol oksidaz (AOX) üretimini geliştirmek için, pPIC9K-AOX plazmitini *P. pastoris* GS115 suşuna transfer ederek rekombinant *P. pastoris* sistemi oluşturmuşlardır. Kültür ortamından topladıkları hücre peletlerini parçalayarak western blot analizi yapmışlardır. Elde edilen rekombinant AOX'un yaklaşık olarak 74 kDa moleküler kütleye sahip olduğunu görmüşlerdir. Bu tez çalışmasında elde edilen western blot analiz sonucuna göre, metanol ilave edilmeksizin pektin içeren kültür ortamında büyütülen hücrelerde AOX protein ekspresyonunun gözlenmesi, ortamda metanol varlığına işaret etmektedir (Wang vd 2017). Diğer yandan, kültür ortamında metanol varlığını belirlemek için GC-MS analizi yapıldı.

Savary ve Nuñez (2003) yaptıkları çalışmada bitki hücre duvarı polisakkarit pektininde esterler olarak bulunan metanol ve asetik asitin aynı anda belirlenmesi için basit, hızlı ve doğrudan bir prosedür geliştirmişlerdir. Esterlerin baz hidrolizi ve pektin numunelerinin asitleştirilmesinden sonra, bir Carboxen-PDMS fiber düzeneği kullanarak katı fazlı mikro ekstraksiyon (SPME) yapmışlardır. Metanol ve asetik asiti, GC-MS kullanılarak saptamışlardır. Bruzzoniti vd (2014) ise yaptıkları çalışmada iki gaz kromatografik yöntem olan, HS-GC-MS ve HS-GC-FID, güç transformatörleri içindeki selülozun bozunmasının belirteçleri olarak mineral yalıtkan yağ numunelerinde metanol ve etanolün belirlenmesi için optimize etmiş ve karşılaştırmışlardır. Geliştirilen her iki yöntemin de, selülozun termal bozunma seviyesinin yeni belirteçleri olarak metanol ve etanolün güvenilir bir şekilde tanımlanmasına izin verdiğini belirlemişlerdir. Bu bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında PG1 kolonisini oluşturan hücrelerin %0,4 ve %0,6 pektin içeren ortamlarda 240 saat boyunca gerçekleştirilen inkübasyonu sırasında 120. ve 240. saatte alınan kültür sıvılarında metanol varlığını belirlemek için GC-MS analizi yapıldı. Analiz sonrası kültür ortamlarında metanol varlığı belirlendi (Şekil 23 ve Şekil 24).

Protein stabilitesi, çevresel koşullardaki (pH ve sıcaklık) değişiklikler veya organik çözücüler, tuzlar ve inert polimerler gibi diğer ajanlara maruz kalma sırasında yapısal bütünlüğün ve biyolojik fonksiyonun korunmasını ifade eder. GFP stabilitesini incelemek için Penna vd (2005) yaptıkları çalışmada oda sıcaklığında farklı konsantrasyonlarda ve değişen pH değerlerinde sulu glikoz çözeltileri kullanmışlardır. GFP'yi her biri 10 mM olan Tris-HCl (pH

