

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

***Pichia pastoris* ALKOL DEHİDROGENAZ (ADH3) PROMOTORU ÜZERİNE  
ÇALIŞMALAR**

**Fidan ERDEN KARAOĞLAN**

**DOKTORA TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**2016**



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

***Pichia pastoris* ALKOL DEHİDROGENAZ (ADH3) PROMOTORU ÜZERİNE  
ÇALIŞMALAR**

**Fidan ERDEN KARAOĞLAN**

**DOKTORA TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez çalışması Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FDK-2015-691 no'lu proje ve TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığı (ARDEB) tarafından 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı kapsamında 215Z116 no'lu proje ile desteklenmiştir.**

**2016**



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

***Pichia pastoris* ALKOL DEHİDROGENAZ (ADH3) PROMOTORU ÜZERİNE  
ÇALIŞMALAR**

**Fidan ERDEN KARAOĞLAN**

**DOKTORA TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 14/06/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet İNAN (Danışman) .....

Prof. Dr. Pınar ÇALIK .....

Doç. Dr. İrfan TURHAN .....

Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU .....

Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN .....



## ÖZET

### ***Pichia pastoris* ALKOL DEHİDROGENAZ (ADH3) PROMOTORU ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

**Fidan ERDEN KARAOĞLAN**

**Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Mehmet İNAN**

**Haziran 2016, 65 sayfa**

*Pichia pastoris*, biyoteknoloji, ilaç endüstrisi ve akademik araştırmacılar tarafından yaygın olarak tercih edilen ökaryotik bir ekspresyon sistemidir. Son zamanlarda, *P. pastoris* üzerine, hem endüstriyel ölçekte hem de araştırma laboratuvarları tarafından yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak, hala *P. pastoris* metabolizmasında açıklığa kavuşmamış veya tam olarak bilinmeyen mekanizmalar vardır. Bunlardan biri de etanol metabolizmasının düzenlenmesidir. *P. pastoris*'in etanol metabolizmasında rol alan başlıca *ADH* genleri önceki çalışmamızda tarafımızdan tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu genlerden, etanol tüketiminden sorumlu olduğu belirlenen ve etanol içeren besiyerinde yüksek seviyede ekspres olan *ADH3* geninin promotörü üzerine moleküler düzeyde bir çalışma bulunmamakta ve *ADH3* promotörünün regülasyonu bilinmemektedir.

Bu çalışmada *P. pastoris ADH3* promotöründe silme analizleri ile aktivasyonundan ve represyonundan sorumlu düzenleyici DNA bölgeleri araştırılmıştır. Promotor aktivitesini arttırıcı aktivatör bölgeleri ilave edilmesi ve promotör aktivitesini azaltıcı represör bölgelerin silinmesi ile beş farklı sentetik promotör oluşturulmuş ve en yüksek aktiviteye sahip sentetik promotör fermentör koşullarında doğal *ADH3* promotörü ile karşılaştırılmıştır.

**ANAHTAR KELİMELER:** *Pichia pastoris*, *ADH3* promotörü, sentetik promotör, promotör analizi, fermentasyon

**JURİ:**  
**Prof. Dr. Mehmet İNAN**  
**Prof. Dr. Pınar ÇALIK**  
**Doç. Dr. İrfan TURHAN**  
**Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU**  
**Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN**

## ABSTRACT

### STUDIES ON *Pichia pastoris* ALCOHOL DEHYDROGENASE (*ADH3*) PROMOTER

Fidan ERDEN KARAOĞLAN

PhD Thesis in Food Engineering  
Supervisor: Prof. Dr. Mehmet INAN  
June 2016, 65 pages

*P.pastoris* is widely used as an eukaryotic expression system by biotechnology, pharmaceutical industry and academic researchers. Recently, there are a number of studies on *P. pastoris* at laboratory and industrial scale. However, some mechanisms of *P.pastoris* are still unknown or not clear. One of these unexplored mechanisms is the regulation of ethanol metabolism. *ADH* genes which involves in *P.pastoris* ethanol metabolism were identified and characterized in our previous study. The gene responsible for consumption of ethanol was determined as the *ADH3* gene and it was highly expressed on ethanol as substrate source. However, the regulation of the *ADH3* promoter at molecular level is not known yet.

In this study, regulatory DNA regions that are responsible for activation and repression of the *ADH3* promoter of *P. pastoris* were investigated by deletion analyses. Five different synthetic promoter were constructed by adding up-regulatory sites and deletion of down-regulatory sites and the best synthetic promoter which had highest activity was compared with the native *ADH3* promoter at fermentor scale.

**KEYWORDS:** *Pichia pastoris*, *ADH3* promoter, synthetic promoter, promoter analysis, fermentation

**COMMITTEE:** Prof. Dr. Mehmet INAN  
Prof. Dr. Pınar ÇALIK  
Assoc. Prof. Dr. Irfan TURHAN  
Assoc. Prof. Dr. Muhittin ARSLANYOLU  
Asst. Prof. Dr. Cengiz İKTEN



## ÖNSÖZ

Moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler son yirmi yılda ivme kazanmıştır. Kaydedilen bu ilerlemeler, moleküler biyoloji uygulamalarının kullanıldığı birçok alanı da etkilemeye devam etmektedir.

Bu çalışmada rekombinant protein üretiminde yaygın olarak kullanılan bir konukçu organizma olan *Pichia pastoris*'in alkol dehidrogenaz (*ADH3*) promotörü araştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar bu konukçu sistemin geliştirilmesine yönelik önemli veriler sunmuştur ve gelecek çalışmalara da yol gösterici niteliktedir.

Bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren ve desteğini hiç esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet İNAN'a, bu çalışmaya olan katkılarından dolayı ve ayrıca bizim için sağlamış olduğu çalışma koşulları için saygılarımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez İzleme Kurulunda bulunan Sayın Doç. Dr. İrfan TURHAN ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN hocalarıma ve diğer tez jüri üyeleri Sayın Prof. Dr. Pınar ÇALIK ve Sayın Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU hocalarıma destekleyici ve yönlendirici katkılarından dolayı saygılarımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çıktığımız bu yolun her adımında yanımda olan, yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen eşim, çalışma arkadaşım Mert KARAOĞLAN'a sonsuz teşekkür ediyorum. Başarılarının ve başarılarımızın bir ömür boyu sürmesi dileğiyle.

Benden hiçbir desteğini esirgemeyen aileme sağladığı imkanlar için sonsuz ederim.

Canım arkadaşım Semiramis YILMAZ'a, her zaman yanımda olduğu için, desteği ve paylaşımları için çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca anlayış ve destekleri için, değerli tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Doktora öğrenimim boyunca, 2211-A Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (TÜBİTAK-BİDEB) teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ .....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI .....	3
3. MATERYAL ve METOT .....	9
3.1. Materyal .....	9
3.1.1. Suşlar, plazmitler ve besiyerleri.....	9
3.1.2. Kimyasallar ve enzimler .....	9
3.1.3. Primerler.....	9
3.2. Metot.....	9
3.2.1. Genel moleküler biyoloji teknikleri .....	9
3.2.1.1. DNA izolasyonu.....	10
3.2.1.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).....	10
3.2.1.3. Agaroz jel elektroforezi .....	11
3.2.1.4. <i>E. coli</i> ve <i>P. pastoris</i> hücrelerinin transformasyona yetenekli hale getirilmesi.....	11
3.2.1.5. DNA parçalarının plazmide ligasyonu.....	12
3.2.1.6. <i>E. coli</i> ve <i>P. pastoris</i> hücrelerine transformasyon .....	12
3.2.1.7. Southern blot analizi .....	12
3.2.1.8. SDS-PAGE analizi .....	13
3.2.2. Diğer biyokimyasal analizler .....	14
3.2.2.1. Ksilanaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....	14
3.2.2.2. Toplam protein ölçümü.....	14
3.2.3. <i>ADH3</i> promotor bölgesinin belirlenmesinde sondan silme analizi.....	14
3.2.4. <i>ADH3</i> promotorunun düzenlenmesinden sorumlu bölgelerin belirlenmesinde içten silme analizi .....	18
3.2.5. Sentetik <i>ADH3</i> promotorlarının oluşturulması .....	19
3.2.6. Erlenmayer koşullarında protein üretimi .....	20
3.2.7. Fermentör çalışmaları .....	21
3.2.8. İstatistiksel analiz.....	22

4. BULGULAR .....	23
4.1. <i>ADH3</i> Promotor Bölgesinin Belirlenmesi.....	23
4.1.1. Sondan silme analizi için ekspresyon plazmitlerinin elde edilmesi ve <i>P. pastoris</i> 'e transformasyonu .....	23
4.1.2. Sondan silme klonlarının Southern blot analizi .....	26
4.1.3. Sondan silme klonları ile erlenmayer koşullarında protein üretimi .....	28
4.2. <i>ADH3</i> Promotorunun Düzenlenmesinden Sorumlu DNA Bölgelerinin Belirlenmesi .....	30
4.2.1. İçten silme analizi için ekspresyon plazmitlerinin elde edilmesi ve <i>P. pastoris</i> 'e transformasyonu .....	30
4.2.2. İçten silme klonlarının Southern blot analizi .....	34
4.2.3. İçten silme klonları ile erlenmayer koşullarında protein üretimi .....	36
4.3. Sentetik Promotorların Oluşturulması.....	38
4.4. Fermentör Çalışmaları.....	43
4.5. <i>ADH3</i> Promotoru Üzerine Glukozun Etkisi.....	48
5. TARTIŞMA.....	50
6. SONUÇLAR .....	53
7. KAYNAKLAR.....	54
8. EKLER .....	59
EK 8.1. Primer Listesi .....	59
EK 8.2. Toplam Protein Miktarının Hesaplanmasında Kullanılan Standart Protein (BSA) Kurvesi.....	60
EK 8.3. <i>ADH3</i> Promotoru Sekansı.....	61
EK 8.4. Sentetik Promotorların DNA Dizileri .....	62
EK 8.5. Sondan silme ve içten silme analizleri ile elde edilen aktivite sonuçlarının şematik gösterimle özeti.....	64
EK 8.6. Sentetik promotorlarla elde edilen aktivite sonuçlarının şematik gösterimle özeti .....	65
ÖZGEÇMİŞ	

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

g	Göreceli santrifüj kuvveti
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
J	Joule
m	Mili ( $10^{-3}$ )
L	Litre
M	Molar
n	Nano ( $10^{-9}$ )
OD	Optik yoğunluk (Optical Density)
T <sub>m</sub>	Erime sıcaklığı
U	Ünite
V	Volt
$\infty$	Sonsuz
kDa	Kilo Dalton

### Kısaltmalar

bç	Baz çifti
BSA	Bovine serum albumin
BMGY	tamponlanmış kompleks gliserol besiyeri (buffered glycerol complex medium)
BMEY	tamponlanmış kompleks etanol besiyeri (buffered glycerol complex medium)
dak	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DIG	Digoksinin
LB	Luria-Bertani
MD	Temel glukoz besiyeri (minimal dekstroz)
ME	Temel etanol besiyeri (minimal ethanol)
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
SSC	Tuzlu sodyum sitrat (Saline sodium citrate)
TAE	Tris asetat EDTA
TGS	Tris-Glisin-EDTA
TE	Tris-EDTA
YNB	Maya azot kaynağı
YPD	Maya pepton dekstroz
sn	Saniye

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. <i>ADH3</i> Promotorun yaklaşık olarak belirlenmesinde sondan silme analizinin şematik gösterimi.....	15
Şekil 3.2. <i>ADH3</i> promotor bölgesinin belirlenmesinde sondan silme analizinin şematik gösterimi .....	15
Şekil 3.3. Çalışmada ekspresyon vektörlerinin oluşturulmasında kullanılan genel klonlama stratejisi .....	17
Şekil 3.4. Overlap PZR yönteminin şematik gösterimi.....	18
Şekil 3.5. İçten silme analizinin şematik gösterimi.....	19
Şekil 3.6. Sentetik promotorların şematik gösterimi.....	20
Şekil 4.1. <i>ADH3</i> promotorunun 2000, 1500, 1000 ve 500 bç uzunluğundaki PZR ürünlerinin jelden kesilmesi .....	23
Şekil 4.2. <i>AOX1</i> promotoru düşürülmüş pPICZαA plazmidinin jelden kesilmesi.....	24
Şekil 4.3. pADH3ZαA-2000, 1500, 1000 ve 500 plazmitlerinin XhoI-SmaI kesimi sonucu <i>ADH3</i> promotorunu içeren kısmının jelden kesilmesi.....	24
Şekil 4.4. pPICZαA-XylB/HIS4 plazmidinin XhoI-SmaI kesimi sonucu <i>XylB</i> ve <i>HIS4</i> genini içeren kısmının jelden kesilmesi .....	25
Şekil 4.5. <i>ADH3</i> promotorunun sondan silme analizi için çoğaltılan PZR ürünlerinin jel görüntüsü (sırasıyla 1400, 1300, 1200, 1100, 900, 800, 700, 600, 400, 300, 200, 100 bç).....	25
Şekil 4.6. Doğrusal hale getirilen pADH3ZαA-XylB/HIS4 plazmitlerinin jel görüntüsü.....	26
Şekil 4.7. <i>HIS4</i> bölgesinden elde edilen probun etkinlik analizi a) DIG etiketli DNA standardı b) <i>HIS4</i> probu .....	26
Şekil 4.8. Sondan silme klonlarının Southern blot jeli görüntüsü.....	27
Şekil 4.9. Sondan silme analizinde gen kopya sayısının Southern blot ile doğrulanması .....	28
Şekil 4.10. <i>ADH3</i> promotor bölgesinin yaklaşık olarak belirlenmesi.....	29
Şekil 4.11. <i>ADH3</i> promotor bölgesinin belirlenmesi .....	30
Şekil 4.12. İçten silme analizlerinde sol bölgesinin (5') PZR ürünleri (Sırası ile B-K).....	31
Şekil 4.13. İçten silme analizlerinde sağ bölgenin (3') PZR ürünleri (A-K).....	32
Şekil 4.14. İçten silme analizlerinde sağ ve sol parçaların birleştirilmesi ile elde edilen mutant <i>ADH3</i> promotorları (Sırası ile ΔA-ΔK).....	33
Şekil 4.15. Doğrusal hale getirilen pADH3ZαA-Δ-XylB/HIS4 plazmitlerinin jel görüntüsü .....	34
Şekil 4.16. Sondan silme klonlarının Southern blot jeli görüntüsü .....	35
Şekil 4.17. İçten silme analizinde gen kopya sayısının Southern blot ile doğrulanması .....	36
Şekil 4.18. <i>ADH3</i> promotorunun içten silme klonları ile elde edilen ksilanaz aktiviteleri (Kontrol: 900 bç uzunluğundaki <i>ADH3</i> promotoru).....	37

Şekil 4.19. Mutant $\Delta 700-400$ bölgesinin elde edilmesinde kullanılan sol (5') ve sağ (3') overlap PZR bölgeleri .....	38
Şekil 4.20. Mutant $\Delta 700-400$ klonunun Southern blot analizi film görüntüsü .....	38
Şekil 4.21. İçten silme analizleri doğrultusunda aktivatör ve represör bölgelerin belirlenmesi .....	39
Şekil 4.22. Sentetik promotorların şematik gösterimi.....	39
Şekil 4.23. Sentetik <i>ADH3</i> promotorlarının Southern blot analizi: örneklerin agaroz jel görüntüsü ve X-ışını film görüntüsü (1-2: <i>ADH3-SNT1</i> , 3-4: <i>ADH3-SNT2</i> , 5-6: <i>ADH3-SNT3</i> ; 7-8: <i>ADH3-SNT4</i> , 9-10: <i>ADH3-SNT5</i> ).....	41
Şekil 4.24. Sentetik <i>ADH3</i> promotorları ile elde edilen ksilanaz aktiviteleri .....	42
Şekil 4.25. <i>ADH3</i> promotoru (900 bç) ve sentetik promotorlar ile erlenmayer koşullarında ksilanaz üretiminin SDS-PAGE görüntüsü .....	42
Şekil 4.26. Fermentör koşullarında yaş hücre ağırlığının zamanla değişimi .....	44
Şekil 4.27. Fermentör koşullarında süpernatant örneklerinde ölçülen toplam protein miktarının zamanla değişimi .....	44
Şekil 4.28. Fermentör koşullarında süpernatant örneklerinde ölçülen ksilanaz aktiviteleri .....	45
Şekil 4.29. Fermentör koşullarında 900 bç <i>ADH3</i> promotoru süpernatant örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü .....	45
Şekil 4.30. Fermentör koşullarında <i>SNT5</i> promotoru süpernatant örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü .....	46
Şekil 4.31. Erlenmayer koşullarında hücre OD değerlerinin zamanla değişimi .....	47
Şekil 4.32. Erlenmayer koşullarında süpernatant örneklerinde ölçülen ksilanaz aktiviteleri .....	47
Şekil 4.33. <i>ADH3</i> promotoru üzerine glukozun etkisi .....	49

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>P. pastoris</i> promotorları, regülasyonları ve ekspresyon seviyeleri (Vogl ve Glieder 2013).....	5
Çizelge 3.1. PZR reaksiyon karışımı .....	10
Çizelge 3.2. PZR ısı döngü programında uygulanan sıcaklık ve süre koşulları .....	10
Çizelge 3.3. PTM1 tuzlarının bileşimi .....	21
Çizelge 4.1. Fermentör örneklerinde (900p ve SNT5p) zamana karşı yaş hücre ağırlığı, protein miktarı ve ksilanaz aktivitesi değerleri.....	46
Çizelge 4.2. Erlenmayer örneklerinde (900p ve SNT5p) zamana karşı OD ve ksilanaz aktivitesi değerleri.....	48







## 1. GİRİŞ

*Pichia pastoris* rekombinant protein üretimlerinde oldukça başarılı bir ekspresyon sistemidir. Bu ekspresyon sisteminin tercih edilmesinde etken olan avantajlarının başında yüksek hücre yoğunluklarına ulaşabilmesi ve rekombinant proteinleri yüksek seviyede salgıyabilmesi gelmektedir. *P. pastoris* ile rekombinant protein üretiminde en yaygın kullanılan promotör metanol ile indüklenebilen *AOX1* promotörüdür.

*P. pastoris* ekspresyon sistemini daha etkin ve verimli şekilde kullanmaya yönelik çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmalar arasında mevcut promotörlerin geliştirilmesi ve alternatif promotör arayışları da yer almaktadır.

Önceki çalışmamız olan 111T905 no'lu Tübitak projesinin sonuçları bu tez çalışmasının yapılmasına ışık tutmuştur. Tamamlanan projede, *P. pastoris* etanol metabolizmasında rol oynayan *ADH* genleri tespit edilmiş (*ADH2* ve *ADH3*) ve tanımlanan genlerden biri olan ve etanol içeren besiyerinde yüksek ekspresyon gösteren *ADH3* geninin regülasyonundan sorumlu *ADH3* promotörünün rekombinant protein üretiminde kullanılabilirliği test edilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar *ADH3* geninin *P. pastoris* etanol metabolizmasında etanolün katabolize (parçalanması) edilmesinde görev alan tek gen olduğunu göstermiştir (Karaoglan vd 2016a). Ayrıca alkol dehidrogenaz 3 (*ADH3*) genini kontrol eden %100 aktiviteye sahip en kısa promotör bölgesi henüz bilinmediği için promotör bölgesi rastgele 1200 bp alınmış ve fermentör ortamında bu promotör kullanılarak gerçekleştirilen rekombinant protein üretimi *P. pastoris* *AOX1* ve *GAP* promotörleri ile karşılaştırılmıştır (Karaoglan vd 2016b). *ADH3* promotörü ile rekombinant protein üretiminin *AOX1* ve *GAP* promotörüne göre sırasıyla yaklaşık 2 ve 6 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, *ADH3* promotörünün *P. pastoris* ile rekombinant protein üretimlerinde kullanılabilen alternatif bir promotör olabileceğini ortaya koymuştur.

Literatürde *ADH3* geninin isimlendirilmesinde farklılıklar görülmektedir. *P. pastoris* GS115 ve *P. pastoris* DSMZ 70382 suşlarının genom dizilişleri yakın zamanda ortaya çıkarılmış ve bir tane alkol dehidrogenaz enzimini kodlayan gen tanımlanabilmiştir (De Schutter vd 2009, Mattanovich vd 2009). Aynı gen dizisi, US 8,222,386 no'lu patentte *ADH1* geni olarak ve bu genin regülasyonundan sorumlu promotör bölgesi de *ADH1* promotörü olarak isimlendirilmişken (Cregg ve Tolstorukov 2008), ikinci bir genom (DSMZ 70382 suşu) dizilişinde de *ADH2* olarak isimlendirilmiştir (Mattanovich vd 2009). Ancak NCBI veri tabanında bu gen, *S. cerevisiae*'in Adh3 amino asit dizilimine benzerliğinden dolayı *P. pastoris*'te (GS115 suşu) *ADH3* olarak tanımlanmış ve isimlendirilmiştir (De Schutter vd 2009). Yukarıda bahsedilen bütün genler aynı gen dizisine sahiptir. Önceki çalışmalarımızda ve bu çalışmada veri tabanı isimlendirmesi esas alınmış ve *ADH3* promotörü olarak kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasının konusu, *P. pastoris* etanol metabolizmasında etanol tüketiminden sorumlu olan Alkol Dehidrogenaz 3 (*ADH3*) geninin regülasyonundan sorumlu *ADH3* promotörünün %100 olarak aktivite gösterdiği en kısa DNA bölgesinin belirlenmesi, pozitif ve negatif düzenleyici bölgelerinin tespit edilmesi ve bu bölgelerin

modifikasyonu ile farklı sentetik promotorlar elde edilmesidir. Bu amaçla *P. pastoris ADH3* promotorunun sondan silme analizleri ile tam promotor aktivitesinden sorumlu en kısa DNA bölgesi belirlenmiştir. Belirlenen *ADH3* promotor bölgesinde içten silme analizleri gerçekleştirilerek promotorun pozitif ve negatif regülasyonundan sorumlu DNA bölgeleri tespit edilmiştir. Elde edilen veriler sentetik promotorların oluşturulmasında araç olarak kullanılacak farklı özellikte sonuçlar veren DNA bölgeleri sunmaktadır. Bunun sonucunda beş farklı sentetik promotor oluşturulmuştur ve rekombinant protein üretimlerinde test edilmiştir.



## 2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

Rekombinant protein üretiminde, kolay ve ucuz olması sebebi ile ilk tercih genellikle prokaryotik ekspresyon sistemleri olmaktadır. Ancak ökaryotik proteinlerin prokaryotik sistemlerde üretimi sırasında üretilen proteinin stabil olmaması ya da biyolojik aktivitesini yerine getirememesi gibi problemlerle karşılaşılabilir. Mayaların hücre içi ortamı, ökaryotik proteinlerin doğru şekilde katlanması için prokaryotik sistemlere göre daha uygundur (Cregg vd 1987). Ökaryotik ekspresyon sistemi olan mayalar, ökaryotik proteinler için elzem olan translasyon sonrası biyokimyasal reaksiyonları (disülfid bağı oluşumu, glikozilasyon gibi) gerçekleştirebilirler (Cregg 2007). Ayrıca genetik manipülasyonları da bakteriler kadar kolaydır. Tüm bu sebeplerden dolayı ökaryotik proteinlerin üretimi için mayalar büyük bir avantaj sağlamaktadır.