8.0); fosfat (pH:6.0 ve 7.0) ve asetat (pH:5.0) tamponları ve tamponsuz su; pH:6.70 $\pm$ 0.40 glikoz çözeltileri (1,5-50%) içinde seyreltmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre, glikoz-fosfat tamponunda ve %10-50 glikoz oranında GFP stabilitesinin diğer tamponlara oranla daha iyi olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuç dikkate alındığında, bu tez çalışmasında GFP floresan yoğunluğunu ölçmek için konsantre kültür sıvıları, %30'luk glikoz-fosfat tamponu ile karıştırılarak floresan spektrofotometrede 475-510 nm'de ölçüldü (Şekil 25 A). Elde edilen grafikte her saatte GFP floresan yoğunluğunun olduğu ve pektin konsantrasyonuna göre floresan yoğunluğunun değiştiği gözlemlendi. Daha sonra konsantre kültür sıvıları ile SDS-PAGE analizi yapılarak jel gümüş boyama ile görüntülendi. Jele yüklenen örneklerle birlikte bulunan pektinin veya pektinin PME ile de-esterifikasyonu sonucu oluşan ürünlerin uzaklaştırılması için boyama öncesi jele yıkama işlemi yapıldı. Pektinin viskozitesini etkileyen bazı faktörler vardır. Bunlar, molekül ağırlığı, esterleşme derecesi, elektrolitlerin varlığı, pH ve sıcaklıktır. Asit, pozitif yüklü hidrojen iyonları ile pektin molekülünün negatif yükünü azaltır ve üç boyutlu şeker-pektin jelini oluşturur (Arslan 1994). (Herp vd 1967) yaptıkları çalışmada L-askorbik asit kullanarak polisakkaritlerin bazılarının depolimerizasyonunu sağladığını göstermişlerdir. 0,2 M fosfat tamponunda pH:7,3'te 30 °C'de 3,3 mM askorbik asit kullandıklarında, %73 metilasyon derecesine sahip olan pektinin intrinsik viskozitesinde %56 oranında azalma olduğunu ifade etmişlerdir. Bu bilgiler ışığında, yürütülen jel gümüş boyama yapılmadan önce pH:8'e ayarlanan 10 mM KH₂PO₄ tamponunda 45 dakika boyunca çalkalanarak yıkandı. Böylece, bazik ortamda negatif yüklü hidroksit iyonları ile pektin molekülünün negatif yükünün arttırılması ve viskozitesinin düşürülerek çözünmesi sağlandı. Daha sonra, yıkanan jel gümüş boyama ile görüntülendi (Şekil 25 B). Boyama sonrası 120. ve 168. saatte bant yoğunluklarının düşük olması, jelin yıkanmasından dolayı proteinlerin yıkama tamponuna geçmiş olabileceğini düşündürdü.

Elde edilen kendinden indüklenebilir ekspresyon sistemi ile GFP'nin üretildiği gösterilirken, aynı sistem ile farklı bir proteinin de üretildiğini göstermek için pGKBa-PME+pPICZ α A-Azu/X-33 hücreleri ile üretim gerçekleştirildi. Hücreler, bir gece üretim besiyerinde inkübasyona bırakıldı ve daha sonra üretim besiyerine %0,4 pektin ilave edilerek 240 saate kadar inkübasyona bırakıldı. Diğer yandan, aynı hücreler %1 kazaminoasit ve %1 sorbitol içeren BMMY besiyerinde de üretime alındı. Kültür ortamına her 24 saatte bir %0,5 metanol ilave edildi. Konsantre edilen kültür sıvıları SDS-PAGE jelinde yürütüldü. Jel, pH:8'e ayarlanan KH₂PO₄ tamponunda 45 dakika boyunca çalkalanarak yıkandı. Yıkanan jel membrana blotlandı. Anti-azurin antikoru kullanılarak western blot analizi yapıldı ve membran kemilüminesans olarak görüntülendi. Kontrole kıyasla tek yerde bant veren azurin proteininin

üretildiği gösterildi (Şekil 26). Western blot sonucunda bantlar arası boşlukların belli olmaması durumu, blotlama öncesi jelin yıkanmasından kaynaklı olduğunu düşündürdü.

Elde edilen tüm sonuçlara göre, ikili promotör sistemi kullanılarak ortama metanol ilave etmeksizin geliştirilen kendinden indüklenebilir bir heterolog protein ekspresyon sistemi ile hem GFP hem de azurin proteininin üretilbildiği gösterilmiş oldu.

Sonuç ve Öneriler

1. Bu tez çalışmasında rekombinant protein üretiminde sıklıkla tercih edilen *P. pastoris* hücrelerinde, metanolla indüklenebilir promotör (P_{AOX}) kontrolünde, protein ekspresyonu için kendinden indüklenebilir bir ekspresyon sistemi geliştirilmiştir
2. pPICZαB vektörüne kodon optimize GFP geni yerleştirilerek pPICZαB-GFP elde edilmiştir.
3. pPICZαB-GFP, *P. pastoris* X-33 genomuna ve genomunda pGKBα-PME taşıyan *P. pastoris* hücrelerinin (pGKBα-PME/X-33) genomuna entegre edilmiştir. Ayrıca pPICZαA-Azu da pGKBα-PME/X-33 hücrelerinin genomuna entegre edilmiştir.
4. Transformasyon işlemleri sonunda pPICZαB-GFP/X-33, pGKBα-PME+pPICZαB-GFP/X-33 ve pGKBα-PME+pPICZαA-Azu/X-33 hücreleri elde edilmiştir.
5. %0,5 metanol indüksiyonu ile pPICZαB-GFP/X-33 hücreleri (G3 kolonisini oluşturan hücreler) tarafından ekstrasellüler GFP üretimi, 120 saatlik inkübasyon sonunda gerçekleştirilmiştir.
6. Farklı miktarlarda (%0,4 ve %0,6) pektin içeren, metanol ilave edilmeyen kültür ortamlarında büyütülen pGKBα-PME+pPICZαB-GFP/X-33 hücrelerinde AOX protein ekspresyonu, western blot analizi ile gözlenmiştir.
7. pGKBα-PME+pPICZαB-GFP/X-33 hücrelerinin farklı miktarlarda (%0,4 ve %0,6) pektin içeren, metanol ilave edilmeyen kültür ortamlarında metanol varlığı, GC-MS analizi ile tespit edilmiştir.
8. Farklı miktarlarda (%0,4 ve %0,6) pektin içeren, metanol ilave edilmeyen kültür ortamlarından 120., 168., ve 240. saat sonunda toplanan örnekler ile yapılan floresan spektrofotometre ölçümü ve SDS-PAGE analizi ile pGKBα-PME+pPICZαB-GFP/X-33 hücreleri tarafından ekstrasellüler GFP üretiminin gerçekleştirildiği görülmüştür.
9. %0,4 pektin içeren, metanol ilave edilmeyen kültür ortamından 120., 168., ve 240. saat sonunda toplanan örnekler ile yapılan western blot analizi ile pGKBα-

PME+pPICZ α A-Azu/X-33 tarafından ekstrasellüler azurin üretiminin gerçekleştirildiği görülmüştür.

10. Bu tez çalışması kapsamında önerilen kendinden indüklenebilir *P. pastoris* ekspresyon sistemi kullanılarak P_{AOX} kontrolünde çeşitli proteinlerin ekstrasellüler veya intrasellüler ekspresyonu gerçekleştirilebilir.
11. Kendinden indüklenebilir bu sistem ile protein üretimi sırasında kültür ortamına saf metanol ilave edilmesine gerek duyulmadığından, özellikle büyük ölçekli (fermentör) üretim sırasında metanolün (uygun depolama gerektirir ve depolama sırasında yer kaplar) tedarik edilmesi ve dolayısıyla maliyeti söz konusu olmayacaktır.
12. Bu sistem ile büyük ölçekli üretim sırasında yüksek verimle protein eldesi için kullanılacak pektin miktarı ve fermentasyon şartları optimize edilmelidir.

KAYNAKLAR

- Acar, M., 2020. *Pectobacterium chrysanthemi* Pektin Metilesteraz Enziminin *Pichia pastoris* ile Rekombinant Üretimi. (Y. Lisans Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H. and Schwab, H. , 2014a. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. Applied Microbiology and Biotechnology, 98 (12), 5301–5317.
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H. and Schwab, H. , 2014b. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. Applied Microbiology and Biotechnology, 98 (12), 5301–5317.
- Arslan, nurhan., 1994. Pektinin fizikokimyasal özellikleri, üretimi ve gıdalarda kullanımı. Gıda (3) 187-192.
- 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.
- Bruzzoniti, M. C., Maina, R., De Carlo, R. M., Sarzanini, C. and Tumiatti, V. , 2014. GC Methods for the determination of methanol and ethanol in insulating mineral oils as markers of cellulose degradation in power transformers. chromatographia, 77 (15–16), 1081–1089.
- Budak, H., 2009. Memeli Sirkadian Sisteminde Tip60 Geninin Karakterizasyonu. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Çalık, A., 2010. Optimization Of The Production Of *Trichoderma Reesei* Endoglucanase I In *Pichia pastoris*.(Y. Lisans Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Chang, C. H., Hsiung, H. A., Hong, K. L. and Huang, C. T. , 2018. Enhancing the efficiency of the *Pichia pastoris* AOX1 promoter via the synthetic positive feedback circuit of transcription factor Mxr1. BMC Biotechnology, 18 (1), 1–10.
- Cregg, J. and Tolstorukov, I. , 2012. *P. pastoris* ADH promoter and use thereof to direct expression of proteins, 2 (12).
- Cregg, J M, Madden, K. R., Barringer, K. J., Thill, G. P. and Stillman, C. A. , 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. Molecular and Cellular Biology, 9 (3), 1316–1323.
- Cregg, James M., Cereghino, J. L., Shi, J. and Higgins, D. R. , 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology, 16 (1), 23–52.
- Cregg and M., J. , 1999. Expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Gene Expression Systems. Retrieved from <http://ci.nii.ac.jp/naid/10015339126/en/>
- Dorokhov, Y. L., Komarova, T. V., Petrunia, I. V., Kosorukov, V. S., Zinovkin, R. A., Shindyapina, A. V., Frolova, O. Y. and Gleba, Y. Y. , 2012. Methanol may function as a Cross-Kingdom signal. PLoS ONE, 7 (4), 47–49.
- Fall, R. and Benson, A. A. , 1996. Leaf methanol - The simplest natural product from plants. Trends in Plant Science, 1 (9), 296–301.
- García-Ortega, X., Cámara, E., Ferrer, P., Albiol, J., Montesinos-Seguí, J. L. and Valero, F. , 2019. Rational development of bioprocess engineering strategies for recombinant protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) using the methanol-free GAP