*Saccharomyces cerevisiae*, kullanılan ilk ökaryotik ekspresyon sistemidir. Genetiği ve fizyolojisi ile ilgili çok fazla bilgi bulunması nedeniyle en yaygın kullanılan ökaryotik konukçu durumundadır. Fakat her zaman en uygun ekspresyon sistemi olarak kullanılamamaktadır. *S. cerevisiae* ile rekombinant protein üretiminde; büyük ölçekli üretimlerde plazmit kaybı, hiperglikozilasyon ve düşük verim gibi dezavantajları vardır (Romanos vd 1992). Son zamanlarda *S. cerevisiae*'ya alternatif olarak metilotrofik bir maya olan *P. pastoris* geliştirilmiştir (Cregg vd 1993). Ökaryotik bir mikroorganizma olan *P. pastoris*, maya olarak *S. cerevisiae*'ın moleküler ve genetik manipülasyonlar bakımından avantajlarına sahip olmakla birlikte *S. cerevisiae*'ya göre daha verimli bir konukçu sistemdir (Balamurugan vd 2007). *P. pastoris* özellikle endüstriyel alanda rekombinant protein üretimi için mükemmel bir konukçu durumundadır (Daly ve Hearn 2005, Jungo vd 2007).

Metilotrofik bir maya olan *P. Pastoris* ilk olarak 1970'li yıllarda Phillips Petrol Şirketi (Bartlesville, Oklahoma, ABD) tarafından metan gazının tek hücre proteinine dönüştürülmesinde kullanılmış ve şirket tarafından litrede 130 gramdan daha çok kuru hücre yoğunluklarına ulaşılabilen fermentasyon prosesi geliştirilmiştir. Ancak 1973'te petrol krizinden sonra metanol maliyetinin artması ekonomik tek hücre proteini üretiminin de sonu olmuştur (Ahmad vd 2014) ve sonraki yıllarda çalışmalar *P. pastoris*'in rekobinant protein üretiminde konukçu olarak geliştirilmesine yönelmiştir. *AOX1* promotorunun kontrolü altında, tek hücre proteini üretimi için geliştirilmiş fermentasyon metotları ile kombine edilerek gerçekleştirilen bu çalışmalardan oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Cereghino ve Cregg 2000). Rekombinant protein üretiminde ilk defa Tschopp vd (1987) tarafından kullanılan *AOX1* promotoru günümüzde dahi en yaygın kullanılan *P. pastoris* promotorudur.

*P. pastoris*, metanol besiyerinde gelişimi sırasında, alkol oksidaz gibi enzimlere yüksek gereksinim duymaktadır (Porro vd 2005). *P. pastoris* genomunda alkol oksidaz geninin *AOX1* ve *AOX2* olmak üzere iki kopyası bulunmaktadır. *AOX1*, hücrede alkol oksidaz aktivitesinin %85'inden sorumludur ve güçlü bir promotora sahiptir. *P. pastoris* ile rekombinant protein üretiminde, en yüksek ekspresyon seviyesi (hücre içi üretimde 22g/L; hücre dışı üretimde 15 g/L seviyelerine kadar) *AOX1* promotoru ile sağlanmıştır (Vogl ve Glieder 2013). Buna ilaveten yapısal bir promotor olan *GAP* (gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) promotoru da *P. pastoris* ile rekombinant protein üretiminde

yaygın kullanılan diğeri bir promotordur (Inan ve Meagher 2001, Cregg 2007). Fakat hücrede yabancı bir proteinin yapısal (constitutive) olarak ifade edilmesi toksik etki yaratabileceğinden, *GAP* promotorunun kullanımı *AOXI* promotoru kadar yaygın değildir (Cereghino ve Cregg 2000).

İndüklenebilen promotorlar ile rekombinant protein üretimi sırasındaki gen ekspresyonu, indüklemeye/baskılama yolu ile kontrol edilebilir. Biyokütle birikimi ve rekombinant protein üretimi aşamalarının ayrı olması indüklenebilir promotorların pratik uygulamalardaki başlıca avantajıdır ve bu durum toksik proteinlerin üretilmesinde de avantaj sağlamaktadır (Macauley-Patrick vd 2005, Ahmad vd 2014, Weinhandl 2014).

Metanol izyolunda bulunan indüklenebilir diğeri güçlü promotor *FLDI* promotorudur. Formaldehit dehidrogenaz enzimini kodlayan genin regülasyonundan sorumlu olup, karbon kaynağı olarak metanol veya azot kaynağı olarak metilamin tarafından indüklenebilmektedir (Shen vd 1998). Metanol ve oleik asit ile indüklenebilen *PEX8* ve etanol ile indüklenebilen *ICLI* promotorları da indüklenebilir *P. pastoris* promotorlarıdır. Ancak ekspresyon seviyelerinin düşük olması sebebiyle bu promotorların kullanımı yaygınlaşmamıştır (Potvin vd 2012).

*P. pastoris*'te gliserol koşullarında *GCW14* olarak adlandırılan (glikozil fosfatidil inositolü kodlayan) genin en yüksek seviyede ifade edildiği gözlenmiştir. Karbon kaynağı gliserolden metanole değiştiğinde ise ekspresyon seviyesinin *AOXI*'e göre çok az olduğu ancak diğeri genlere göre belirgin düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir ve bu sonuçlar *GCW14*'ün güçlü promotora sahip olabileceğini düşündürmüştür. Reporter gen olarak EGFP kullanılarak promotor aktivitesi test edilmiş ve bilinen güçlü yapısal promotorlar (*P<sub>TEF1</sub>* ve *P<sub>GAP</sub>*) ile karşılaştırıldığında kayda değer düzeyde daha güçlü promotor aktivitesi sergilediği ortaya konulmuştur (Liang vd 2013).

Literatürde bulunan alternatif *P. pastoris* promotorları ve yaklaşık ekspresyon seviyeleri Çizelge 2.1'de özetlenmiştir. Bu promotorların yaklaşık ekspresyon seviyeleri, *GAP* ve *AOXI* promotorlarının ekspresyon seviyelerine oranla verilmiştir. Farklı kültür koşullarında ölçülen ekspresyon seviyeleri aralıklar halinde verilmiştir.

*P. pastoris* ile rekombinant protein üretiminde kullanılan alternatif promotorlar arasında indüklenebilir heterolog promotorlar da bulunmaktadır. *S. cerevisiae* *CUP1* promotorunun *P. pastoris*'te aktif olarak çalışabildiği ve farklı  $Cu^{2+}$  konsantrasyonları ile istenilen seviyelerde indüklenebildiği gösterilmiştir (Koller vd 2000). Çalışmada 30 kat aktiviteye kadar aşamalı indüksiyon gerçekleştirilebilmiştir. Chien ve Lee (2005) mikroaerobik olarak indüklenen *P. stipitis* *ADH2* promotorunun *P. pastoris*'te indüklenebildiğini ve %5 hava doygunluğunda (air saturation) %60 hava doygunluğuna göre 24 kat daha yüksek rekombinant protein üretimi gerçekleştiğini göstermişlerdir.

Çizelge 2.1. *P. pastoris* promotorları, regülasyonları ve ekspresyon seviyeleri (Vogl ve Glieder 2013)

Gen adı	Gen ürünü	Regülasyonu	Ekspresyon seviyesi
<i>AOX1</i>	Alkol oksidaz 1	Metanol induksiyonu	Güçlü (toplam mRNA'nın yaklaşık %5'i; toplam proteinin yaklaşık %30'u düzeyinde)
<i>GAP</i>	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz	Yapısal	Güçlü ( <i>AOX1</i> promotoruna benzer)
<i>AOX2</i>	Alkol oksidaz 2	Metanol induksiyonu	%5-10 ( $P_{AOX1}$ )
<i>DAS</i>	Dihidroksiaseton sentaz	Metanol induksiyonu	Güçlü ( $P_{AOX1}$ 'e benzer)
<i>ENO1</i>	Enolaz	Yapısal	%20-70 ( $P_{GAP}$ )
<i>FLD1</i>	Formaldehit dehidrogenaz	Metanol ve metilamin induksiyonu	Güçlü ( $P_{AOX1}$ 'e benzer)
<i>GPM1</i>	Fosfogliserat mutaz	Yapısal	%15-40 ( $P_{GAP}$ )
<i>PET9</i>	İç mitokondiyal membranda ADP/ATP taşıyıcı	Yapısal	%10-1700 ( $P_{GAP}$ )
<i>PEX8</i>	Peroksizomal matriks proteini	Metanol veya oleat induksiyonu	Zayıf
<i>TEF1</i>	Translasyon uzama faktörü 1a	Yapısal	Güçlü ( $P_{GAP}$ 'a benzer)
<i>THI1</i>	Tiamin biyosentezinde görev alan protein	Tiamin tarafından tamamen baskılanır	%70 ( $P_{GAP}$ ) (tiamin bulunmayan ortamda)

*P. pastoris* ekspresyon sistemini daha etkin ve verimli şekilde kullanmaya yönelik çalışmalar devam etmektedir (d'Anjou ve Daugulis 2001, Dietzsch vd 2001, Potgieter vd 2009, Wang vd 2012). Doğal promotorlarda genetik modifikasyonlar yapılarak, mevcut bu promotorların kullanım amacına yönelik geliştirilmesi bu çalışmalar arasındadır (Cos vd. 2006). Bu sayede ilgili promotor kullanılarak yabancı bir proteinin ekspresyonu artırılarak ya da azaltılarak istenilen şekilde

yönlendirilebilmektedir. Güçlü promotorlar, toksik olmayan proteinlerin ekspresyon kaseti kopya sayısı düşük olan klonlarda bile yüksek ekspresyonuna olanak sağlarken; zayıf promotorlar ile de hücre için toksik proteinler başarılı bir şekilde üretilebilmektedir. Ayrıca, farklı güçlerde promotorlardan oluşan promotor kütüphaneleri, genotip-fenotip karakterizasyonu ve istenilen protein verimi için optimum gen ekspresyon seviyesinin belirlenmesinde önemli araçlardır. Alper vd (2005) fosfoenolpirüvat karboksilaz seviyesinin üreme verimi ve deoksi-ksilüloz-P sentaz seviyesinin likopen üretimi üzerine etkisini karakterize edilmiş promotor kütüphanesi kullanarak belirlemişlerdir.

Hartner vd (2008) tarafından yapılan çalışmada *AOX1* promotoru üzerinde transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgelerinin silinmesi ve eklenmesi ile promotor kütüphanesi oluşturulmuştur. Oluşturulan kütüphanede promotor aktiviteleri doğal promotor aktivitesinin %6'sı ile %160'ı arasında değişmektedir. Qin vd (2011) tarafından yapılan çalışmada mutant *GAP* promotorlarından oluşan ve promotor aktivitesi doğal promotorun ~%0,6'sı ile 19,2 katı arasında değişen promotor kütüphanesi elde edilmiştir.

Literatürde ekspresyon seviyesini arttırmaya yönelik araştırmalar arasında çoklu gen kopya sayısı üzerine yapılmış çalışmalar da bulunmaktadır. *P. pastoris*'te gen ekspresyon kasetleri genoma çoklu kopya olarak entegre edilebilmektedir. Ancak gen kopya sayısının etkisi proteinden proteine değişebilmektedir. Clare vd (1991) 19, Vassileva vd (2001) 8 kopya sayısına kadar protein üretiminde de lineer bir artış gözlemişlerdir. Zhu vd (2009) en iyi üretimi 12 kopya ile elde ederken daha yüksek kopya sayılarının rekombinant protein üretiminde önemli bir düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. Hohenblum vd. (2004) çalışmalarında *AOX1* ve *GAP* promotorlarını farklı gen kopya sayılarıyla karşılaştırmıştır. *GAP* ile ekspresyonda 1,2 ve 3 kopya arasında fark gözlenmezken *AOX1* promotoru ile 2 kopya üzerinde ekspresyonda düşüş görülmüştür. Inan vd (2005) gen kopya sayısının artışı ile hücre dışı üretimin azaldığını göstermiştir. Hücre içi hücre dışı toplam protein olarak hesaplandığında kopya sayısı ile bir artış gözlenmiştir ancak üretilen protein hücre içinde birikmiştir.

Rekombinant protein üretimi sırasında salgılama (sekresyon) miktarında etkili faktörler hedef proteinin özellikleri, konukçu hücre ve kültür koşulları, vektör sistemi, promotor seçimi, kodon kullanım tercihi, sinyal peptitleri, proteinin işlenmesi, katlanması ve sekresyonudur. Bu faktörlerden birinin yetersiz olması, protein verimini olumsuz etkilemekte ve proteinlerin organellerde birikmesine neden olabilmektedir (İdiris vd 2010). Inan vd (2006) yüksek kopya klonlarda protein disülfit izomeras enziminin (endoplazmik retikulumda yanlış disülfit eşleşmelerinin yeniden düzenlenmesini sağlayan enzim) overekspresyonu ile salgılama sistemindeki endoplazmik retikuluma bağlı degradasyonu azaltarak, hücre dışı salgılamayı arttırmışlardır.

Tripsinojen üretilen bir çalışmada, gen kopya sayısı ve ekspresyon arasında negatif korelasyon gözlenmiştir. En yüksek tripsin aktivitesi tek kopya ekspresyon kaseti ile sağlanmıştır. Artan kopya sayıları üretimi negatif yönde etkilemiştir. Aynı çalışmada doğal promotordan daha güçsüz bir sentetik promotor varyantı ile 4 kopyada en iyi ekspresyon elde edilmiştir (Ruth vd 2010).

Marx vd (2009) çalışmalarında gen kopya sayısı ile protein üretimini 7 kopyaya kadar arttırmışlardır. Ancak rekombinant proteinin (hsOD, insan süperoksit dismutaz) overekspresyonu biyokütle verimini %75'e düşürmüştür. Nocon vd (2014), rekombinant proteinin overekspresyonunun hücrenin birincil metabolizmasını direkt olarak etkilemesinden yola çıkarak, genom düzeyinde metabolik modelleme geliştirmiştir. Bu amaçla rekombinant protein üretiminin artırılmasında rol oynayabilecek metabolik genlerin silinmesi veya overekspresyonu üzerine çalışılmıştır. Test edilen 9 genden 5'inin tekli modifikasyonu (overekspresyon veya nakavt) rekombinant protein üretiminin artmasında etkili olmuştur.

*P. pastoris*, başta glukoz olmak üzere gliserol, metanol, sorbitol, mannitol vb. karbon kaynaklarının yanı sıra etanolü de karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir (Inan ve Meagher 2001). *P. pastoris* ile metabolik çalışmalar metanol, glukoz ve gliserol üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak *P. pastoris* etanol metabolizması hala tam olarak aydınlatılamamıştır. *P. pastoris* crabtree-negatif bir mayadır ve teorik olarak aerobik ortamda yüksek karbon konsantrasyonunda etanol üretimi gerçekleştirmez. Crabtree-pozitif olarak sınıflandırılan ekmek mayasında (*S. cerevisiae*) ise aerobik şartlarda yüksek şeker (glukoz) konsantrasyonunda etanol üretimi gerçekleşir (van Urk vd. 1989). *P. pastoris*'in crabtree-negatif doğası, fermentasyonlarda yüksek hücre yoğunluklarına ulaşabilmesini sağlamaktadır (Hartner vd, 2008). Ancak bizim çalışmalarımızda ve literatürde ulaşılan çalışmalarda *P. pastoris*'in oksijenli fermentasyon ortamında az da olsa etanol ürettiği ve bu yan ürün olarak üretilen etanolün *AOX1* promotorunu baskılayarak rekombinant protein üretimini olumsuz etkilediği ortaya konulmuştur (Inan ve Meagher 2001, Sohn vd. 2010). Fakat *GAP* promotoru kontrolü altında rekombinant protein üretimi esnasında, oksijen seviyesinin hipoksik (hypoxic) şartlara düştüğü anda (oksijen seviyesinin aerobik organizmalar için kritik seviyeye indiği zaman), ortamda etanol oluştuğu ve etanolün ilerleyen safhalarda katabolize edildiği gözlenmiştir. Bu şartların da *GAP* promotoru altında rekombinant protein üretimini arttırdığı ortaya konulmuştur (Baumann vd 2008).

Etanol metabolizması üzerine çalışmalar daha çok *S. cerevisiae*'ya yoğunlaşmıştır ve bu konuda kapsamlı bilgiler literatürde bulunmaktadır. Diğer mayalarda da *S. cerevisiae* ile edinilen bilgilerden faydalanılarak etanol metabolizması üzerine çalışmalar yapılmıştır (Saliola vd 1990, Cho ve Jeffries 1998). *P. pastoris*'e yakın mayalarda (*P. stipitis*, *P. ananias* vb.) biri üretimden biri tüketimden olmak üzere en az iki gen karakterize edilmiştir (Cho ve Jeffries 1998, Fredlund 2004).

*P. pastoris ADH3* geni önceki çalışmalarımızda karakterize edilerek *P. pastoris* etanol tüketiminden sorumlu tek gen olduğu ortaya konulmuş (Karaoglan vd 2016a) ve bu genin regülasyonundan sorumlu *ADH3* promotorunun rekombinant protein üretiminde kullanılabilirliği *P. pastoris* ile en yaygın kullanılan *AOX1* ve *GAP* promotorları ile karşılaştırılarak test edilmiştir (Karaoglan vd 2016b). Çalışmada raportör gen olarak ksilanaz enzimini kodlayan *XylB* geni kullanılmış ve promotor güçleri ksilanaz aktivitesi ölçülerek belirlemiştir. *ADH3*, *AOX1* ve *GAP* promotorları ile fermentör koşullarında 72 saat üretimin sonunda en yüksek enzim aktivitesi *ADH3* promotoru ile kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlar rekombinant protein üretimlerinde *ADH3* promotorunun *AOX1* ve *GAP* promotorlarına alternatif güçlü bir promotor olduğunu göstermiştir. Daha önce *ADH3* promotorunun (patente *ADH1* olarak isimlendirilmiştir) rekombinant protein üretiminde kullanılabilirliği üzerine bir patent

(Cregg ve Tolstorukov 2012, US 8,222,386) olmasına rağmen, bu patent *ADH3* promotorunun gücünü diğer promotorlarla karşılaştıran herhangi bir deneysel sonuç içermemektedir.

Bu tez çalışması kapsamında *P. pastoris ADH3* promotorunun aktivitesinde rol oynayan düzenleyici DNA bölgeleri (Upstream elementler) sondan ve içten silme analizleri ile araştırılmıştır. Upstream elementler uzunluğu genellikle 10-30 bç arasında değişen kısa DNA dizileridir. Bu elementlerin pozisyonları farklı genlerde değişmekle birlikte genin başlatma kodonuna göre -100 ila -1500 bç arasındaki bir bölgede bulunabilmektedir (Struhl, 1989). Bu tez çalışmasında sondan silme analizleri -2000 bç ile -1500 bç arasında kayda değer bir fark görülmemesi üzerine, -1500 bç bölgeden başlatılarak 100'er bç olarak gerçekleştirilmiştir. Promotor aktivitesinin değişmeden devam ettiği en kısa DNA bölgesi tespit edilerek, bu bölge üzerinde içten silme analizleri ile devam edilmiştir. Promotor üzerinde silindiğinde; promotor aktivitesinde düşüşe neden olan bölgeler pozitif regülasyondan sorumlu bölge (UAS, Upstream activator Site), aksine promotor aktivitesinde artışa neden olan bölgeler negatif regülasyondan sorumlu bölge (URS, Upstream Repressor Site) olarak tanımlanmaktadır.

*S. cerevisiae*'de ise etanol tüketiminden *ADH2* geni sorumludur. *S.cerevisiae ADH2* promotorunda UAS1 ve UAS2 olmak üzere iki regülatör bölge tanımlanmıştır. Adr1p, *ADH2* promotorunun major aktivatörü olarak UAS1 bölgesine bağlandığı belirlenmiştir (Shuster vd 1986, Yu vd 1989, Donoviel vd 1995).

Donoviel vd (1995) tarafından UAS1 ve UAS2 arasındaki interaksiyon araştırılmıştır. Bu kapsamda UAS2'nin yönü (orientation), UAS2 kopya sayısının etkisi ve heliks yapıda pozisyonun etkisi incelenmiştir. Sonuçlar UAS2'ye bağlanan transkripsiyon faktörü ile Adr1p (UAS1 transkripsiyon faktörü) arasında oryantasyona bağlı bir interaksiyon olduğunu göstermiştir. Öyle ki, ters oryantasyon veya yanlış pozisyonda yerleşmeye bağlı olarak Adr1 ve UAS2'ye bağlanan transkripsiyon faktörü arasında uygun interaksiyon gerçekleşmemektedir. Ayrıca UAS2 kopya sayısı arttıkça *ADH2* ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Bu durum da yine benzer şekilde UAS1 ve UAS2'nin transkripsiyon faktörlerinin interaksiyonunu azaltan bir etkinin sonucudur. Çünkü artan UAS2 kopya sayısı, Adr1p ile etkileşime giremeyen transkripsiyon faktörleri ihtimalini arttırmaktadır. Diğer UAS bölgelerini içermeyen bazal promotorda ve Adr1p nakavt sušta UAS2 kopya sayısının artması ile ekspresyonun da artması ve UAS2 oryantasyonunun değiştirilmesinin aktiviteyi etkilememesi, transkripsiyon faktörleri arasında etkileşim olduğunu doğrulamaktadır (Yu vd 1989, Donoviel vd 1995). Walther ve Schüller (2001) tarafından yapılan çalışmada *ADH2* derepresyonunda Adr1p'nin UAS1'e, Cat8'in UAS2'ye bağlanarak sinerjik olarak rol oynadığı ortaya konulmuştur.

Bu tez çalışmasında belirlenen pozitif regülasyondan sorumlu bölgeler (UAS) kullanılarak, rekombinant protein üretimine yönelik farklı sentetik promotorlar dizayn edilmiştir. *ADH3* promotorunun silme analizleri ile elde edilen sonuçlar promotorun daha etkin kullanılabilmesini sağlayacak önemli veriler sunmakla birlikte, *P. pastoris* etanol metabolizmasının aydınlatılmasında yol gösterici olacaktır.



### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Suşlar, plazmitler ve besiyerleri

Çalışmalarda kullanılan *P. pastoris* X33 (Wild-type) ve GS115 (his4, Invitrogen) suşları kullanılmıştır. *P. pastoris* için YPD (%1 maya ekstraktı, %2 pepton, %2 glukoz), MG (%1.34 YNB, %4x10<sup>-5</sup> biotin ve %2 gliserol) ve ME (%1.34 YNB, %4x10<sup>-5</sup> biotin ve %1 etanol), BMGY (%2 pepton, %1 maya ekstraktı, %1.34 YNB, %4x10<sup>-5</sup> biotin, %2 gliserol ve 100 mM potasyum fosfat, pH 6) ve BMEY (%2 pepton, %1 maya ekstraktı, %1.34 YNB, %4x10<sup>-5</sup> biotin, %1 etanol ve 100 mM potasyum fosfat, pH 6) besiyerleri kullanılmıştır. Klonlama ve plazmitlerin elde edilmesinde *Escherichia coli* XL1-Blue suşu kullanılmıştır. *E. coli* hücrelerinin geliştirilmesinde LB besiyeri (%0.5 maya ekstraktı, %1 pepton ve %1 NaCl) uygun antibiyotik eklemeleri ile hazırlanmıştır.