- promoter. Where do we stand? *New Biotechnology*, 53 (August 2018), 24–34.
- Gietz, R. D. and Woods, R. A. , 2001. Genetic transformation of yeast. *BioTechniques*, 30 (4), 816–831.
- Goodrick, J. C., Xu, M., Finnegan, R., Schilling, B. M., Schiavi, S., Hoppe, H. and Wan, N. C. , 2001. High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system. *Biotechnology and Bioengineering*, 74 (6), 492–497.
- Griffith, F. , 1966. The significance of pneumococcal types. *Journal of Hygiene*, 64 (2), 129–175.
- Gummadi, S. N. and Panda, T. , 2003. Purification and biochemical properties of microbial pectinases - A review. *Process Biochemistry*.
- Güzel, M. and Akpınar, Ö. , 2017. Turunçgil kabuklarından elde edilen pektinlerin karakterizasyonu ve karşılaştırılması. *Akademik Gıda*, 15 (1), 17–17.
- Güzel, M., Taşan, N. T. and Akpınar, Ö. , 2020. Alternative pectin production methods and sources. *AGROFOR International Journal*, 5 (1), 38–45.
- He, D., Luo, W., Wang, Z., Lv, P. and Yuan, Z. , 2015. Combined use of GAP and AOX1 promoters and optimization of culture conditions to enhance expression of *Rhizomucor miehei* lipase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42 (8), 1175–1182.
- Herp, A., Rickards, T., Matsumura, G., Jakosalem, L. B. and Pigman, W. , 1967. Depolymerization of some polysaccharides and synthetic polymers by L-ascorbic acid. *Carbohydrate Research*, 4 (1), 63–71.
- Hüve, K., Christ, M. M., Kleist, E., Uerlings, R., Niinemets, Ü., Walter, A. and Wildt, J. , 2007. Simultaneous growth and emission measurements demonstrate an interactive control of methanol release by leaf expansion and stomata. *Journal of Experimental Botany*, 58 (7), 1783–1793.
- Inan, M. and Meagi-ier, M. M. , 2001. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) pro.pdf, 92 (6), 585–589.
- Invitrogen. , 2012. *Pichia Expression Kit: For expression of recombinant proteins in Pichia pastoris*, 1–97.
- Jacob, N. and Prema, P. , 2006. Influence of mode of fermentation on production of polygalacturonase by a novel strain of *Streptomyces lydicus*. *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2), 263–267.
- Jayani, R. S., Saxena, S. and Gupta, R. , 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40 (9), 2931–2944.
- Jungo, C., Schenk, J., Pasquier, M., Marison, I. W. and von Stockar, U. , 2007. A quantitative analysis of the benefits of mixed feeds of sorbitol and methanol for the production of recombinant avidin with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 131 (1), 57–66.
- Juturu, V. and Wu, J. C. , 2018. Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. *ChemBioChem*, 19 (1), 7–21.
- Karaaslan, A. , 2017. *Pichia pastoris* Mayalarından rekombinant ekspanzin üretiminin optimizasyonu. (Doktora Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.
- Karaoğlu, M. , 2012. *Pichia pastoris* Alkol Oksidaz (AOX1 Ve AOX2) genlerinin inaktif edilmesi ve elde edilen suşun rekombinant protein üretiminde kullanılması. (Yüksek Lisans Tezi), Antalya.

- Karbalaei, M., Rezaee, S. A. and Farsiani, H. , 2020. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of Cellular Physiology*, 235 (9), 5867–5881.
- 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*. (Y.Lisans Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- 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.
- Laemli, U. K. , 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature Publishing Group*, 228, 726–734. Retrieved from <http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-change-bimolecular-lipid-membrane-presence-certain-antibiotics/>
- Lai, J. Y., Klatt, S. and Lim, T. S. , 2019. Potential application of *Leishmania tarentolae* as an alternative platform for antibody expression. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39 (3), 380–394.
- Liu, H., Qin, Y., Huang, Y., Chen, Y., Cong, P. and He, Z. , 2014. Direct evaluation of the effect of gene dosage on secretion of protein from yeast *Pichia pastoris* by expressing EGFP. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24 (2), 144–151.
- Liu, Y., Pan, J., Wei, P., Zhu, J., Huang, L., Cai, J. and Xu, Z. , 2012. Efficient expression and purification of recombinant alcohol oxidase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17 (4), 693–702.
- Looser, V., Bruhlmann, B., Bumbak, F., Stenger, C., Costa, M., Camattari, A., Fotiadis, D. and Kovar, K. , 2014. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances*, 33 (6), 1177–1193.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B. and Harvey, L. M. , 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22 (4), 249–270.
- Mukaiyama, H., Giga-Hama, Y., Tohda, H. and Takegawa, K. , 2009. Dextran sodium sulfate enhances secretion of recombinant human transferrin in *Schizosaccharomyces pombe*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85 (1), 155–164.
- Niedenthal, R. K., Riles, L., Johnston, M. and Hegemann, J. H. , 1996. Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast*, 12 (8), 773–786.
- Nielsen, J. and Villadsen, J. , 1994. *Bioreaction Engineering Principles*. *Bioreaction Engineering Principles*.
- Öztürk, S., Ergün, B. G. and Çalık, P. , 2017. Double promoter expression systems for recombinant protein production by industrial microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101 (20), 7459–7475.
- Parashar, D. and Satyanarayana, T. , 2016. Enhancing the production of recombinant acidic α -amylase and phytase in *Pichia pastoris* under dual promoters [constitutive (GAP) and inducible (AOX)] in mixed fed batch high cell density cultivation. *Process Biochemistry*, 51 (10), 1315–1322.
- Patterson, G. H., Knobel, S. M., Sharif, W. D., Kain, S. R. and Piston, D. W. , 1997. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy.