Rekombinant protein üretimi için ekspresyon vektörü olarak tarafımızdan oluşturulmuş doğal ve mutant *ADH3* promotorlarını içeren marker gen olarak *HIS4* ve raportör gen olarak *Aspergillus niger* ksilanaz geni (*XylB*) içeren pPICZαA plazmidi kullanılmıştır.

##### 3.1.2. Kimyasallar ve enzimler

Çalışmada kullanılan kimyasalların tümü moleküler biyoloji kalitesinde olup Sigma-Aldrich (ABD), Difco (Fransa) ve Merck (Almanya) markalarından temin edilmiştir. Restriksiyon enzimleri ve enzimlerin tampon çözeltileri Fermentas (ABD) firmasından temin edilmiştir. Enzimler üretici firmanın talimatları doğrultusunda kullanılmıştır.

##### 3.1.3. Primerler

Tüm primer dizaynları ve DNA analizleri için DNAMAN 7.0 (Lynnon Corporation) programı kullanılmıştır. Primerler Macrogen Inc. (Seul, Güney Kore) firmasından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan primerler Ek 8.1'de verilmiştir.

#### 3.2. Metot

##### 3.2.1. Genel moleküler biyoloji teknikleri

Moleküler klonlama teknikleri Sambrook ve Russel'a (2001) ve kit protokollerine göre gerçekleştirilmiştir. Gen ve protein taramalarında Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi Network Servisi (Bethesda, MD, ABD; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) kullanılmıştır.

### 3.2.1.1. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için saf kültürden 3 mL YPD sıvı besiyerine ekim yapılmış ve çalkalamalı inkübatörde (Excella E24, New Brunswick Scientific, NJ, ABD) yaklaşık 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Geliştirilen hücre kültürü çöktürülerek genomik DNA izolasyonunda kullanılan hücre peleti elde edilmiştir. Maya hücrelerinden genomik DNA izolasyonu MasterPure Yeast DNA Purification Kit kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA izolatları PZR ve Southern blot analizlerinde kullanılmak üzere 4°C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.1.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

PZR reaksiyonlarının gerçekleştirilmesinde Thermal Cycler (Biometra Professional) cihazı kullanılmıştır. PZR reaksiyon karışımı ve miktarları Çizelge 1'de verilmiştir. PZR ısı döngü programı için süre ve sıcaklık koşulları Çizelge 2'de verilmiştir. Elde edilen PZR ürünlerinin 5'er µl'si %1 agaroz jelde yürütülmüş ve beklenen DNA parçalarının doğruluğu kontrol edilmiştir.

Çizelge 3.1. PZR reaksiyon karışımı

	Son Konsantrasyon	Hacim
ddH <sub>2</sub> O		130 µL
10X KOD reaksiyon tamponu	1X	20 µL
2mM dNTP Karışımı	0,2 mM	20 µL
25 mM MgSO <sub>4</sub>	1,5 mM	12 µL
10 µM Forward primer	15 pmol	6 µL
10 µM Reverse primer	15 pmol	6 µL
Template DNA (5 ng/µL)		2 µL
KOD polimeraz (1U/µL)	0,02 U/µL	
<b>Toplam</b>		<b>200 µL</b>

Çizelge 3.2. PZR ısı döngü programında uygulanan sıcaklık ve süre koşulları

Sıra	Basamak	Sıcaklık	Süre	Sirkülasyon
1	Denatürasyon	95°C	02:00	
2	2.Denatürasyon	95°C	00:30	
3	Bağlanma	54-64°C gradient	00:10	
4	Uzama	70°C	01:30	34 kere 2'ye. Git
5	Son uzama	70°C	05:00	
6	Bekleme	4°C	∞	

### 3.2.1.3. Agaroz jel elektroforezi

PZR ürünlerinin varlığı/doğruluğu ve restriksiyon endonükleazları ile yapılan kesimlerin kontrolü agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel hazırlanırken, 1×TAE (Tris-Asetat-EDTA, 40 mM Tris, 20 mM asetik asit, 1 mM EDTA) tampon çözeltisine %1 oranında agaroz (SeaChem, FMC Bioproducts, ME, ABD) ve 1µL/50 mL olacak şekilde etidiyum bromür çözeltisi (10 mg/mL) ilave edilmiştir. Uygun ebatta ve şekilde seçilen jel kalıplarına dökülerek jel donuncaya kadar beklenmiş ve jel bloğu elde edilmiştir.

Jel kuyularına yüklenecek örnekler 5 µL örneğin ve 1 µL 6× Loading Dye jel yükleme tamponunun ultra saf su ile seyreltilmesiyle toplam 10-20 µl hacimde hazırlanmıştır. Jel bloğu 1×TAE tampon içinde tutularak örnekler jel kuyularına yüklenmiştir. Elektroforez uygulamaları 120 V doğru akım altında, 45-90 dk süre ile gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel içinde moleküler büyüklüklerine göre yatay bantlara ayrılan DNA molekülleri UV ışık (312nm) kaynağından yararlanılarak jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmant E-Box-VX2) ile görüntülenmiştir. Agaroz jel işlemlerinde markır olarak (M) GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas) kullanılmıştır.

### 3.2.1.4. *E. coli* ve *P. pastoris* hücrelerinin transformasyona yetenekli hale getirilmesi

*E. coli* hücrelerinin transformasyona yetenekli halde getirilmesinde CaCl<sub>2</sub> yöntemi kullanılmıştır. LB Miller plakadan alınan tek koloni 3 mL LB Miller sıvı besiyerine ekilmiş ve 37°C’de çalkalamalı inkübatörde gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

Gelişen kültürün optik yoğunluğu ölçülerek, 150 mL LB Miller besiyerine 0,01 OD değeri ile başlatacak şekilde ekim yapılmıştır ve hücreler 0,35 OD’ye ulaşmaya kadar 37°C çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücreler beklenen OD değerine ulaştığında buz üzerinde 20 dak. inkübe edilmiş ve ardından 3000×g’de 4°C’de 10 dak. santrifüjlenerek hasat edilmiştir. Elde edilen hücre peleti 20 mL soğuk (buz üzerinde soğutulmuş) 0,1 M CaCl<sub>2</sub> çözeltisi ile süspanse edilmiştir ve 30 dak. buz üzerinde bekletilmiştir. Ardından yeniden santrifüjlenerek elde edilen hücre peleti %15 gliserol içeren 0,1 M CaCl<sub>2</sub> çözeltisinde (5 mL) çözülmüş ve 1,5 mL’lik mikrosantrifüj tüplerine 100’er µL olarak dağıtılmıştır. Hazırlanan kompetent hücreler -80°C’de muhafaza edilmiştir.

*P. pastoris* hücreleri lityum asetat yöntemine göre (Wu ve Letchworth 2004) transformasyona yetenekli hale getirilmiştir. Agar plakadan alınan tek koloni 3 mL YPD sıvı besiyerine ekilmiştir ve 28°C’de çalkalamalı inkübatörde gece boyu geliştirilmiştir. Gelişen kültürden 50 mL YPD sıvı besiyerine başlangıç hücre yoğunluğu 0,1 OD olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler 28°C’de çalkalamalı inkübatörde 1,5 OD’ye kadar inkübe edilmiştir. Kültür beklenen OD değerine ulaştığında 3000×g’de 5 dak. santrifüjlenerek hücreler hasat edilmiştir. Elde edilen hücre peleti 10 mL resüspanسیون çözeltisinde (100 mM LiAc, 10 mM DTT, 0,6 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7,5) çözülmüş ve 30 dak. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından hücreler santrifüjlenerek çöktürülmüş ve soğuk (buz üzerinde soğutulmuş) 1

mL 1 M sorbitol içinde çözülmüştür. Sorbitol ile yıkama işlemi 2 kez tekrar edilmiştir. Santrifüjlenerek elde edilen hücre peleti %20 gliserol içeren 1 M sorbitol çözeltisi içinde süspanse edilmiştir ve 80 µL hacimde dağıtılarak -80°C’de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.1.5. DNA parçalarının plazmide ligasyonu

DNA parçalarının plazmidlere ligasyonu Rapid DNA Dephos and Ligation Kit (Roche, Almanya) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon toplam 20 µL hacimde 50 ng vektör ve vektör/insert oranı molar olarak 1/3 olacak miktarda insert içerecek şekilde hazırlanmıştır. Ligasyon işlemi 22°C’de 15 dak. sürede gerçekleştirilmiş ve ligasyon karışımı ile transformasyon işlemine geçilmiştir. Artan ligasyon karışımı -20°C’de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.1.6. *E. coli* ve *P. pastoris* hücrelerine transformasyon

Buz üzerinde çözdürülen transformasyona yetenekli *E. coli* hücrelerine 1-5 µl plazmit çözeltisi veya ligasyon karışımı doğrudan ilave edilmiş ve 30 dak. süre ile buz üzerinde bekletilmiştir. Ardından hücreler 42°C’ye ayarlanmış ısı bloğunda (Techne Dri-Block DB-2D) 60 sn tutularak ısı şoku uygulanmış ve ardından buz üzerine alınarak 5 dk bekletilmiştir. Daha sonra tüpe 200 µl sıvı Luria-Bertani (LB) besiyeri ilave edilmiş ve 1 saat süreyle 37°C’de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen hücre sıvısı 25 µg/mL zeosin içeren LB Lennox agar petrilere ekilmiş ve 37°C’de gece boyu üremeye bırakılmıştır.

Transformasyona yetenekli maya hücreleri buz üzerinde çözdürülmüş ve üzerine lineer hale getirilmiş plazmitlerden 1-10 µL olacak şekilde ilave edilmiştir. Ardından buz üstünde bekletilerek soğutulmuş 2 mm yüzey genişliğine sahip elektroporasyon kuvvetlerine aktarılmıştır. Eppendorf Eporator (Eppendorf Eporator 4309) cihazında 1500 V gerilimde ve 5 ms süre ile elektrotransformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Transformasyon işleminin ardından hücreler buz üzerine alınarak tüpe 1 mL buz üzerinde soğutulmuş 1 M sorbitol çözeltisi ilave edilmiştir. Karışım 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerine alınmış ve 1 saat 30°C’de inkübe edildikten sonra seçici besiyerine yayma yöntemi ile ekilmiş ve 2-3 gün boyunca 30°C’de inkübe edilmiştir.

### 3.2.1.7. Southern blot analizi

Ekspresyon kasetinin entegrasyonunun kontrolü ve kopya sayısının belirlenmesi için yapılan Southern blot analizi İnan vd (2007) göre gerçekleştirilmiştir.

Southern blot analizinde kullanılan prob olarak *HIS4* geninden *HIS4*618F-*HIS4*1146R primerleri ile çoğaltılan yaklaşık 530 bp uzunluğundaki PZR ürününün digoksigenin (DIG) ile etiketlenmesiyle elde edilmiştir. Probunda etiketlenmesinde DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche, Almanya) kullanılmıştır. Etiketlenen probun etkinliği kit ile sağlanan standart DIG etiketli DNA ile karşılaştırılarak test edilmiştir.

Elde edilen transformantlardan genomik DNA izolasyonu yapılmış ve uygun restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Restriksiyon işleminin ardından %0,8 agaroz jele yüklenen örnekler 1×TAE tamponu içinde 120V gerilimde 2 saat yürütülmüştür.

Elektroforez işleminin ardından DNA jeli 45 dk denatürasyon çözeltisi (1,5M NaCl, 0,5M NaOH) ile ardından 30 dk nötralizasyon çözeltisi (1,5M NaCl, 0,5M Tris-HCl (pH 7,5), 1mM EDTA) ile orbital çalkalayıcı üzerinde muamele edilmiştir. Bu işlemin sonunda DNA'nın naylon membrana transferi ile analize devam edilmiştir.

Naylon membran (20×20 cm Positively Charged Nylon Membran, Roche, ABD), 10×SSC blotlama tamponu (3M NaCl, 0,3M Sodyum Sitrat, 1mM EDTA) ile ıslatılmıştır. Southern blot düzeneği kurulmuş ve membran, jelin alt yüzü ile temas edecek şekilde jelin üzerine yerleştirilmiştir. Transfer işlemi yaklaşık olarak 3 saat sürdürülmüştür.

Transfer işleminin ardından membran oda sıcaklığında 5 dakika kurutulmuş ve ultraviyole çapraz bağlayıcı (CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP, CA, ABD) ile 3 kez 120mJ UV ışını uygulanarak DNA molekülleri membran üzerine bağlanmıştır. Daha sonra membran, 41°C'de 1 saat ön hibridizasyon çözeltisi (DIG Easy Hyb, Roche, Almanya) ile muamele edilmiştir. Ardından DIG etiketli probu içeren hibridizasyon çözeltisi eklenerek aynı sıcaklıkta gece boyu hibridizasyona bırakılmıştır. Hibridizasyon işleminin sonunda yıkama işlemlerine geçilmiştir. Hibridizasyon tüpüne önce birinci yıkama çözeltisi (2×SSC+%0,1 SDS) eklenmiş ve oda sıcaklığında 5'er dakika olmak üzere işlem iki kez tekrar edilmiştir. Ardından 68°C'de 15'er dakika olmak üzere 2 kez ikinci yıkama çözeltisi (0,5×SSC+%0,1 SDS) ile muamele edilmiş ve immünolojik tayine geçilmiştir.

Membran, işleme uygun bir kaba alınarak, orbital çalkalayıcı üzerinde 1 saat kapatma tamponu (1×DIG Blocking Solution, Roche) uygulanmıştır. Yıkama tamponu (0,1 M Maleik asit pH 7,5, %0,3 (v/v) Tween 20) ile 2 kez 5'er dakika yıkandıktan sonra 1 saat anti-DIG-Alkalin Fosfataz antikor çözeltisi ile muamele edilmiştir. Yıkama işleminden sonra 5 dak dedeksiyon tamponunda (0,1 M Tris pH 9,5 ve 0,1 M NaCl) bekletilmiştir. Ardından dedeksiyonu gerçekleştirmek için, membran şeffaf propilen zar içine yerleştirilerek üzerine CSPDR (alkalin fosfataz substratı, Roche) damlatılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dak ardından 37°C'de 10 dk inkübe edildikten sonra X-ışını film kasedine yerleştirilmiştir. Sonraki işlemler karanlık odada gerçekleştirilmiştir. X-ışını filmi ile üst üste 20-60 dak inkübe edildikten sonra Kodak film geliştirme çözeltileri ile muamele edilerek görüntüleme gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.1.8. SDS-PAGE analizi

SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) OWL P8D8 (Thermo Scientific) cihazı ile %5 polyakrilamid yükleme jeli ve %10 poliakrilamid ayırma jeli olacak şekilde hazırlanarak yürütülmüştür.

Süpernatant örnekleri toplam 25 µl'de hacimde 4X SDS jel yükleme tamponu (200 mM Tris-Cl, pH 6,8, %8 SDS, %0,4 bromphenol blue, %40 glycerol, 100 mM DTT) ile hazırlanarak 70°C'de 10 dak. denatüre edilmiştir. Ardından 20µl'lik kısmı jele

yüklenmiştir. Elektroforez işlemi, 1×TGS (0,025 M Tris base, 0,192 M Glycine, %0,1 SDS, pH 8,3) tamponunda 150 V değerinde 60 dak. yürütülmesi ile gerçekleştirilmiştir.

Görüntüleme işlemi için jel, IRDye Blue Protein Stain (Licor Odyssey) ile 1 saat süre ile orbital çalkalayıcı üzerinde boyanmıştır. Saf su ile 15 dak. yıkandıktan sonra LiCor (Odyssey) ile taranmıştır.

### 3.2.2. Diğer biyokimyasal analizler

#### 3.2.2.1. Ksilanaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

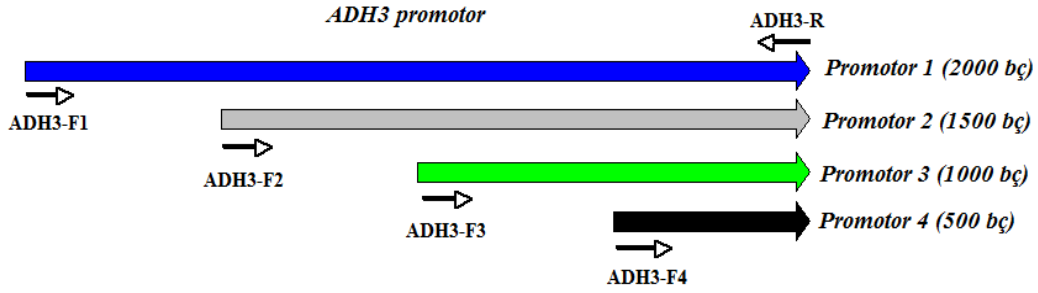
Enzim aktivitesi, ksilandan serbest bırakılan indirgen şekerin ölçülmesi ile tespit edilmiştir (Karaoglan vd 2016b). Deney öncesi test edilerek belirlenecek olan dilüsyon faktörü kadar dilüsyon edilen örnek (0,1 mL), 0,9 mL %1'lik (ağırlık/hacim) beechwood ksilan içeren 0,05 M sodyum sitrik asit tamponuna (pH 5) eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 50°C' de 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda reaksiyon karışımından 100 µL alınmış ve 900 µL DNSA durdurma çözeltisi içine eklenmiştir. Karışım 5 dakika süre ile kaynatılmış ve soğutulduktan sonra 540 nm dalga boyunda spektrofometrik olarak absorpsanlar kaydedilmiştir. Okuma sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarı dinitrosalisilik asit (DNSA) metodu ile tespit edilmiştir. Kör örnekler substrata enzimin eklenmesinden hemen sonra reaksiyonun durdurulması ile hazırlanmıştır. Bir ünite ksilanaz aktivitesi, 1 dakikada, deney koşullarında, 1µmol indirgen şeker (glikoza eşdeğer) üretmek için gereken enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Standart kurve 1-10 µmol ksiloz ile çizilmiştir.

#### 3.2.2.2. Toplam protein ölçümü

Hücre süpernatantlarının protein içeriği Pierce Coomassie (Bradford) Assay Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Örneklerin protein konsantrasyonları BSA standart solüsyonlarının absorpsan değerleri referans alınarak belirlenmiştir. Deneyler sırasında elde edilen standart grafiklerden biri Ek 8.2'de verilmiştir.

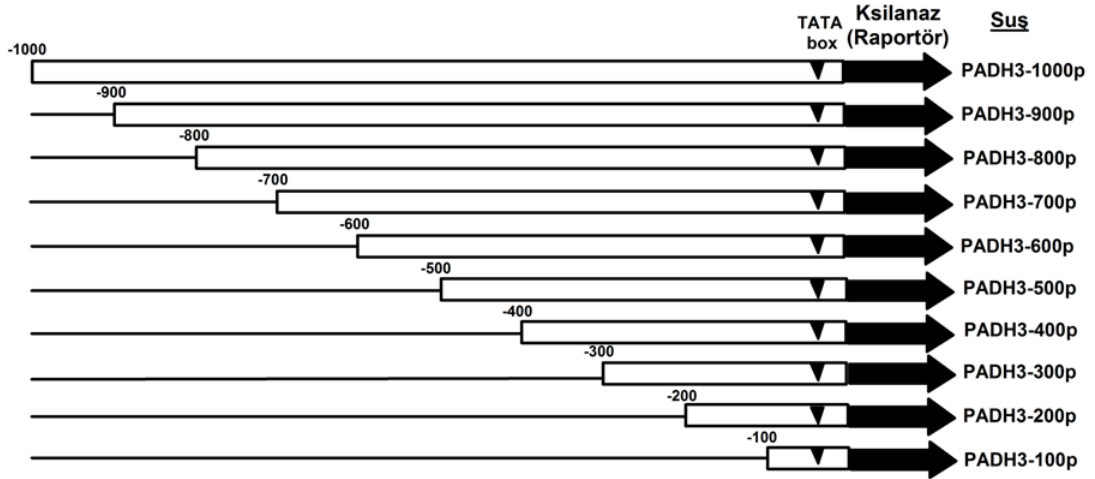
#### 3.2.3. *ADH3* promotor bölgesinin belirlenmesinde sondan silme analizi

*ADH3* promotor bölgesinin belirlenmesi için ilk olarak promotor bölgesinin yaklaşık olarak belirlenmesi amacıyla promotor 2000 (Nükleotit -2000 ila 0), 1500 (Nükleotit -1500 ila 0), 1000 (Nükleotit -1000 ila 0) ve 500 (Nükleotit -500 ila 0) bç olmak üzere 4 bölgeye bölünmüştür (Şekil 3.1). Parantez içinde gösterilen negatif sayılar promotorun translyasyon başlatma kodonuna göre pozisyonlarını belirtmektedir.



Şekil 3.1. *ADH3* Promotorunun yaklaşık olarak belirlenmesinde sondan silme analizinin şematik gösterimi

Aktivitenin değişmeden devam ettiği en kısa bölge tespit edilerek promotor bölgesi yaklaşık olarak belirlenmiştir. Ardından belirlenen bölge üzerinde 100'er bç olarak sondan (5' ucundan) silme analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). Promotor aktivitesinin %100 olarak devam ettiği en kısa DNA bölgesi *ADH3* promotoru olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.2. *ADH3* promotor bölgesinin belirlenmesinde sondan silme analizinin şematik gösterimi

Farklı uzunluklardaki doğal *ADH3* promotor bölgeleri BamHI restriksiyon bölgesi eklenmiş forward primer ve AsuII restriksiyon bölgesi eklenmiş reverse primerler kullanılarak X33 genomik DNA'sından PZR ile çoğaltılmıştır. Elde edilen PZR ürünleri BamHI-AsuII ile kesilmiş ve BglII-AsuII ile *AOX1* promotoru düşürülmüş pPICZ $\alpha$ A plazmidine bağlanmıştır. Elde edilen plazmitler pADH3Z $\alpha$ A-2000, pADH3Z $\alpha$ A-1500 şeklinde isimlendirilmiştir.

Ekspresyon vektöründe marker gen olarak *HIS4*, raportör gen olarak ksilanazı kodlayan *XylB* bulunmaktadır. Bu genler öncelikle pPICZ $\alpha$ A plazmidine bağlanmıştır. *XylB* geni pPICZ $\alpha$ A plazmidine XhoI-XbaI klonlama bölgesinden bağlanmış ve elde edilen plazmit pPICZ $\alpha$ A-*XylB* olarak isimlendirilmiştir. *HIS4* geni, ticari pAO815 plazmidinden BglII-BamHI ile kesilerek elde edilmiş ve BamHI ile doğrusal hale

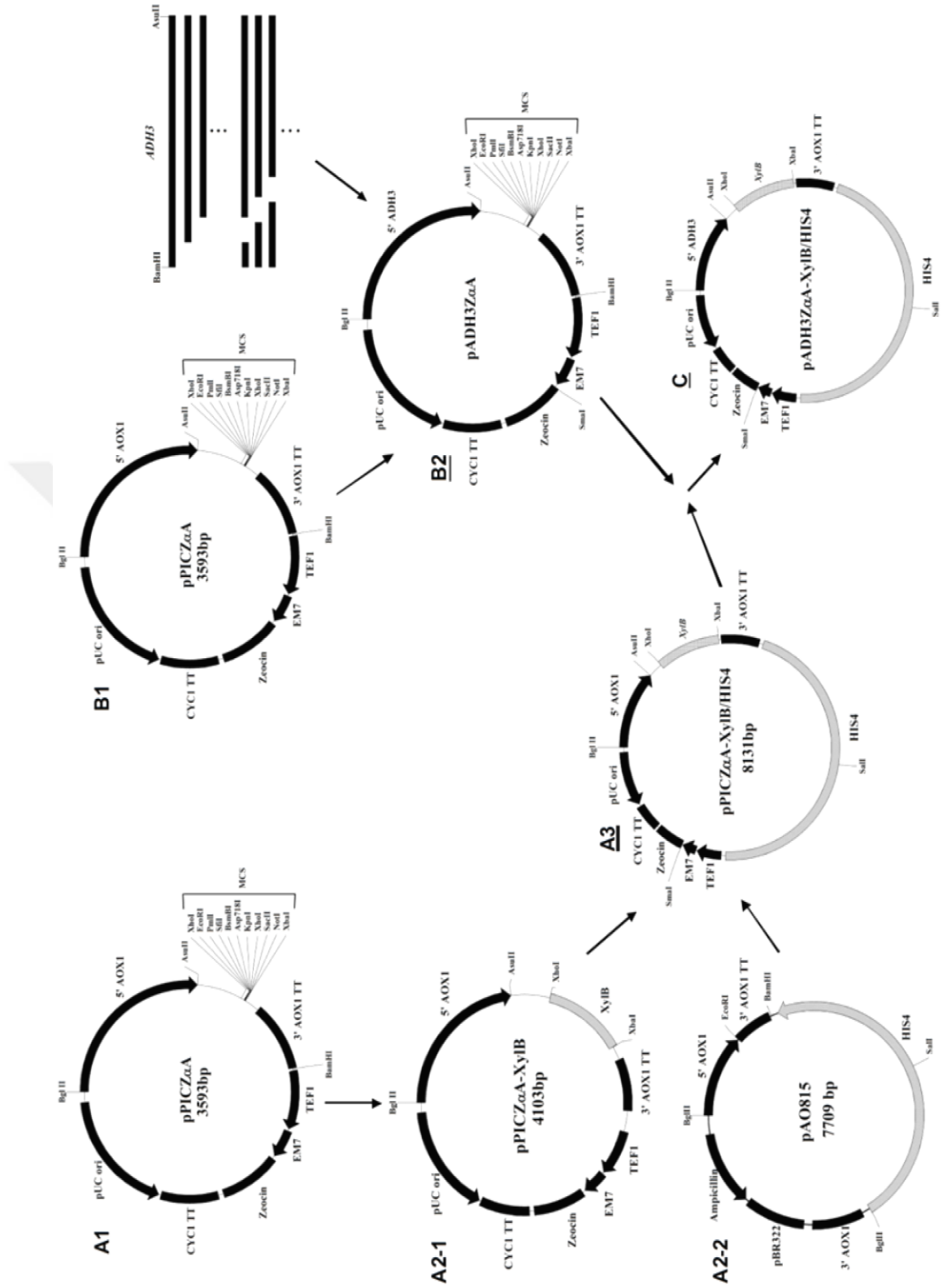
getirilen pPICZ $\alpha$ A-XylB plazmidine bağlanmıştır. Böylece pPICZ $\alpha$ A-XylB/HIS4 plazmidi oluşturulmuştur. İleri aşamalarda diğer ekspresyon vektörleri oluşturulurken de XylB ve HIS4 genlerinin ekspresyon vektörüne klonlanmasında pPICZ $\alpha$ A-XylB/HIS4 plazmidi kullanılacaktır.

Ekspresyon vektörleri (pADH3Z $\alpha$ A-XylB/HIS4), "pADH3Z $\alpha$ A" ve "pPICZ $\alpha$ A-XylB/HIS4" plazmitlerinin XhoI-SmaI bölgesinden bağlanması ile oluşturulmuştur. Bağlanan parçalar pADH3Z $\alpha$ A plazmidinin XhoI-SmaI kesimi sonucu ADH3 promotorunu içeren kısmı ile pPICZ $\alpha$ A-XylB/HIS4 plazmidinin XhoI-SmaI kesimi sonucu XylB ve HIS4 genini içeren kısmıdır.

Oluşturulan tüm plazmitler Kpn2I enzimi ile HIS4 geninden doğrusal hale getirilmiş ve *P. pastoris* GS115 suşuna aktarılmıştır. Ekspresyon kasetinin *P. pastoris* genomuna entegrasyonu *his4* lokusundan gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında bulunan tüm ekspresyon plazmitleri aynı strateji ile oluşturulmuştur. Yukarıda ayrıntılı şekilde anlatılan klonlama aşamaları Şekil 3.3'de şematik olarak gösterilmiştir.



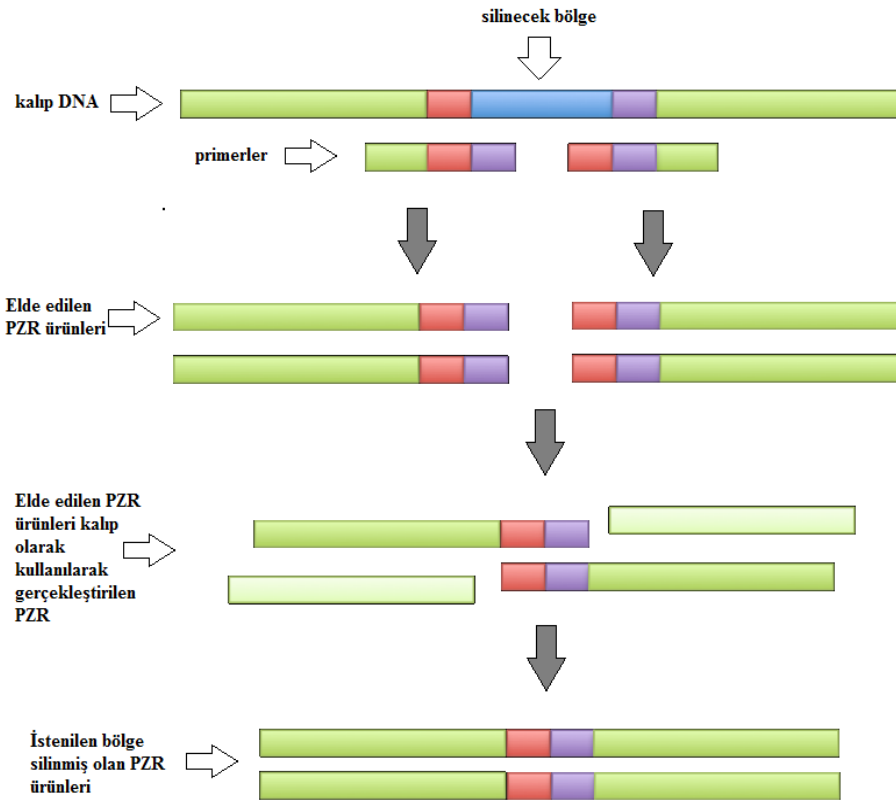


Şekil 3.3. Çalışmada ekspresyon vektörlerinin oluşturulmasında kullanılan genel klonlama stratejisi

### 3.2.4. *ADH3* promotorunun düzenlenmesinden sorumlu bölgelerin belirlenmesinde içten silme analizi

*ADH3* promotoru üzerinde düzenleyici bölgelerin belirlenmesi amacıyla promotor üzerinde sistematik içten silme analizi gerçekleştirilmiştir. Mutant *ADH3* promotor bölgeleri overlap PZR yöntemi kullanılarak elde edilmiştir.

Yöntemin prensibine göre DNA ürününe istenilen değişiklik primerler ile gerçekleştirilir. Mutasyona uğratılmak istenen DNA ürünü birbirlerine kaynaşabilecek iki DNA parçası halinde çoğaltılır. Kaynaşma, bu iki DNA parçasının kaynaşma bölgesini çoğaltan primerlerde birbirlerini tamamlayan uzantıların bulunması sayesinde gerçekleşir. İki parça halinde çoğaltılan DNA ürünü kalıp DNA olarak kullanılarak, parçaları dıştan çoğaltan primerler ile yeniden PZR ile mutant DNA ürünü elde edilir. Overlap PZR yöntemi Şekil 3.4’de şematize edilerek gösterilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi silinmesi hedeflenen bölge mavi bölgedir. Mavi bölgenin solunda kalan bölgenin çoğaltılmasında kullanılan reverse primer ile sağında kalan bölgenin çoğaltılmasında kullanılan forward primer overlap primerlerdir. Silme işleminin sonunda aradan çıkarılması hedeflenen mavi bölgeyi kuşatan bölgeler primerler üzerinden birleştirilmiş haldedir (kırmızı ve mor bölge). İki parça halinde çoğaltılan DNA bölgelerinde kırmızı ve mor renkli bölge ortaktır. Teorik olarak PZR reaksiyonunda iki DNA zinciri birbirinden ayrıldıktan sonra tekrar birleşirken bu iki DNA bölgesi (sol ve sağ) kırmızı ve mor bölgeden birleşecek ve uzayarak tamamlanacaktır.

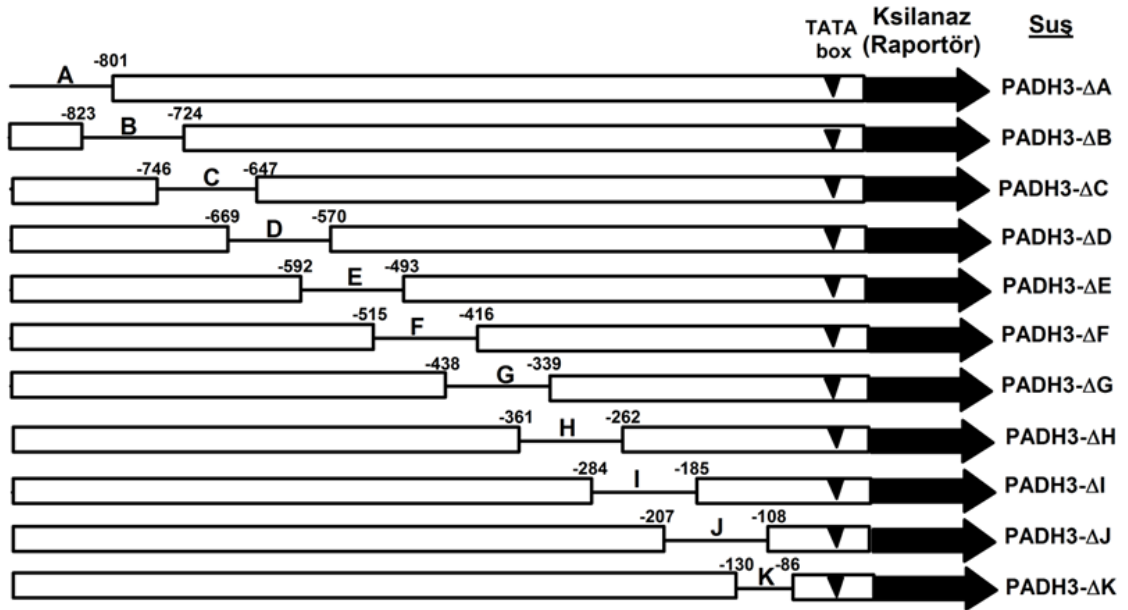


Şekil 3.4. Overlap PZR yönteminin şematik gösterimi

*ADH3* promotorunda (900 bç) içten silme analizi Şekil 3.5’de şematize edilerek gösterilmiştir. DNA heliks yapısında her bir dönüşün 11 bç olduğu göz önünde bulundurularak içten silme analizinde silinen parçalar 99 bç olarak 11’in katı şeklinde belirlenmiştir. Ayrıca silme noktalarının da analiz edilebilmesi için, silinecek her bir parça bir önceki parçadan 22 bç DNA dizisi içerecek şekilde tasarlanmıştır.

Elde edilen mutant promotorlar BamHI-AsuII enzimleri kesilmiş ve BglII-AsuII enzim reaksiyonu ile *AOX1* promotoru düşürülmüş pPICZ $\alpha$ A plazmidine bağlanmıştır. Elde edilen plazmitler pADH3Z $\alpha$ A- $\Delta$ A şeklinde silinen bölgeye göre isimlendirilmiştir. Silinen bölgelere verilen isimler Şekil 3.5’de görülmektedir.

pADH3Z $\alpha$ A- $\Delta$ A-K plazmitleri XhoI-SmaI ile kesilerek düşen parçalardan mutant promotor kısmını içeren kısım jelden saflaştırılmıştır. pPICZ $\alpha$ A-XylB/HIS4 plazmidi de XhoI-SmaI ile kesilmiş ve düşen parçalardan *XylB* ve *HIS4* genini içeren kısım jelden saflaştırılmıştır. Jelden saflaştırılan parçalar birbirlerine bağlanarak ekspresyon vektörü pADH3Z $\alpha$ A- $\Delta$ (A-K)-XylB/HIS4 elde edilmiştir. Oluşturulan ekspresyon plazmitleri Kpn2I enzimi ile *HIS4* geninden doğrusal hale getirilmiş ve *P. pastoris* GS115 suşuna *his4* lokusundan entegre edilmiştir.

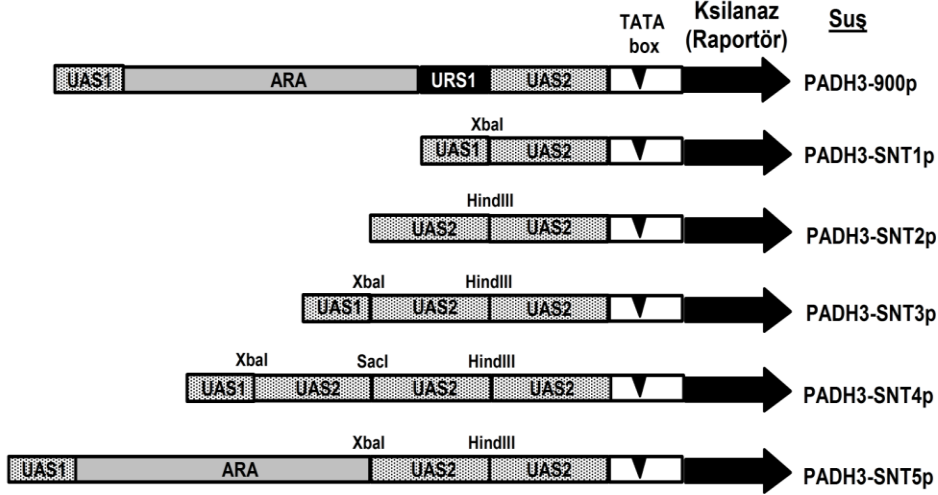


Şekil 3.5. İçten silme analizinin şematik gösterimi

### 3.2.5. Sentetik *ADH3* promotorlarının oluşturulması

Sentetik bölgelerin oluşturulmasında promotorun düzenlenmesinde görev aldığı belirlenen bölgeler kullanılmıştır. Bölgeler enzim tanıma bölgeleri içeren primerler ile PZR yoluyla çoğaltılmıştır ve bölgelerin birleştirilmesinde endonükleaz enzim tanıma bölgeleri kullanılmıştır. Oluşturulan sentetik promotorların içerdiği bölgeler ve bu bölgelerin birleştirilmesinde kullanılan enzim tanıma bölgeleri Şekil 3.6’da şematize

edilerek gösterilmiştir. Elde edilen tüm sentetik promotorlar 5' ve 3' ucunda BamHI-AsuII restriksiyon bölgeleri içerecek şekilde tasarlanmıştır.



Şekil 3.6. Sentetik promotorların şematik gösterimi

PZR ürünleri gösterilen enzim tanıma bölgelerinden kesilmiştir. Parçaların birbirlerine bağlanması, bu bölgeler yardımı ile ligaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dizayn edilen sentetik promotora ait DNA dizileri Ek 8.4'de verilmiştir. Elde edilen sentetik promotorlar BamHI-AsuII enzimleri kesilmiş ve BglII-AsuII enzim reaksiyonu ile *AOX1* promotörü düşürülmüş pPICZ $\alpha$ A plazmidine bağlanmıştır. Elde edilen plazmitler pADH3-SNT(1-5) $\alpha$ A olarak isimlendirilmiştir.

pADH3-SNT(1-5) $\alpha$ A plazmitleri XhoI-SmaI ile kesilerek düşen parçalardan sentetik promotor kısmını içeren kısım jelden özütlenmiştir. Daha önceden oluşturulan ve diğer klonlama aşamalarında da kullanılmış olan pPICZ $\alpha$ A-XylB/HIS4 plazmidi de XhoI-SmaI ile kesilmiş ve düşen parçalardan *XylB* ve *HIS4* genini içeren kısım jelden özütlenmiştir. Jelden özütlenen parçalar birbirlerine bağlanarak ekspresyon vektörü pADH3-SNT(1-5) $\alpha$ A-XylB/HIS4 elde edilmiştir. Oluşturulan ekspresyon plazmitleri Kpn2I enzimi ile *HIS4* geninden doğrusal hale getirilmiş ve *P. pastoris* GS115 suşuna *his4* lokusundan entegre edilmiştir.

### 3.2.6. Erlenmayer koşullarında protein üretimi

Çalışmada raportör gen olarak ksilanaz enzimini kodlayan *XylB* geni kullanılmış ve oluşturulan farklı promotorların regülasyonu altında ksilanaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretim sonunda alınan süpernatant örneklerinden ksilanaz enzim aktiviteleri ölçülerek promotor güçleri belirlenmiştir.

Karşılaştırma yapılan tüm klonlar tek kopya ekspresyon kaseti içeren transformantlardan seçilmiştir. Protein üretimi için hem minimal (MG-ME) hem zengin besiyeri (BMGY-BMEY) test edilmiştir. İki besiyeri arasında klonlar arası promotor aktivitesi değişimlerinde fark gözlenmemiştir. *ADH3* promotörü etanol ile indüklenen bir promotördür. Protein üretiminde hücrelerin belli bir optik yoğunluğa geliştirilmesi

için gliserol besiyeri, indüksiyonu için etanol besiyeri kullanılmıştır. Hücreler 50mL gliserol içeren besiyerinde 28°C'de yaklaşık 18 saat geliştirildikten sonra optik yoğunlukları eşitlenerek etanol besiyerinde indüksiyon fazına geçilmiştir. Karşılaştırma koşullarının optimizasyonu için protein üretimi sırasında 4, 8, 12 ve 24. saatlerde örnek alınmıştır. Zamana karşı, hücre gelişimi (OD) ve ksilanaz aktiviteleri takip edilmiştir. Üretimlerde 12. saatlerde son konsantrasyon %1 olacak şekilde %100 etanol ile indüksiyon yapılmıştır. Ancak ek bir indüksiyon işleminin karışıklığa neden olabileceği gözlenmiştir ve bu nedenle hücre yoğunlukları ve enzim aktiviteleri göz önünde bulundurularak, karşılaştırma için en uygun örnek zamanı indüksiyon fazının 8. saati olarak belirlenmiştir. Toplanan süpernatant örneklerinde ksilanaz aktivitesi ölçülmüş ve her klonun ksilanaz aktivitesi/OD değerleri hesaplanarak bu değerler karşılaştırılmıştır. Böylece hücre yoğunluğundan kaynaklanacak aktivite yanılması elimine edilmiştir. Analizler 2 paralelli ve 2 tekerrür olarak yürütülmüştür.

### 3.2.7. Fermentör Çalışmaları

Çalışmada gerçekleştirilen fermentasyon işlemleri, 3 aşamalı yarı-kesikli sistemle yürütülmüştür. Fermentasyonlarda 5 L hazneli fermentör (Sartorius B Plus) kullanılmıştır. Başlangıç fermentasyon hacmi 2 L'dir. Fermentasyonlar 900 rpm karıştırıcı hızında, 1,5 vvm hava beslemesi ile 30°C'de ve pH 5'te gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon ortamında çözülmüş oksijen miktarı %30 olacak şekilde gerektiğinde saf oksijen ile kontrol edilmiştir.

Fermentasyon inokulumunun hazırlanması: Donuk kültürden YPD sıvı besiyerine ekilen hücreler gece boyu gelişmeye bırakılmıştır. Ertesi gün 100 mL BMGY besiyerine 0,5 OD'den başlatılan kültür, 10 OD'ye kadar geliştirilmiş ve fermentör besiyerinin inokulasyonunda bu ön kültür kullanılmıştır.

Fermentasyonun kesikli fazında kullanılan besiyeri temel tuzlu besiyeri (basal salts medium, BSM) ve 4,55 mL/L PTM1 tuzlarından oluşmaktadır. BSM besiyerinin içeriği, litrede, %4 gliserol, 26,7 mL %85 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,93 g CaSO<sub>4</sub>, 18,2 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 14,9 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 4,13 g KOH ve 2 mL %5'lik köpük kırıcı şeklindedir. PTM1 tuzlarının içeriği Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. PTM1 tuzlarının bileşimi

CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2 g/L
ZnCl <sub>2</sub>	7 g/L
NaI	0,08 g/L
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	22,0 g/L
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	3,0 g/L
Biotin	0,2 g/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
Borik asit	0,02 g/L
CoCl <sub>2</sub>	0,5 g/L
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 mL

Fermentasyonun ilk aşaması olan kesikli (batch) faz, %4 gliserol içeren 2 L temel tuz besiyerinde (BSM, Basal Salt Media) gerçekleştirilmiştir. Bu faz yaklaşık 16 saat sürmüştür ve ortamdaki gliserolün tükenmesi üzerine çözünmüş oksijendeki ani artış gözlemlendiğinde sona ermiştir. Fermentasyon işleminin ikinci aşaması gliserol besleme (fed-batch) fazına geçilmiştir. Bu fazda %50 gliserol kullanılarak 2 saat boyunca 16 mL/L/sa olacak şekilde gliserol beslemesi yapılmıştır. Ardından 3 saatlik süre içinde besleme hızı 16 mL/L/sa'dan 0 mL/L/sa'ya lineer olarak düşürülmüştür. Çözünmüş oksijen miktarındaki artış gözlemlendiğinde (karbon kaynağı tükendiğinde) ortama 2 mL/L 100% etanol eklenmiştir. Etanol tükendiğinde, ortamdaki yan ürünlerin tüketilmesi için yaklaşık 30 dakika ortama substrat eklenmemiştir. Hücrelerin etanole adaptasyonu sağlanana kadar bu işlem tekrar edilmiştir. Adaptasyon sağlandığında etanol besleme hızı 1,5 mL/L/sa'dan 9 mL/L/sa düzeyine kadar kademeli olarak arttırılmıştır. İndüksiyon fazı 72 saat sürdürülmüştür. Fermentasyon boyunca belirli aralıklarla örnekler alınarak, zamana karşı yaş hücre ağırlığı ve ksilanaz aktivitesi takip edilmiştir.

### 3.2.8. İstatistiksel analiz

Analizler iki paralelli ve iki tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar, SigmaPlot 11 (Systat Software) programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiş ve ortalamalar arasındaki farklar %95 güven aralığında ( $p < 0.05$ ) Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmanın istatistiksel analiz sonuçları Ek 8.5'te verilmiştir.

## 4. BULGULAR

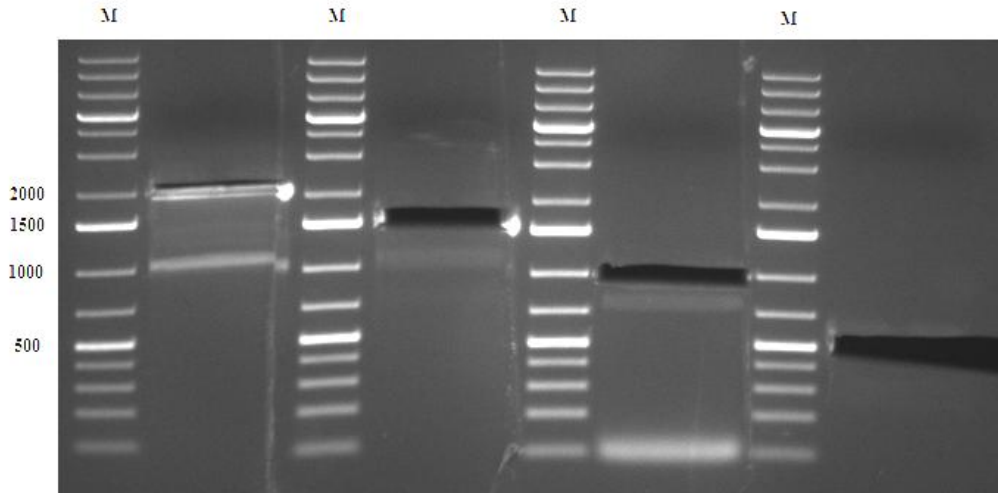
### 4.1. *ADH3* Promotor Bölgesinin Belirlenmesi

*ADH3* promotor bölgesinin belirlenmesi için *ADH3* geninin 5' ucunda bulunan 2000 bç uzunluğundaki DNA bölgesinde (Nükleotit -2000 ila 0) sondan silme analizleri gerçekleştirilmiştir. İlk olarak promotor bölgesi 2000 (Nükleotit -2000 ila 0), 1500 (Nükleotit -1500 ila 0), 1000 (Nükleotit -1000 ila 0) ve 500 (Nükleotit -500 ila 0) bç olmak üzere 4 bölgeye bölünmüştür. Parantez içinde gösterilen negatif sayılar promotorun translasyon başlatma kodonuna göre pozisyonlarını belirtmektedir. Çalışmada kullanılmış olan *ADH3* promotor bölgelerinin DNA sekansı EK 8.3'te verilmiştir.

Çalışmada raportör gen olarak ksilanaz geni kullanılmıştır. Böylece elde edilen promotor aktiviteleri ksilanaz enzim aktivitesi ölçülerek belirlenmiştir. Promotor aktiviteleri, 2000 bç uzunluğundaki promotorun aktivitesi %100 olarak bağül olarak hesaplanmıştır. Aktivitenin değişmeden devam ettiği en kısa DNA bölgesi yaklaşık olarak tespit edildikten sonra sondan silme işlemi 100'er bç olarak devam ettirilmiştir. Aktivitenin değişmeden devam ettiği en kısa DNA bölgesi *ADH3* promotor bölgesi olarak belirlenmiştir.

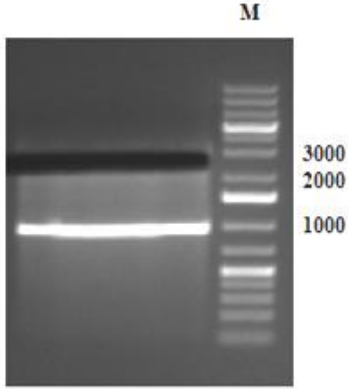
#### 4.1.1. Sondan silme analizi için ekspresyon plazmitlerinin elde edilmesi ve *P. pastoris*'e transformasyonu

Farklı uzunluklardaki doğal *ADH3* promotor bölgeleri BamHI restriksiyon bölgesi eklenmiş forward primer ve AsuII restriksiyon bölgesi eklenmiş reverse primerler kullanılarak X33 genomik DNA'sından PCR reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. Promotorun yaklaşık olarak belirlenmesi için ilk olarak 2000, 1500, 1000 ve 500 bç uzunluğundaki promotor bölgeleri çoğaltılmıştır. Şekil 4.1'de beklenen PZR ürünlerinin kesildiği jel görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.1. *ADH3* promotorunun 2000, 1500, 1000 ve 500 bç uzunluğundaki PZR ürünlerinin jelden kesilmesi

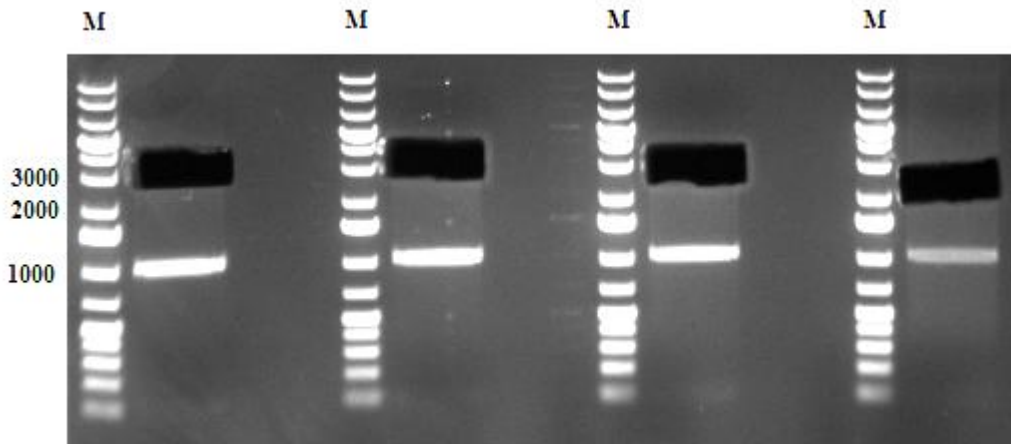
Elde edilen PZR ürünleri BamHI-AsuII ile kesilmiş ve BglII-AsuII ile *AOX1* promotörü düşürülmüş pPICZ $\alpha$ A plazmidine (Şekil 4.2) bağlanmıştır. Elde edilen plazmit pADH3Z $\alpha$ A olarak isimlendirilmiştir. Plazmit isimleri farklı *ADH3* promotörlerinin özelliklerine göre türetilmiştir (pADH3Z $\alpha$ A-2000, pADH3Z $\alpha$ A-1500 gibi).



Şekil 4.2. *AOX1* promotörü düşürülmüş pPICZ $\alpha$ A plazmidinin jelden kesilmesi

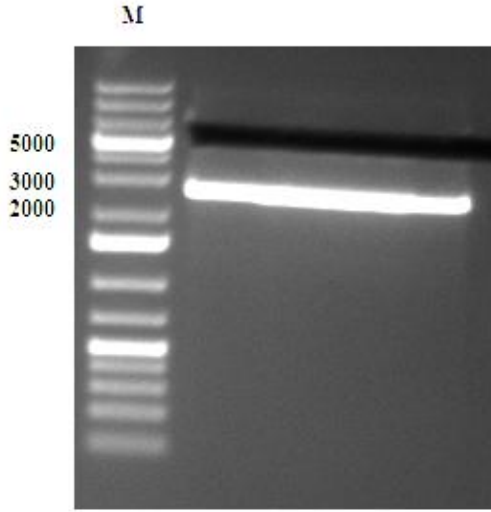
Ekspresyon vektöründe marker gen olarak *HIS4*, raportör gen olarak ksilanazı kodlayan *XylB* bulunmaktadır. Bu genler öncelikle pPICZ $\alpha$ A plazmidine bağlanmıştır. *XylB* geni pPICZ $\alpha$ A plazmidine XhoI-XbaI klonlama bölgesinden bağlanmış ve elde edilen plazmit pPICZ $\alpha$ A-*XylB* olarak isimlendirilmiştir. *HIS4* geni, ticari pAO815 plazmidinden BglII-BamHI ile kesilerek elde edilmiş ve BamHI ile doğrusal hale getirilen pPICZ $\alpha$ A-*XylB* plazmidine bağlanmıştır. Böylece pPICZ $\alpha$ A-*XylB*/*HIS4* plazmidini oluşturulmuştur.

Ekspresyon vektörü pADH3Z $\alpha$ A-*XylB*/*HIS4*, pADH3Z $\alpha$ A ve pPICZ $\alpha$ A-*XylB*/*HIS4* plazmitlerinin XhoI-SmaI bölgesinden bağlanması ile oluşturulmuştur. Bağlanan parçalar pADH3Z $\alpha$ A plazmidinin XhoI-SmaI kesimi sonucu *ADH3* promotörünü içeren kısmı (Şekil 4.3) ile pPICZ $\alpha$ A-*XylB*/*HIS4* plazmidinin XhoI-SmaI kesimi sonucu *XylB* ve *HIS4* genini içeren kısmıdır (Şekil 4.4).



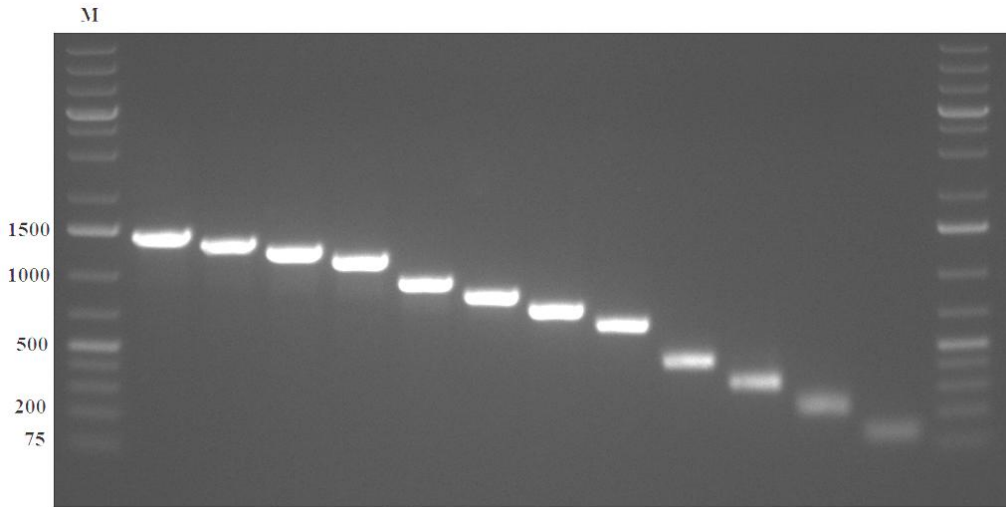
Şekil 4.3. pADH3Z $\alpha$ A-2000, 1500, 1000 ve 500 plazmitlerinin XhoI-SmaI kesimi sonucu *ADH3* promotörünü içeren kısmının jelden kesilmesi





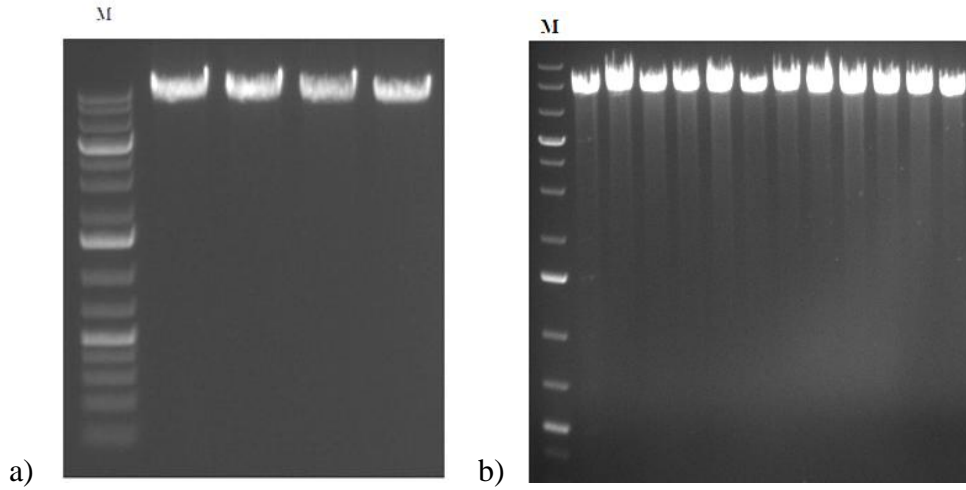
Şekil 4.4. pPICZ $\alpha$ A-XylB/HIS4 plazmidinin XhoI-SmaI kesimi sonucu *XylB* ve *HIS4* genini içeren kısmının jelden kesilmesi

Promotorun daha detaylı analizi için sondan silme işlemi 1500 bç uzunluğundaki promotordan itibaren 100 bç uzunluğundaki bölgeye 100'er bç olarak kadar sürdürülmüştür. PZR ile çoğaltılan 1400-100 bç uzunluğundaki *ADH3* promotor bölgelerinin jel görüntüsü Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. *ADH3* promotorunun sondan silme analizi için çoğaltılan PZR ürünlerinin jel görüntüsü (sırasıyla 1400, 1300, 1200, 1100, 900, 800, 700, 600, 400, 300, 200, 100 bç)

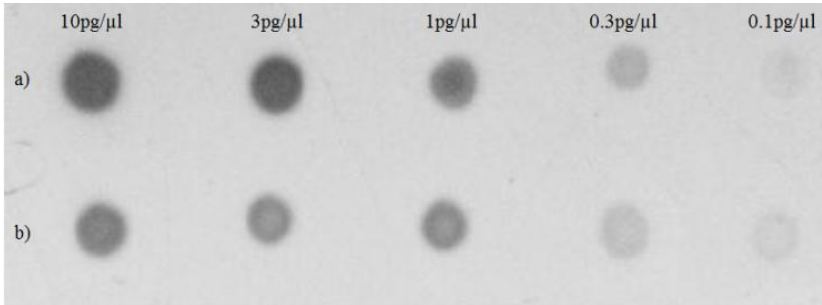
Elde edilen PZR ürünleri aynı strateji ile klonlanarak pADH3Z $\alpha$ A-XylB/HIS4 1400-100 ekspresyon plazmitleri elde edilmiştir. Oluşturulan tüm ekspresyon plazmitleri Kpn2I enzimi ile *HIS4* geninden doğrusal hale getirilmiş ve *P. pastoris* GS115 suşuna aktarılmıştır. Ekspresyon kasetinin *P. pastoris* genomuna entegrasyonu *his4* lokusundan gerçekleştirilmiştir. Doğrusal hale getirilen sondan silme analizi örneklerinin agaroz jelde görüntüsü Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Doğrusal hale getirilen pADH3ZαA-XylB/HIS4 plazmitlerinin jel görüntüsü

#### 4.1.2. Sondan silme klonlarının Southern blot analizi

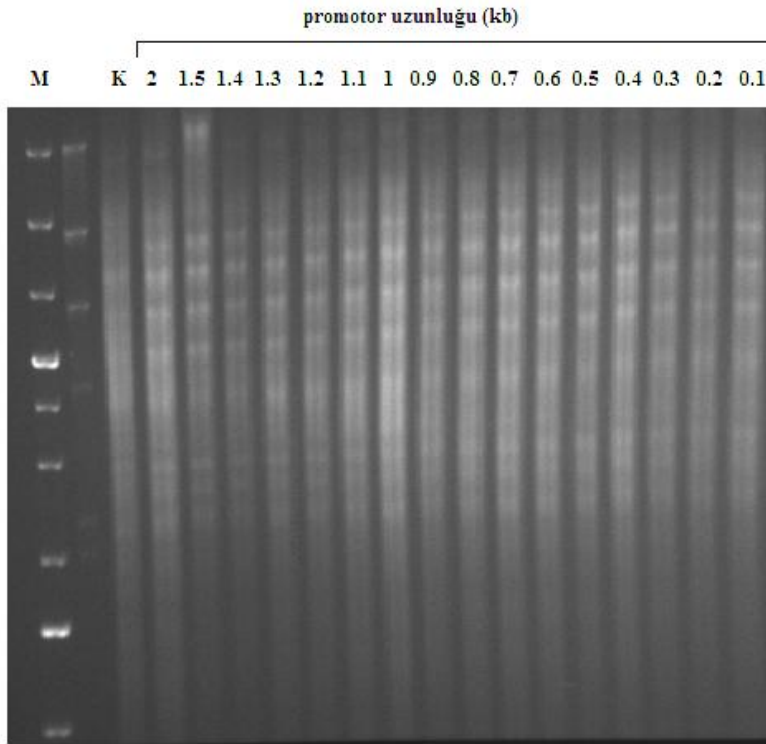
Sondan silme klonlarında ekspresyon kasetinin entegrasyonunun doğrulanması ve kopya sayısının belirlenmesi için Southern blot analizi gerçekleştirilmiştir. Southern blot analizinde kullanılan prob, *HIS4* geninden *HIS4618F-HIS41146R* primerleri ile çoğaltılan yaklaşık 530 bp uzunluğundaki PZR ürününün DIG ile etiketlenmesiyle elde edilmiştir. Etiketlenen probun etkinliği ölçüldüğünde, 0,1 pg/μL konsantrasyona kadar tespit edilebildiği görülmüştür (Şekil 4.7).



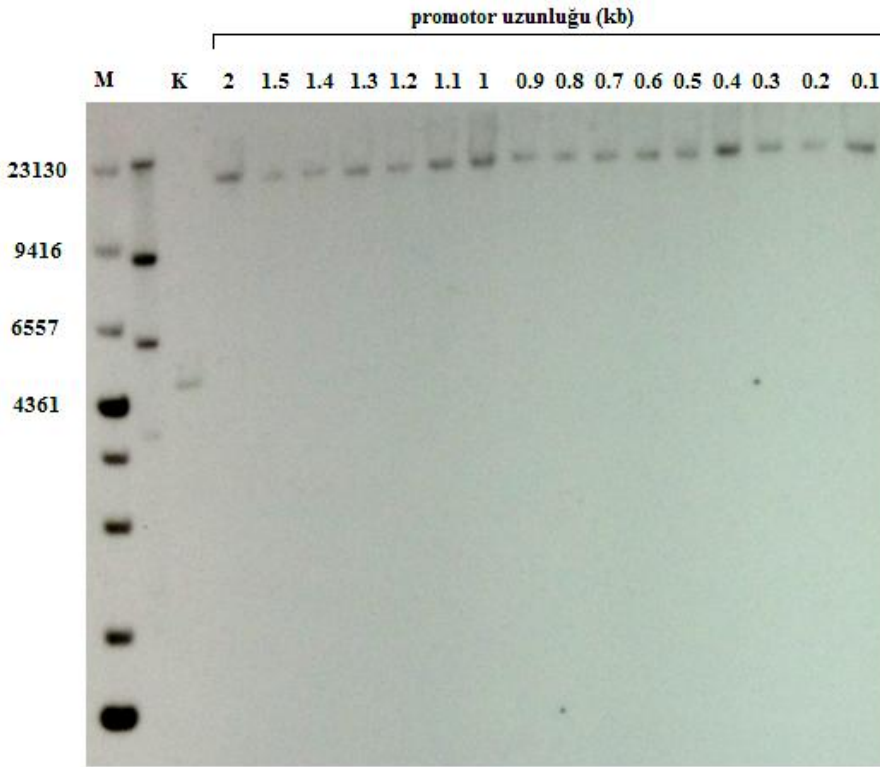
Şekil 4.7. *HIS4* bölgesinden elde edilen probun etkinlik analizi a) DIG etiketli DNA standardı b) *HIS4* probu

Klonların genomik DNA'ları HindIII enzimi ile kesilmiştir. Kontrol olarak *P. pastoris* GS115 genomik DNA'sı kullanılmıştır. Kontrol örneğinde beklenen bant teorik olarak 5485 bp iken 2000 bp *ADH3* promotorunu içeren klonda tek kopya ekspresyon kaseti için beklenen bant teorik olarak 14695 bp uzunluğundadır. Sondan silme işlemi 100'er bp olarak yapıldığından diğer klonlarda tek kopya ekspresyon kaseti için beklenen teorik bant uzunluğu da olarak 100'er bp olarak azalmaktadır. Artan kopya sayılarında beklenen tek kopya bant uzunluğuna ekspresyon kasetinin uzunluğu eklenmektedir.

Sondan silme analizi için oluşturulmuş 2000, 1500-100 bç *ADH3* promotorlarını içeren klonlardan genomik DNA izolasyonu yapılmıştır ve 1µg genomik DNA örnekleri HindIII enzimi ile gece boyu kesime bırakılmıştır. Enzimle kesim işlemi yapılmış DNA örnekleri %0,8'lik agaroz jelde yürütülerek ayrılmıştır. Örneklerin agaroz jel görüntüsü Şekil 4.8'de verilmiştir. Jelde kesim reaksiyonu kontrol edildikten sonra jeldeki DNA'ların pozitif yüklü membrana aktarımına geçilmiştir. İşlemler "Materyal ve Metot" bölümünde ayrıntılı şekilde anlatılmıştır. Görüntüleme işlemi sonunda elde edilen X-ışını film görüntüsü Şekil 4.9'da verilmiştir. Kontrol örneğinde teorik olarak beklenen 5485 bç bant gözlenirken, klonlarda tek kopya ekspresyon kaseti için teorik olarak beklenen bantlar gözlenmiştir. Klonların tek kopya ekspresyon kaseti içerdiği doğrulanmış ve analizlere protein üretimi ile devam edilmiştir.



Şekil 4.8. Sondan silme klonlarının Southern blot jeli görüntüsü

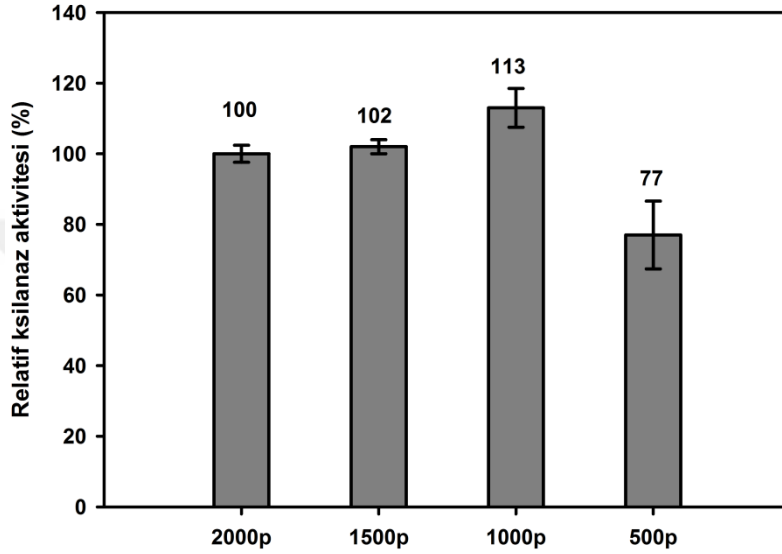


Şekil 4.9. Sondan silme analizinde gen kopya sayısının Southern blot ile doğrulanması

#### 4.1.3. Sondan silme klonları ile erlenmayer koşullarında protein üretimi

Promotor bölgesinin yaklaşık olarak belirlenmesi amacıyla ilk olarak 2000, 1500, 1000 ve 500 bç *ADH3* promotorları karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmanın tam olarak yapılabilmesi için tüm klonlar tek kopya ekspresyon kaseti içeren transformantlardan seçilmiştir. Karşılaştırma sırasında hem minimal hem zengin besiyeri test edilmiştir. İki besiyeri arasında klonlar arası promotor aktivitesi değişimlerinde fark gözlenmemiştir. Hücreler gliserol içeren besiyerinde yaklaşık 18 saat geliştirildikten sonra optik yoğunlukları eşitlenerek etanol besiyerinde indüksiyon fazına geçilmiştir. Karşılaştırma koşullarının optimizasyonu için protein üretimi sırasında 4, 8, 12 ve 24. saatlerde örnek alınmıştır. Zamana karşı hücre gelişimi (OD) ve ksilanaz aktiviteleri takip edilmiştir. Üretimlerde 12. saatlerde son konsantrasyon %1 olacak şekilde %100 etanol ile indüksiyon yapılmıştır. Ancak ek bir indüksiyon işleminin karışıklığa neden olabileceği gözlenmiştir ve bu nedenle hücre yoğunlukları ve enzim aktiviteleri göz önünde bulundurularak, karşılaştırma için en uygun örnek zamanı indüksiyon fazının 8. saati olarak belirlenmiştir. Toplanan süpernatant örneklerinde ksilanaz aktivitesi ölçülmüş ve her klonun ksilanaz aktivitesi/OD değerleri hesaplanarak bu değerler karşılaştırılmıştır. Böylece hücre yoğunluğundan kaynaklanacak aktivite yanılması elimine edilmiştir. Analizler 2 paralelli ve 2 tekerrür olarak yürütülmüştür.

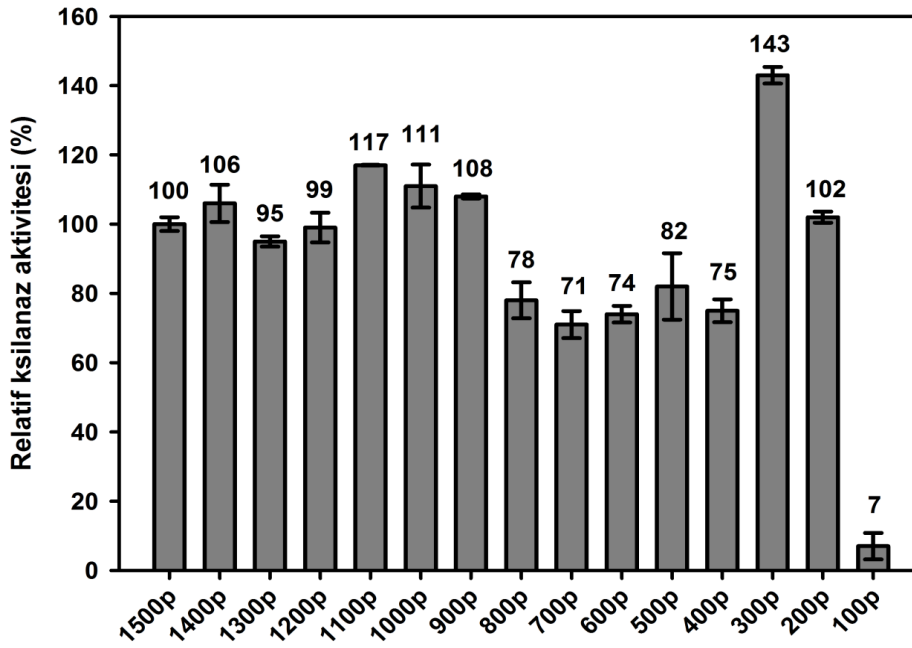
Şekil 4.10'da farklı uzunlukta promotor bölgeleri ile elde edilen relatif ksilanaz aktivite değerleri verilmiştir. Aktivite değerleri, 2000 bç promotor aktivitesi %100 alınarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar 2000, 1500 ve 1000 bç promotor aktivite değerleri arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığını göstermiştir ( $p < 0.05$ ). Sondan silme analizleri ile 1000 ve 500 bç arasındaki DNA bölgesinin silinmesi promotor aktivitesinde %30 düşüşe neden olmuştur. Dolayısıyla promotor 1000 bç'dir veya 1000 ile 500 arasındaki DNA bölgesidir.



Şekil 4.10. *ADH3* promotor bölgesinin yaklaşık olarak belirlenmesi

Sondan silme analizleri sonucunda 1500 bç ve 1000 bç promotor aktivite değerlerinde istatistiksel olarak bir fark gözlenmemesine rağmen %10'luk aktivite değişimi dikkate alınarak sondan silme işlemi deneysel olarak 1500 bç'den 100 bç promotor bölgesine kadar 100'er bç olarak sürdürülmüştür.

Tek kopya ekspresyon kaseti içeren klonlar seçilmiş ve gliserol besiyerinde yaklaşık 18 saat geliştirilen hücreler, tek karbon kaynağı olarak etanol içeren besiyerinde induksiyon fazına geçirilmiş ve 8. saatte hasat edilmiştir. Süpernatant örneklerinde ölçülen ksilanaz aktivitesi sonucunda promotorun sondan silme analizi sonucu aşağıdaki grafikte elde edilmiştir (Şekil 4.11). Silme işlemi 1500 bç promotordan itibaren 100'er bç olarak gerçekleştirildiğinden bu aşamada karşılaştırırken 1500 bç promotor ile elde edilen aktivite değeri %100 olarak alınmıştır. Diğer promotorlar bu değere göre relatif olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.11. *ADH3* promotor bölgesinin belirlenmesi

Sondan silme analizleri ile elde edilen sonuçlar 1000 bç promotor ile 900 bç promotor arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığını ancak 900 bç ile 800 bç promotor aktivitesinde istatistiksel olarak fark olduğunu göstermiştir ( $p < 0.05$ ). Dolayısıyla promotor aktivitesinin tam olarak devam ettiği en kısa DNA bölgesinin 900 bç olarak belirlenmiştir.

Sondan silme analizleri ile elde edilen sonuçlar, her bir silme işleminin artış yada azalış yönündeki etkisine bağlı olarak regülatör bölgeler hakkında fikir verebilmektedir. Ancak daha kesin bilgi için belirlenen *ADH3* promotor bölgesi üzerinde içten silme analizleri ile devam edilmiştir.

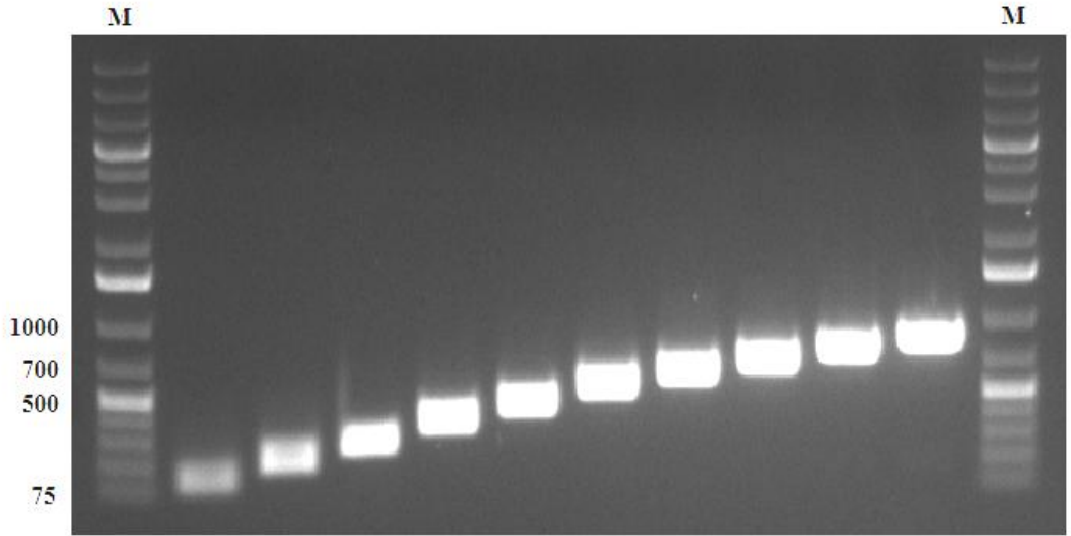
#### 4.2. *ADH3* Promotorunun Düzenlenmesinden Sorumlu DNA Bölgelerinin Belirlenmesi

*ADH3* promotorunun regülasyonundan sorumlu DNA bölgelerinin tespit edilmesi için belirlenen 900 bç *ADH3* promotorunun sistematik içten silme analizleri gerçekleştirilmiştir. DNA heliks yapısında her bir dönüşün 11 bç olduğu göz önünde bulundurularak içten silme analizinde silinen parçalar 99 bç olarak 11'in katı şeklinde belirlenmiştir. Ayrıca silme noktalarının da analiz edilebilmesi için, silinecek her bir parça bir önceki parçadan 22 bç DNA dizisi içerecek şekilde tasarlanmıştır.

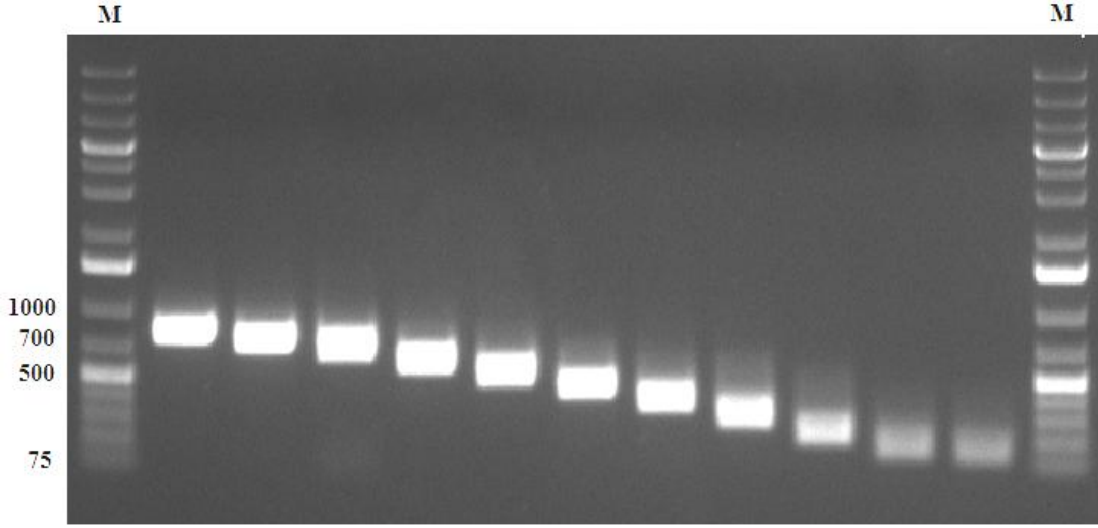
##### 4.2.1. İçten silme analizi için ekspresyon plazmitlerinin elde edilmesi ve *P. pastoris*'e transformasyonu

Promotorun içten silme analizinde, mutant *ADH3* promotorları overlap PZR yöntemi ile elde edilmiştir. Yöntem, "Materyal ve Metot" bölümünde ayrıntılı şekilde

anlatılmıştır. Yöntemin şematik gösteriminde de görülebileceği gibi silinmesi hedeflenen A-K bölgelerinin solunda (5') ve sağında (3') kalan DNA bölgeleri iki ayrı parça olarak çoğaltılmıştır. Şekil 4.12'de sol bölgede yer alan DNA bölgelerinin PZR ürünleri B'den K'ya sıralı olarak verilmiştir. En küçük parça 77 bç'dir ve B'den K'ya 77 bç artış göstererek devam etmektedir. Şekil 4.13'de sağ bölgede yer alan DNA bölgelerinin PZR ürünleri A'dan K'ya sıralı olarak verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi sağda kalan parçalar A'dan J'ye 801 bç'den 77 bç azalarak devam etmektedir. Ancak en son K bölgesi silinirken TATA kutusunun silinmemesi için içten silme işlemi 44 bç olarak gerçekleştirilmiştir.



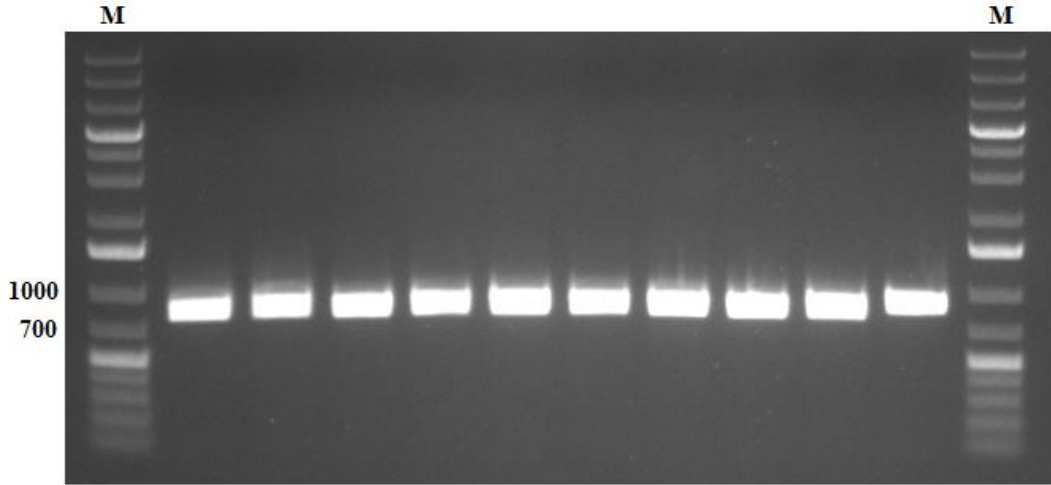
Şekil 4.12. İçten silme analizlerinde sol bölgenin (5') PZR ürünleri (Sırası ile B-K)



Şekil 4.13. İçten silme analizlerinde sağ bölgenin (3') PZR ürünleri (A-K)

Silinmesi hedeflenen A-K bölgelerinin 5' ve 3' ucundaki DNA bölgeleri çoğaltıldıktan sonra bu bölgelerin birleştirilmesi için ikinci PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu PZR reaksiyonunda Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'deki PZR ürünleri kalıp olarak kullanılmıştır. Mutant *ADH3* promotorlarının çoğatılacağı bu son aşamada dıştan çoğaltan (önceki PZR'de sol bölgeyi çoğaltan forward primer ile sağ bölgeyi çoğaltan reverse primer) enzim tanıma bölgeleri içeren forward (BamHI) ve reverse (AsuII) primerler kullanılmıştır. PZR sonunda iki bölge birleşerek, hedeflenen bölgeleri silinmiş promotorlar tek parça olarak elde edilmiştir (Şekil 4.14). Elde edilen PZR ürünlerinde de görüldüğü gibi içten 99 bç silinen mutant *ADH3* promotorları ( $\Delta$ A- $\Delta$ J) 801 bç'dir. TATA kutusuna yakın K bölgesi ise 44 bç silinmiştir ve elde edilen  $\Delta$ K promotoru 856 bç'dir.





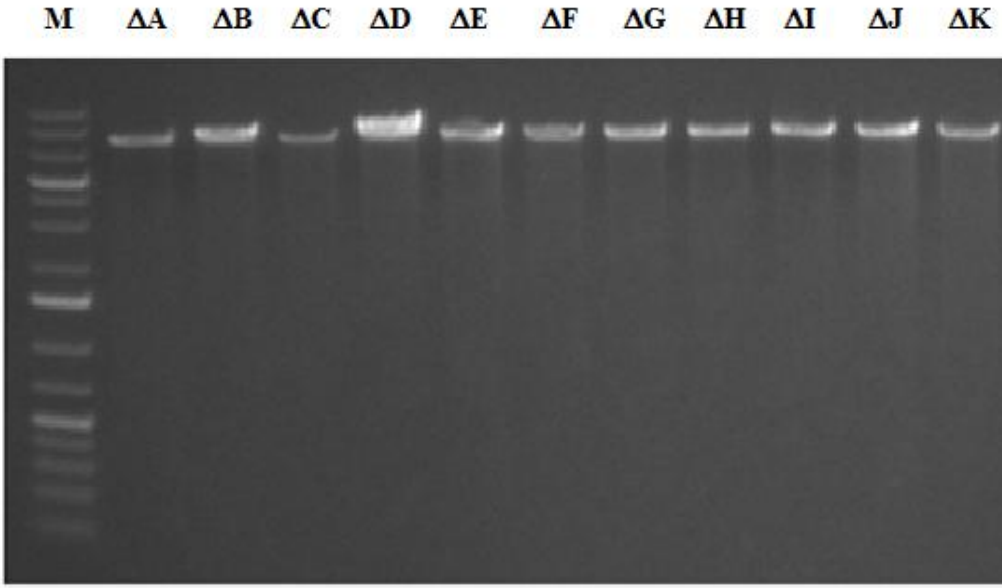
Şekil 4.14. İçten silme analizlerinde sağ ve sol parçaların birleştirilmesi ile elde edilen mutant *ADH3* promotorları (Sırası ile  $\Delta A$ - $\Delta K$ )

Elde edilen PZR ürünleri BamHI-AsuII ile kesilmiş ve BglIII-AsuII ile *AOX1* promotörü düşürülmüş pPICZ $\alpha$ A plazmidine bağlanmıştır. Elde edilen plazmitler pADH3Z $\alpha$ A- $\Delta A$ , pADH3Z $\alpha$ A- $\Delta K$  şeklinde adlandırılmıştır.

Ekspresyon vektöründe raportör olarak *XylB*, marker olarak *HIS4* bulunmaktadır. Ayrıca genoma plazmidin entegrasyonu da yine GS115 *his4* lokusundan gerçekleştirilecektir. Bu nedenle pADH3Z $\alpha$ A- $\Delta$ -*XylB*/*HIS4* ekspresyon vektörlerini oluşturmak için pADH3Z $\alpha$ A- $\Delta$  plazmitleri ve daha önceden oluşturulmuş olan pPICZ $\alpha$ A-*XylB*/*HIS4* plazmidi XhoI-SmaI enzimleri ile kesilerek XhoI-SmaI bölgelerinden birbirlerine bağlanmıştır.

Bağlanan parçalar pADH3Z $\alpha$ A- $\Delta$  plazmidinin XhoI-SmaI kesimi sonucu mutant *ADH3* promotörünü içeren kısmı ile pPICZ $\alpha$ A-*XylB*/*HIS4* plazmidinin XhoI-SmaI kesimi sonucu *XylB* ve *HIS4* genini içeren kısmıdır. Bu tez çalışmasında bulunan tüm ekspresyon plazmitleri aynı strateji ile oluşturulmuştur. Klonlama aşamaları daha önce Şekil 3.3'de şematik olarak gösterilmiştir.

Oluşturulan tüm ekspresyon plazmitleri Kpn2I enzimi ile *HIS4* geninden doğrusal hale getirilmiş ve *P. pastoris* GS115 suşuna aktarılmıştır. Ekspresyon kasetinin *P. pastoris* genomuna entegrasyonu *his4* lokusundan gerçekleştirilmiştir. Doğrusal hale getirilen içten silme örneklerinin agaroz jelde görüntüsü Şekil 4.15'de verilmiştir.



Şekil 4.15. Doğrusal hale getirilen pADH3ZαA-Δ-XylB/HIS4 plazmitlerinin jel görüntüsü

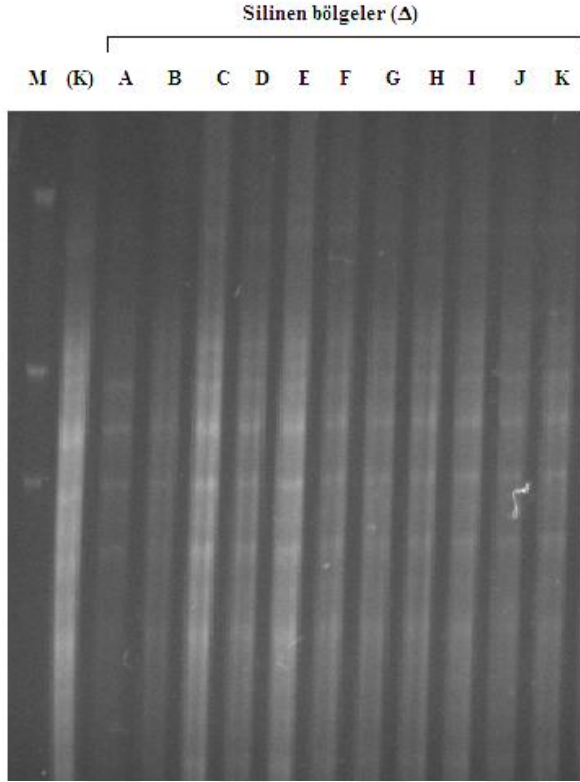
#### 4.2.2. İçten silme klonlarının Southern blot analizi

İçten silme klonlarında ekspresyon kasetinin entegrasyonunun doğrulanması ve kopya sayısının belirlenmesi için Southern blot analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada tüm Southern blot analizlerinde aynı prob kullanılmıştır. Southern blot analizinde kullanılan prob, *HIS4* geninden *HIS4618F-HIS41146R* primerleri ile çoğaltılan yaklaşık 530 bp uzunluğundaki PZR ürününün DIG ile etiketlenmesiyle elde edilmiştir. Prob etkinliğinin ölçülmesi "4.1.2. Sondan silme klonlarının Southern blot analizi" başlığı altında anlatılmıştır.

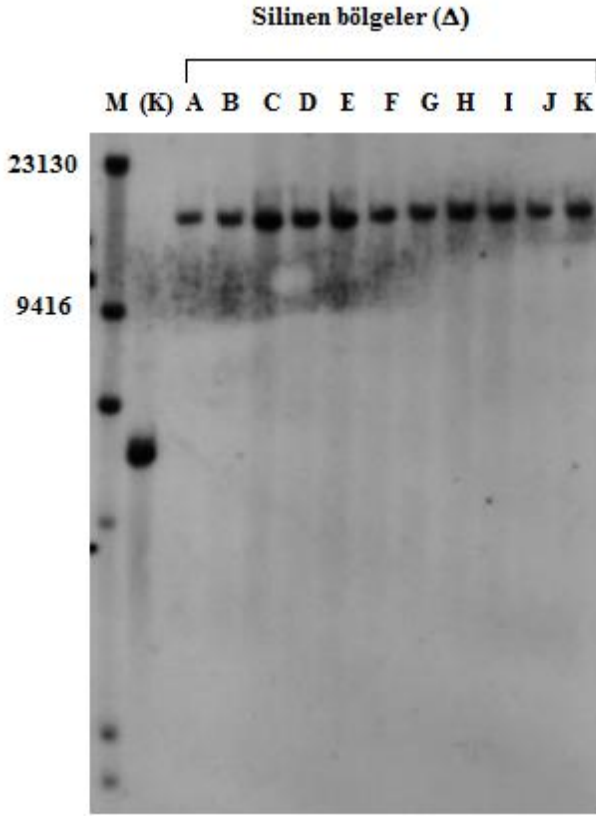
Klonların genomik DNA'ları HindIII enzimi ile kesilmiştir. Kontrol olarak *P. pastoris* GS115 genomik DNA'sı kullanılmıştır. Kontrol örneğinde beklenen bant teorik olarak 5485 bp iken tek kopya ekspresyon kaseti için klonlarda beklenen bant teorik olarak 13495 bp uzunluğundadır. İçten silme işlemi tüm klonlarda 99 bp olarak yapıldığından beklenen teorik bant uzunluğu da tüm promotorlar için aynı olmaktadır.

İçten silme analizi için oluşturulmuş mutant *ADH3* promotorlarını içeren klonlardan genomik DNA izolasyonu yapılmıştır ve 1 µg genomik DNA örnekleri HindIII enzimi ile gece boyu kesime bırakılmıştır. Enzimle kesim işlemi yapılmış DNA örnekleri %0,8'lik agaroz jelde yürütülerek ayrılmıştır. Örneklerin agaroz jel görüntüsü Şekil 4.16'da verilmiştir. Jelde kesim reaksiyonu kontrol edildikten sonra jeldeki DNA'ların pozitif yüklü membrana aktarımına geçilmiştir. İşlemler "Materyal ve Metot" bölümünde ayrıntılı şekilde anlatılmıştır. Görüntüleme işlemi sonunda elde edilen X-ışını film görüntüsü Şekil 4.17'de verilmiştir. Film görüntüsünde kontrol örneğinde teorik olarak beklenen 5485 bp bant gözlenirken, klonlarda tek kopya ekspresyon kaseti için teorik olarak beklenen bantlar gözlenmiştir. Böylece klonların tek kopya

ekspresyon kaseti içerdiği doğrulanmış ve analizlere protein üretimi ile devam edilmiştir.



Şekil 4.16. Sondan silme klonlarının Southern blot jeli görüntüsü

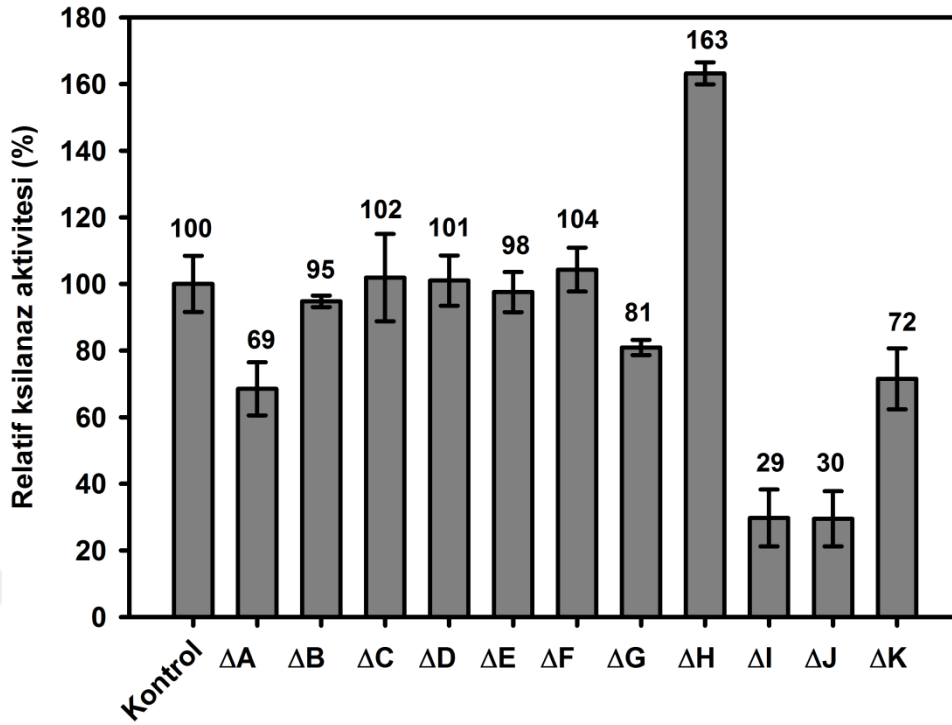


Şekil 4.17. İçten silme analizinde gen kopya sayısının Southern blot ile doğrulanması

#### 4.2.3. İçten silme klonları ile erlenmayer koşullarında protein üretimi

*ADH3* promotorunun regülasyonundan sorumlu DNA bölgelerinin tespit edilmesi için belirlenen, bir önceki sondan silme analizleri ile belirlenen 900 bç *ADH3* promotor bölgesi üzerinde içten silme analizi gerçekleştirilmiştir.

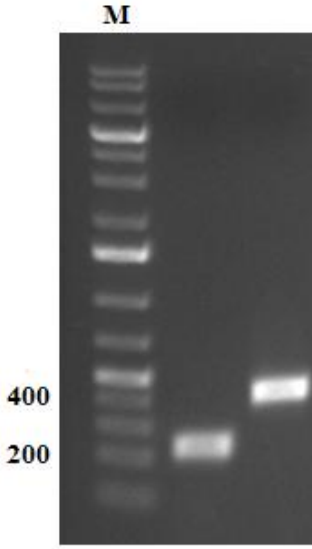
Tek kopya ekspresyon kaseti içeren klonlar seçilmiş ve erlenmayer koşullarında rekombinant protein üretimi ile devam edilmiştir. Hücrelerin belli bir yoğunluğa ulaşması için gliserol besiyerinde yaklaşık 18 saat geliştirilen kültürler, aynı OD değerinden başlayacak şekilde etanol besiyerinde indüksiyon aşamasına geçirilmiştir. İndüksiyonun 8. saatinde hücreler hasat edilerek, süpernatant örneklerinde ksilanaz aktivitesi ölçülmüştür. İçten silme örneklerinin aktivite değerleri 900 bç promotor (Kontrol) ile kaydedilen ksilanaz aktivitesi %100 alınarak relatif olarak hesaplanmıştır. İçten silme analizleri sonucunda elde edilen promotor aktivitelerini gösteren grafik Şekil 4.18'de gösterilmiştir.



Şekil 4.18. *ADH3* promotorunun içten silme klonları ile elde edilen ksilanaz aktiviteleri (Kontrol: 900 bç uzunluğundaki *ADH3* promotoru)

İçten silme analizi ile elde edilen sonuçlar A, G, H, I, J ve K bölgelerinde içten silme analizi sonucunda doğal 900 bç *ADH3* promotoruna göre istatistiksel olarak fark olduğunu göstermiştir ( $p < 0.05$ ). Dolayısıyla bu sonuç, belirtilen DNA bölgelerinde promotor regülasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan dizilerin olduğunu göstermektedir. Silinmesi halinde promotor aktivitesinde düşüşe neden olan A, G, I, J ve K bölgeleri promotor aktivitesinde pozitif regülasyondan sorumlu (UAS, Upstream Activator Site) bölgelerdir. Aksine silindiğinde promotor aktivitesinde artışa neden olan H bölgesi negatif regülasyondan sorumlu (URS, Upstream Repressor Site) bir bölgedir.

Promotorun B, C, D, E, F bölgelerinde yapılan silme işlemleri ile promotor aktivitesinde istatistiksel olarak aktivite farkı görülmemiştir ( $p < 0.05$ ). Bunun üzerine aktivite göstermediği belirtilen B, C, D, E, F bölgelerinin içinde kalan 900 bç *ADH3* promotoru üzerinde nükleotit 200 ila 500 (-700 ila -400) arasındaki DNA bölgesi silinmiştir. Silme işlemi overlap PZR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Overlap PZR'de kalıp olarak kullanılacak olan, silinmesi hedeflenen bölgenin 5' ve 3' ucunda kalan sırası ile 200 ve 400 bç uzunluğundaki DNA bölgelerinin jel görüntüsü Şekil 4.19'da verilmiştir. Ekspresyon vektörü yukarıda diğer klonlar için anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. BamHI-AsuII ile kesilen PZR ürünü, *AOX1* promotoru düşürülmüş pPICZ $\alpha$ A plazmidine bağlanmıştır. Ardından elde edilen pADH3 $\Delta$ 700-400 plazmidini XhoI-SmaI ile kesilmiş ve XhoI-SmaI ile kesilmiş pPICZ $\alpha$ A-XylB/HIS4 plazmidine bağlanmıştır. Oluşturulan ekspresyon plazmidini (pADH3 $\Delta$ 700-400-XylB/HIS4) Kpn2I enzimi ile *HIS4* geninden doğrusallaştırılarak GS115'e aktarılmıştır. Southern blot analizi ile tek kopya ekspresyon kaseti içeren klonda teorik olarak beklenen 13295 bç bant gözlenmiş ve klonun tek kopya olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.20).



Şekil 4.19. Mutant  $\Delta 700-400$  bölgesinin elde edilmesinde kullanılan sol (5') ve sağ (3') overlap PZR bölgeleri

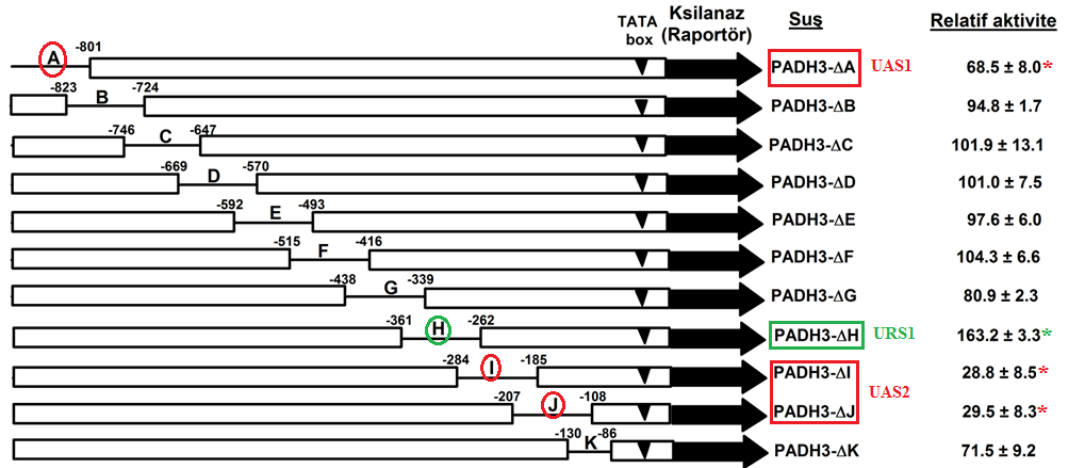


Şekil 4.20. Mutant  $\Delta 700-400$  klonunun Southern blot analizi film görüntüsü

Tek kopya ekspresyon kaseti içerdiği doğrulanan  $\Delta 700-400$  klonunu ile erlenmayer koşullarında ksilanaz üretildiğinde, 900 bç promotor ile elde edilen aktivitenin %94'ü düzeyinde aktivite elde edilmiş ve istatistiksel olarak da 900 bç promotor ile aktivite farkı olmadığı belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu sonuç içten silme analizleri ile de örtüşmektedir.

### 4.3. Sentetik Promotorların Oluşturulması

Silme analizlerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda 900 bç *ADH3* promotoru üzerinde nükleotit 0 ila 99 (-900 ila -801) UAS1; nükleotit 616 ila 792 (-284 ila -108) UAS2, nükleotit 539 ila 638 (-361 ila -262) URS1 olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.21).

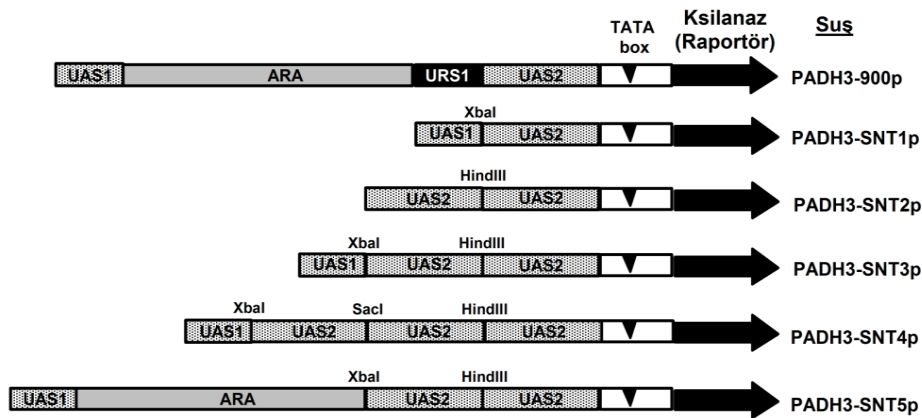


Şekil 4.21. İçten silme analizleri doğrultusunda aktivatör ve represör bölgelerin belirlenmesi

Belirlenen aktivatör (UAS1 ve UAS2) bölgeler kullanılarak beş farklı sentetik promotör oluşturulmuştur. Oluşturulan tüm sentetik promotörlerde *ADH3* promotörü TATA kutusunu içeren nükleotit 792 ila 900 (-108 ila 0) bölgesi bulunmaktadır.

*ADH3-SNT5* promotöründe “ara” olarak belirtilen bir bölge daha bulunmaktadır. Bu bölge 900 bç *ADH3* promotörü üzerinde UAS1, UAS2, URS1 ve -108 ila 0 bölgeleri dışında kalan bölgedir ve nükleotit 100 ila 538 (-800 ila -362) arasında kalan ara bölgeyi göstermektedir.

Sentetik bölgelerin oluşturulmasında kullanılan bölgelerin birleştirilmesinde enzim tanıma bölgeleri kullanılmıştır. Sentetik promotörlerin içerdiği bölgeler ve bu bölgelerin birleştirilmesinde kullanılan endonükleaz enzim tanıma bölgeleri Şekil 4.22’de şematize edilerek gösterilmiştir.



Şekil 4.22. Sentetik promotörlerin şematik gösterimi

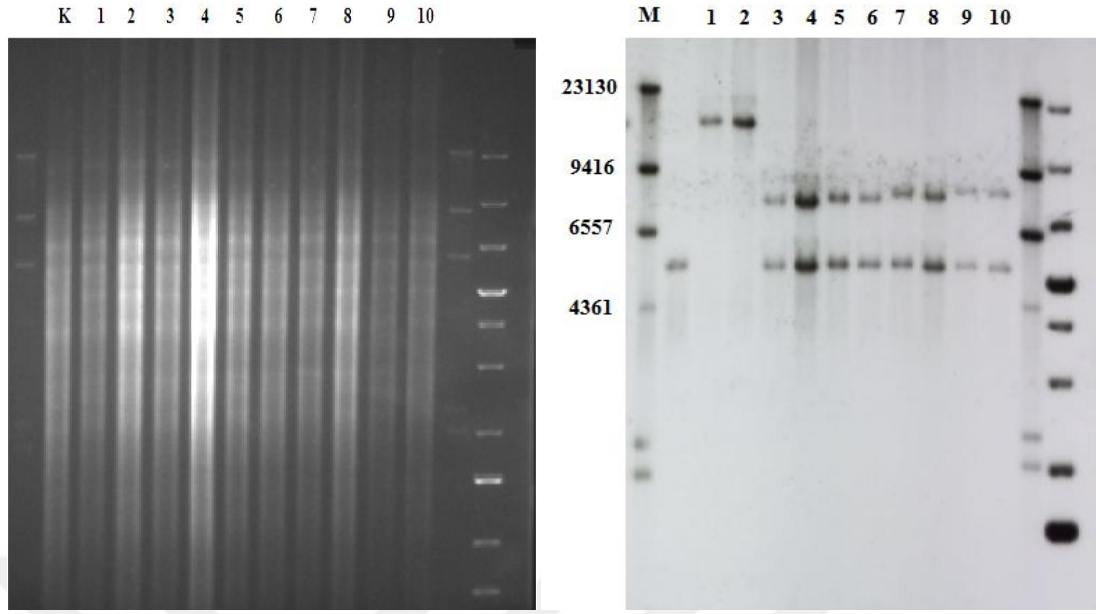
Sentetik promotörü oluşturulan bölgeler PCR yöntemi ile çoğaltılmış ve Şekil 4.22'de gösterilen enzim tanıma bölgelerinden kesilmiştir. Parçaların birbirlerine bağlanmasında ligasyon kiti (Fermentas T4 DNA Ligase, ABD) kullanılmıştır. Ligasyon işlemi 22°C'de 15 dak sürede gerçekleştirilmiştir. Promotor bölgesini içeren ligasyon çözeltisine pürifikasyon işlemi (PCR Purification Kit, Qiagen, Almanya) uygulanmış ve klonlama aşamasına geçilmiştir. Elde edilen promotör bölgeleri BglII-AsuII ile *AOX1* promotörü düşürülmüş pPICZ $\alpha$ A plazmidine bağlanmıştır ve oluşturulan plazmitler pSNT(1-5) $\alpha$ A olarak isimlendirilmiştir. Ekspresyon vektörünü elde etmek için önceki bölümlerde de anlatıldığı gibi XhoI-SmaI ile kesilerek, XhoI-SmaI ile kesilmiş pPICZ $\alpha$ A-XylB/HIS4 ile bağlanmıştır. Bağlanan kısımlar sentetik promotörü plazmidinden promotörü içeren kısım ile pPICZ $\alpha$ A-XylB/HIS4 plazmidinden XylB ve HIS4 genlerini içeren kısımdır. Böylece ekspresyon vektörleri pADH3-SNT(1-5)p oluşturulmuştur. Ekspresyon vektörleri Kpn2I ile doğrusallaştırılarak *his4* lokusundan *P. Pastoris* GS115 genomuna entegre edilmiştir. Dizayn edilen sentetik promotörlere ait DNA dizileri Ek 8.4'de verilmiştir.

Elde edilen transformantlarda Southern blot analizi ile ekspresyon kasetinin entegrasyonu doğrulanmış ve ekspresyon kaseti kopya sayısı belirlenmiştir. Southern blot analizinde çalışmada diğer Southern blot analizlerinde de kullanılmış olan *HIS4* geninden hazırlanmış DIG etiketli prob kullanılmıştır.

Klonların genomik DNA'ları HindIII enzimi ile kesilmiştir. Kontrol olarak *P. pastoris* GS115 genomik DNA'sı kullanılmıştır. Kontrol örneğinde beklenen bant teorik olarak 5485 bp iken, tek kopya ADH3-SNT1 promotörü için 13084 bp; ADH3-SNT2 promotörü için 7870 ve 5291 bp; ADH3-SNT3 promotörü için 7975 ve 5291 bp; ADH3-SNT4 promotörü için 8157 ve 5291 bp; ADH3-SNT5 promotörü için 8415 ve 5291 bp'dir.

Sentetik *ADH3* promotörlerini içeren klonlardan genomik DNA izolasyonu yapılmıştır ve 1 $\mu$ g genomik DNA örnekleri HindIII enzimi ile gece boyu kesime bırakılmıştır. Enzimle kesim işlemi yapılmış DNA örnekleri %0,8'lik agaroz jelde yürütülerek ayrılmıştır. Örneklerin agaroz jel görüntüsü ve membrana aktarıldıktan sonra görüntüleme işlemleri sonunda elde edilen X-ışını film görüntüsü Şekil 4.23'de verilmiştir.

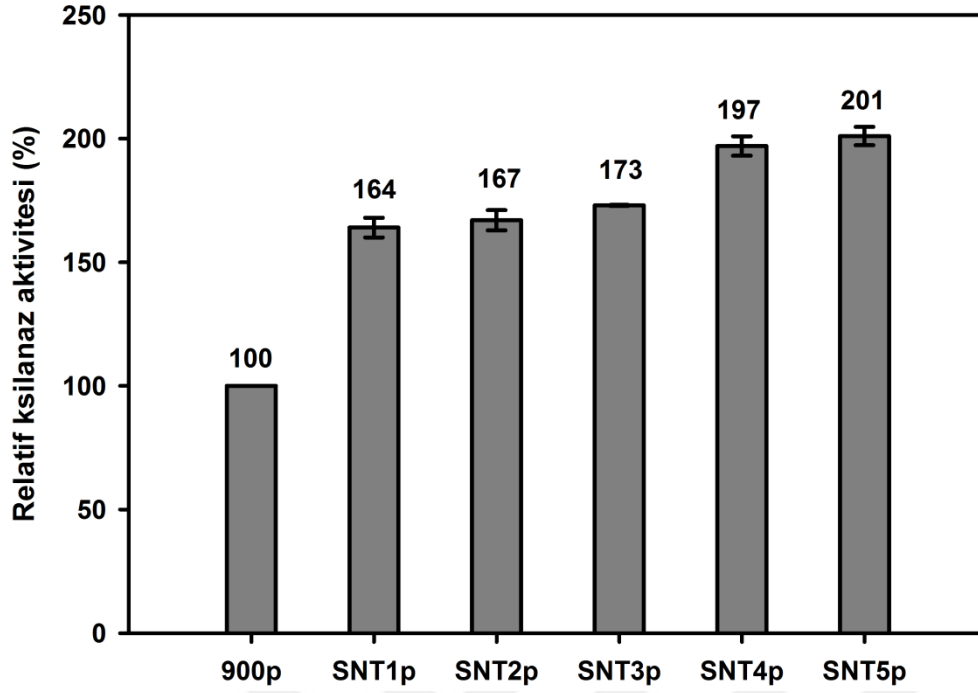




Şekil 4.23. Sentetik *ADH3* promotorlarının Southern blot analizi: örneklerin agaroz jel görüntüsü ve X-ışını film görüntüsü (1-2: ADH3-SNT1, 3-4: ADH3-SNT2, 5-6: ADH3-SNT3; 7-8: ADH3-SNT4, 9-10: ADH3-SNT5)

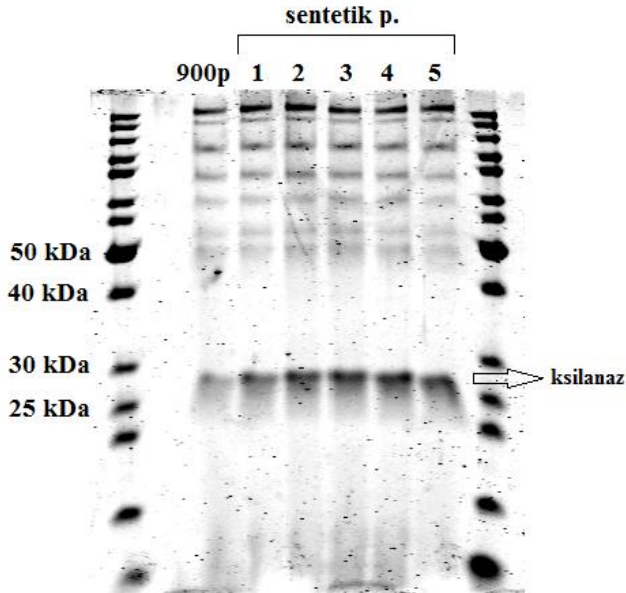
Her bir sentetik promotörü için 2 klon analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar tüm klonların tek kopya ekspresyon kaseti içerdiğini göstermiştir ve erlenmayer üretimlerine 1. klonlar ile devam edilmiştir.

Erlenmayer analizleri silme analizlerinde de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Gliserol besiyerinde yaklaşık 18 saat geliştirilen hücreler, optik yoğunlukları (OD) eşit olacak şekilde etanol besiyerine geçirilmiştir. Hücreler 8. saat sonunda hasat edilmiş ve süpernatant örneklerinde enzim aktivitesi ölçülmüştür. Örneklerin aktivite/OD değerleri hesaplanarak karşılaştırırken bu değerler kullanılmıştır. Karşılaştırmada 900 bç *ADH3* promotörü ile elde edilen aktivite/OD sonucu %100 olarak alınmış ve diğer örnekler bu değere göre relatif olarak hesaplanmıştır. Elde edilen aktivite sonuçları Şekil 4.24'de sütun grafiğinde gösterilmiştir. Süpernatant örneklerindeki proteinler SDS-PAGE analizi görüntülenmiştir (Şekil 4.25).



Şekil 4.24. Sentetik *ADH3* promotorları ile elde edilen ksilanaz aktiviteleri

Sonuçlar, *ADH3*-SNT1, SNT2 ve SNT3'ün yaklaşık olarak aynı güçte olduğunu ve doğal *ADH3* promotorunun (900 bç promotor) yaklaşık %170'i seviyesinde güçlü olduğunu gösterirken, SNT4 ve SNT5 ile yaklaşık %200 değerlerine ulaşılmıştır.



Şekil 4.25. *ADH3* promotoru (900 bç) ve sentetik promotorlar ile erlenmayer koşullarında ksilanaz üretiminin SDS-PAGE görüntüsü

#### 4.4. Fermentör Çalışmaları

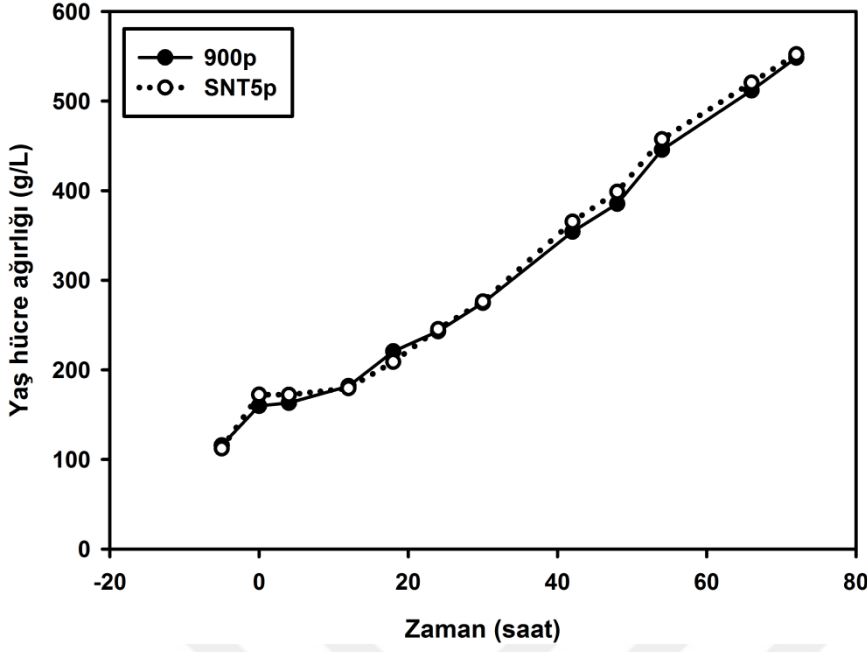
Elde edilen sentetik promotörlerden en yüksek aktivite gösteren SNT5 promotörü ile doğal *ADH3* promotörü (900ç) fermentör koşullarında karşılaştırılmıştır. Aynı koşullarda gerçekleştirilen fermentör örneklerinden belirli aralıklarla örnekler alınarak fermentasyon süresince yaş hücre ağırlığı, toplam protein miktarı ve ksilanaz aktivitesi takip edilmiştir.

Çalışmada gerçekleştirilen fermentasyon işlemleri, 3 aşamalı yarı-kesikli sistemle yürütülmüştür. Fermentasyonlar 900 rpm karıştırıcı hızında, 1,5 vvm hava beslemesi ile 30°C'de ve pH 5'te gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon ortamında çözülmüş oksijen miktarı %30 olacak şekilde gerektiğinde saf oksijen ile kontrol edilmiştir.

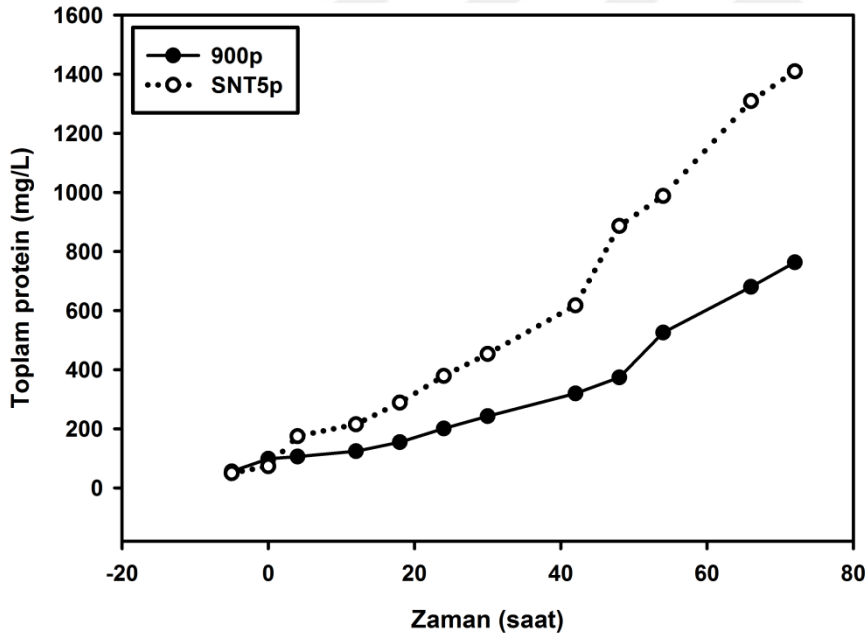
Fermentasyonun ilk aşaması olan kesikli (batch) faz, %4 gliserol içeren 2 L temel tuz besiyerinde (BSM, Basal Salt Media) gerçekleştirilmiştir. Bu faz yaklaşık 16 saat sürmüştür ve ortamdaki gliserolün tükenmesi üzerine çözülmüş oksijendeki ani artış gözlemlendiğinde sona ermiştir. Fermentör kültüründe ilk örnek bu aşamada alınmıştır (-5.saat örneği).

Fermentasyon işleminin ikinci aşaması gliserol besleme (fed-batch) fazına geçilmiştir. Bu fazda %50 gliserol kullanılarak 2 saat boyunca 16 mL/L/sa olacak şekilde gliserol beslemesi yapılmıştır. Ardından 3 saatlik süre içinde besleme hızı 16 mL/L/sa'dan 0 mL/L/sa'ya lineer olarak düşürülmüştür. Çözülmüş oksijen miktarındaki artış gözlemlendiğinde (karbon kaynağı tükendiğinde) bu faz sona ermiştir ve fermentör kültüründen 0.saat örneği alınmıştır.

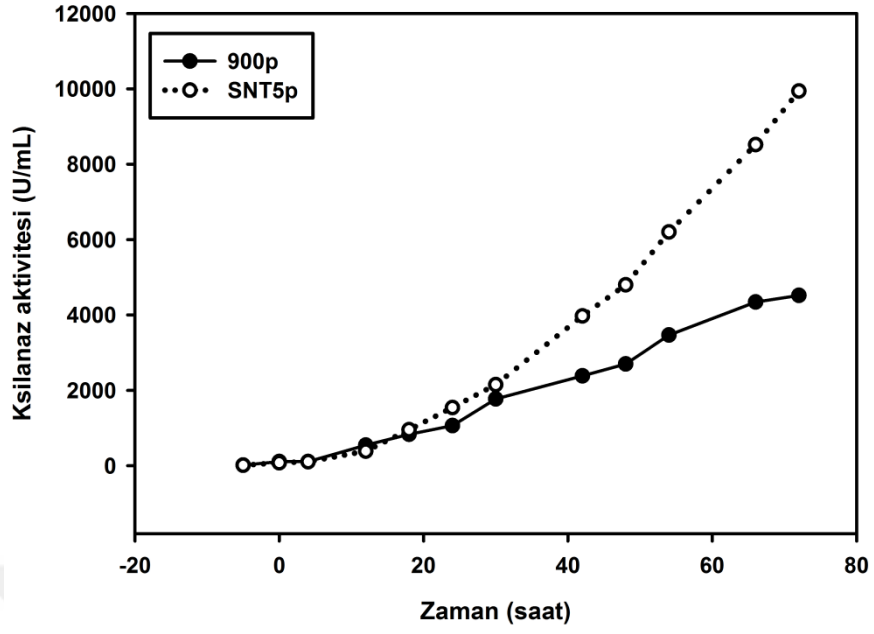
Fermentasyonun üçüncü aşaması etanol besleme fazıdır. Gliserolün tükenmesi ile çözülmüş oksijen miktarındaki ani artış üzerine ortama 2 mL/L 100% etanol eklenmiştir. Eklenen etanol tükendiğinde, ortamdaki yan ürünlerin tüketilmesi için hücreler yaklaşık 30 dakika aç bırakılmıştır. Hücrelerin etanole adaptasyonu sağlanana kadar bu işlem tekrar edilmiştir. Adaptasyon sağlandığında etanol besleme hızı 1,5 mL/L/sa'dan 9 mL/L/sa düzeyine kadar kademeli olarak arttırılmıştır. İndüksiyon fazı 72 saat sürdürülmüştür. İndüksiyon fazı boyunca belirli aralıklarla örnekler alınarak, zamana karşı yaş hücre ağırlığı, protein miktarı ve ksilanaz aktivitesi takip edilmiştir. Şekil 4.26'da fermentasyon boyunca 900 bç promotör ve SNT5 promotörü ile elde edilen hücre yoğunlukları yaş hücre ağırlıkları değişimi ile gösterilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi hücre gelişimi yönünden iki promotör arasında kayda değer bir fark görülmemiştir. Şekil 4.27'de süpernatant örneklerinde ölçülen toplam protein değerleri görülmektedir. Elde edilen grafikte SNT5 fermentasyonu ile toplam protein miktarının daha yüksek olduğunu göstermektedir. Şekil 4.28'de fermentasyon boyunca ksilanaz aktivitesi değişimi görülmektedir. Doğal 900 bç *ADH3* promotörüne göre SNT5 promotörü ile elde edilen ksilanaz aktivitesi değerleri de protein miktarına paralel olarak daha yüksektir. Şekil 4.29'da 900 bç promotörün, Şekil 4.30'da SNT5 promotörünün süpernatant örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü verilmiştir. Fermentasyonların yaş hücre ağırlıkları, toplam protein miktarı ve ksilanaz aktiviteleri sayısal değerler halinde Çizelge 4.1'de verilmiştir.



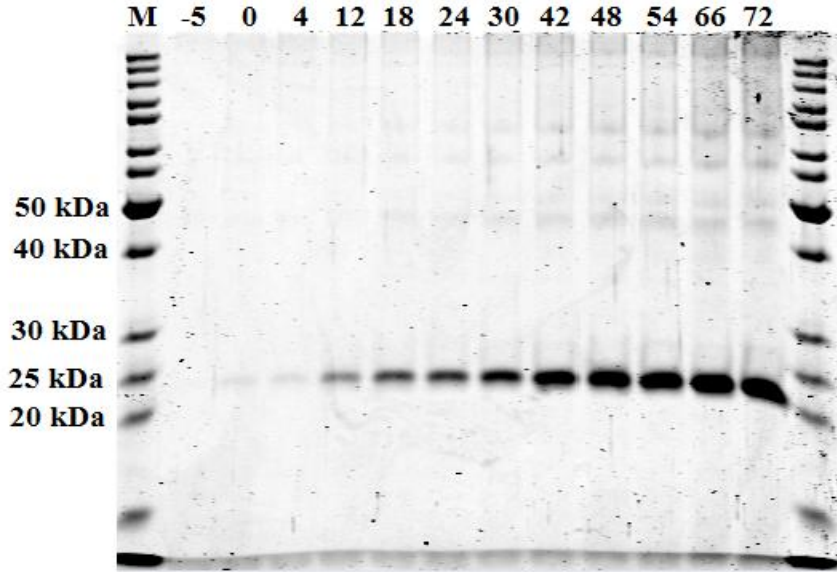
Şekil 4.26. Fermentör koşullarında yaş hücre ağırlığının zamanla değişimi



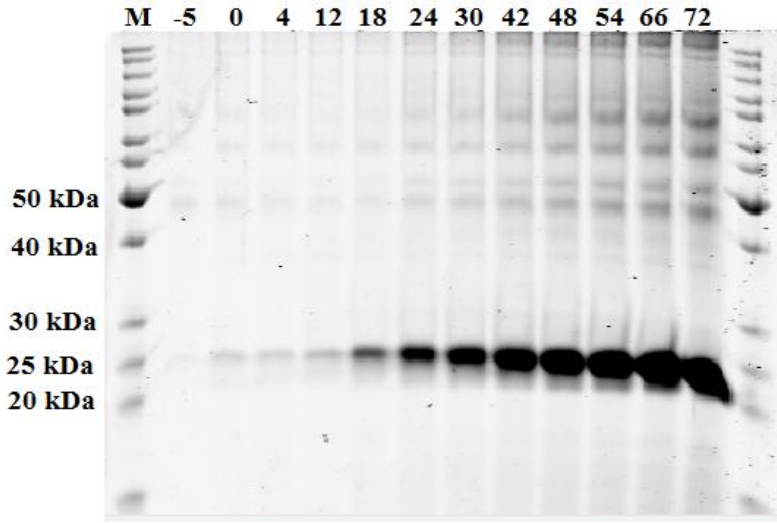
Şekil 4.27. Fermentör koşullarında süpernatant örneklerinde ölçülen toplam protein miktarının zamanla değişimi



Şekil 4.28. Fermentör koşullarında süpernatant örneklerinde ölçülen ksilanaz aktiviteleri



Şekil 4.29. Fermentör koşullarında 900 bç *ADH3* promotörü süpernatant örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü



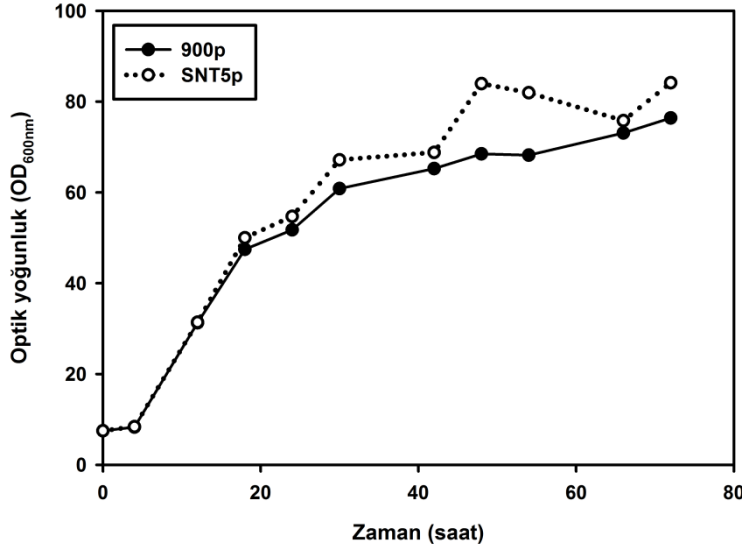
Şekil 4.30. Fermentör koşullarında SNT5 promotörü süpernatant örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü

Çizelge 4.1. Fermentör örneklerinde (900p ve SNT5p) zamana karşı yaş hücre ağırlığı, protein miktarı ve ksilanaz aktivitesi değerleri

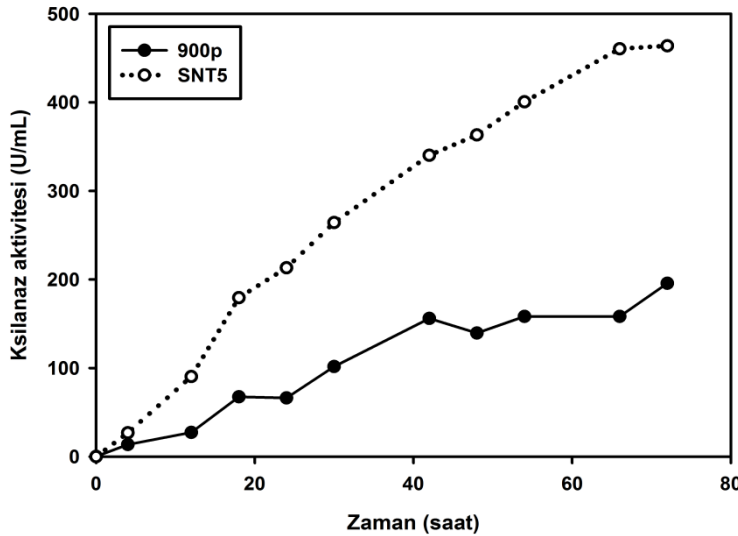
Zaman	Yaş hücre ağırlığı (g/L)		Toplam protein (mg/L)		Ksilanaz aktivitesi (U/mL)	
	900p	SNT5p	900p	SNT5p	900p	SNT5p
-5	116±2,1	112±1,5	56±2,5	50±11,1	17±0,8	14±1,6
0	160±5,2	172±6,4	99±1,1	73±23,2	109±9,6	80±9,3
4	163±6,7	172±4,7	106±2,0	175±31,9	111±3,9	107±15,5
12	182±7,3	180±9,3	124±7,1	215±31,5	547±48,9	387±15,5
18	221±11,4	209±22,8	155±2,7	289±28,3	836±10,3	956±45,1
24	243±9,4	246±7,6	201±5,8	379±74,7	1066±21,9	1544±11,7
30	275±6,7	276±5,4	243±10,5	453±87,0	1775±118,2	2152±3,9
42	354±9,7	366±8,7	320±17,4	617±78,3	2386±154,3	3974±118,6
48	385±7,5	399±5,7	374±4,7	886±147,9	2700±212,1	4798±101,0
54	446±6,6	457±6,2	526±7,3	988±137,8	3468±173,6	6203±159,5
66	512±11,4	521±21,1	680±10,9	1309±185,7	4345±147,8	8519±15,5
72	549±10,3	552±13,0	763±22,5	1409±258,2	4518±167,1	9942±93,2

Fermentör koşullarında karşılaştırıldığında 900 bç *ADH3* promotörü ve SNT5 promotörü ile üretimlerde aynı hücre konsantrasyonlarına ulaşılmıştır ancak SNT5 promotörü ile 72. Saat örneklerinde 2,2 kat daha yüksek ksilanaz aktivitesi ölçülmüştür. Spesifik üretkenlik değerleri 900 bç *ADH3* promotörü için 0,111U/g<sub>wcw</sub>/h iken SNT5 promotörü için 0,242 U/g<sub>wcw</sub>/h olarak hesaplanmıştır.

*ADH3* promotörü (900 bç) ile Sentetik promotör 5 (SNT5) ile erlenmayer koşullarında ksilanaz üretimi fermentörle eş zamanlı yürütülmüş ve aynı saatlerde örnek alınarak karşılaştırılmıştır. Her 12 saatte 1 son konsantrasyonu %1 olacak şekilde etanol indüksiyonu yapılmıştır. Şekil 4.31’de erlenmayer koşullarında 900 bç promotör ve SNT5 promotörü ile elde edilen hücre yoğunlukları OD değışimi ile gösterilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi hücre gelişimi yönünden iki promotör arasında kayda değer bir fark görülmemiştir. Şekil 4.32’de fermentasyon boyunca ksilanaz aktivitesi değışimi görülmektedir. Üretim boyunca kaydedilen OD değeri ve ksilanaz aktivitesi sayısal değeri halinde Çizelge 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.31. Erlenmayer koşullarında hücre OD değeri zamanla değışimi



Şekil 4.32. Erlenmayer koşullarında süpernatant örneklerinde ölçülen ksilanaz aktivitesi

Çizelge 4.2. Erlenmayer örneklerinde (900p ve SNT5p) zamana karşı OD ve ksilanaz aktivitesi değerleri

Zaman	OD değerleri		Ksilanaz aktivitesi (U/mL)	
	900p	SNT5p	900p	SNT5p
4	8,3±0,2	8,4±0,4	14±0,3	27±4,5
12	31,3±0,2	31,4±0,4	27±0,6	90±4,2
18	47,5±0,4	50,0±0,7	68±6,2	179±6,6
24	51,8±0,5	54,7±1,3	66±1,9	213±11,7
30	60,9±2,6	67,2±0,4	102±10,1	264±15,5
42	65,3±1,5	68,8±3,8	156±12,0	340±10,1
48	68,5±2,0	84,0±5,4	140±7,8	363±21,0
54	68,2±1,4	82,0±5,3	158±1,6	401±21,0
66	73,1±3,3	75,8±4,1	158±12,4	460±17,1
72	76,4±2,5	84,2±0,9	196±6,2	464±6,2

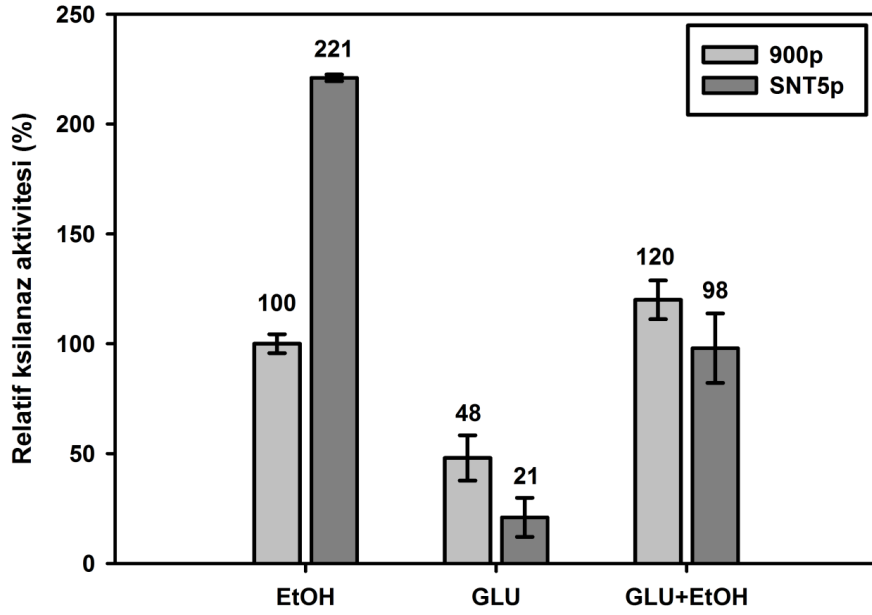
Erlenmayer koşullarında *ADH3* promotörü (900 bç) ve Sentetik 5 (SNT5) promotörü ile elde edilen sonuçlar iki promotör ile ulaşılan hücre yoğunlukları arasında kayda değer bir fark olmadığını göstermiştir. Ancak 72.saatte SNT5 ile 900 bç *ADH3* promotörünün yaklaşık %200'ü düzeyinde ksilanaz aktivitesi elde edilmiştir. Spesifik üretkenlik değerleri 900 bç *ADH3* promotörü için 0,036 U/OD/h iken SNT5 için 0,076 U/OD/h olarak hesaplanmıştır. Erlenmayer koşullarında hesaplanan spesifik üretkenlik oranları fermentör sonuçları ile de uyum göstermektedir.

#### 4.5. *ADH3* Promotörü Üzerine Glukozun Etkisi

Önceki çalışmalarımız *ADH3* promotörünün etanol ile indüklenen bir promotör olduğunu göstermiştir. Bu çalışma kapsamında glukozun *ADH3* promotörü ve en yüksek aktivite gösteren SNT5 promotörü üzerinde represyon etkisinin olup olmadığı erlenmayer koşullarında analiz edilmiştir.

Analizde etanol (%1), glukoz (%2) ve glukoz+etanol (%2 Glu+%1 EtOH) içeren besiyerlerinde *ADH3* promotörü (900 bç) ve SNT5 promotörü ile ksilanaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Öncelikle ön deneme ile örnek alma saati glukozun tükenmediği 4. saat olarak belirlenmiştir. Böylece ortamda glukoz ve etanolün aynı anda bulunduğu koşullarda *ADH3* promotörünün davranışını gözlemlemek mümkün olmaktadır. Ksilanaz aktivitesi ölçümü indirgen şeker ölçümü prensibine dayanan DNS yöntemi ile olduğu için karbon kaynağı olarak eklenen glukoz da absorbans vermektedir. Aktivite ölçümünde ortamda kalan glukozdan kaynaklı absorbansı elimine etmek için, kör örnek olarak 0 dk inkübe edilmiş örnekler kullanılmıştır. Ayrıca bu sayede DNS metodu ile besiyerindeki glukoz miktarı da tayin edilerek, glukoz karbon kaynağının henüz tükenmemiş olduğu da