- Biophysical Journal, 73 (5), 2782–2790.
- Payasi, A., Misra, P. C. and Sanwal, G. G. , 2006. Purification and characterization of pectate lyase from banana (*Musa acuminata*) fruits. *Phytochemistry*, 67 (9), 861–869.
- Penna, T. C. V., Ishii, M., Kunitura, J. S. and Cholewa, O. , 2005. Stability of recombinant green fluorescent protein (GFPuv) in glucose solutions at different concentrations and pH values. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 122 (1–3), 501–527.
- Porro, D. and Mattanovich, D. , 2004. Recombinant protein production in yeasts. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 267, 241–258.
- Prielhofer, R., Maurer, M., Klein, J., Wenger, J., Kiziak, C., Gasser, B. and Mattanovich, D. , 2013. Induction without methanol: Novel regulated promoters enable high-level expression in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 12 (1), 1–10.
- Savary, B. J. and Nuñez, A. , 2003. Gas chromatography-mass spectrometry method for determining the methanol and acetic acid contents of pectin using headspace solid-phase microextraction and stable isotope dilution. *Journal of Chromatography A*, 1017 (1–2), 151–159.
- Sears, I. B., O'Connor, J., Rossanese, O. W. and Glick, B. S. , 1998. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast*, 14 (8), 783–790.
- Şensoy gün, B. , 2019. Azurin proteininin *Pichia pastoris* ile rekombinant üretimi. (Y. Lisans Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- 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.
- Shirvani, R., Yazdanpanah, S., Barshan-tashnizi, M. and Shahali, M. , 2019. A Novel Methanol-Free Platform for Extracellular Expression of rhGM-CSF in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 61 (7), 521–527.
- Soyaslan, E. Ş. , 2010. Effect of Ph on erythropoietin production by recombinant *Pichia pastoris* in fed-batch operation. (Y. Lisans Tezi), Ankara.
- Syeitkhajy, A. , 2017. Turunçgil kabuklarından modifiye pektin ve pektin ekstraksiyonu. İstanbul Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı.
- Takagi, S., Tsutsumi, N., Terui, Y. and Kong, X. , 2012. Method for methanol independent induction from methanol inducible promoters in *Pichia*, 2 (12).
- Thorpe, E. D., D'Anjou, M. C. and Daugulis, A. J. , 1999. Sorbitol as a non-repressing carbon source for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 21 (8), 669–672.
- Tschopp, J. F., Brust, P. F., Cregg, J. M., Stillman, C. A. and Gingeras, T. R. , 1987. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Research*, 15 (9), 3859–3876.
- Tsien, R. Y. , 1998. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 509–544.
- Uçan, F. and Akyıldız, A. , 2012. Meyve suyu sanayiinde enzimatik uygulamalar. *Gıda*, 37 (6), 363–370.
- Uehara, H., Choi, D. B., Park, E. Y. and Okabe, M. , 2000. Expression of mouse α -amylase gene in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 5 (1), 7–12.

- Ünver, Y. , 2014. İnsan Paraoksonaz 1 (Pon1) geninin klonlanması, *Pichia pastoris*'te ekspresyonu, rekombinant enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu. (Doktora Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- 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*. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 48 (6), 535–540.
- Van Der Klei, I. J., Harder, W. and Veenhuis, M. , 1991. Biosynthesis and assembly of alcohol oxidase, a peroxisomal matrix protein in methylotrophic yeasts: A review. Yeast, 7 (3), 195–209.
- Viseux, N., De Hoffmann, E., Domon, B., Ralet, M.-C., Cabrera, Juan Carlos Bonnin, E., Quemener, B., Hellin, P., Thibault, J.-F., Körner, R., Limberg, G., Christensen, T. M. I. E., Mikkelsen, J. D. and Roepstorff, P. , 2005. Mapping sugar beet pectin acetylation pattern. Phytochemistry, 66 (7), 1832–1843.
- Wang, J., Wang, X., Shi, L., Qi, F., Zhang, P., Zhang, Y., Zhou, X., Song, Z. and Cai, M. , 2017. Methanol-Independent Protein Expression by AOX1 Promoter with trans-Acting Elements Engineering and Glucose-Glycerol-Shift Induction in *Pichia pastoris*. Scientific Reports, 7 (February), 1–12.
- Wu, J. M., Lin, J. C., Chieng, L. L., Lee, C. K. and Hsu, T. A. , 2003. Combined use of GAP and AOX1 promoter to enhance the expression of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in *Pichia pastoris*. Enzyme and Microbial Technology, 33 (4), 453–459.
- Xie, J., Zhou, Q., Du, P., Gan, R. and Ye, Q. , 2005. Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiostatin production. Enzyme and Microbial Technology, 36 (2–3), 210–216.
- Yıldız, Ş. , 2020. Manyetik nanopartikül aracılığıyla *Pichia pastoris*'e yeni bir gen aktarım yönteminin geliştirilmesi. (Y.Lisans Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Zhou, X. S. and Zhang, Y. X. , 2002. Decrease of proteolytic degradation of recombinant hirudin produced by *Pichia pastoris* by controlling the specific growth rate. Biotechnology Letters, 24 (17), 1449–1453.
- Zhu, T., Hang, H., Chu, J., Zhuang, Y., Zhang, S. and Guo, M. , 2013. Transcriptional investigation of the effect of mixed feeding to identify the main cellular stresses on recombinant *Pichia pastoris*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 40 (2), 183–189.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	: Betül ARI
Doğum tarihi	:
Doğum Yeri	:
Uyruğu	:
Adres	:
Tel	:
E-mail	:
Eğitim	
Lise	:
Lisans	:
Yüksek lisans	:
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce	: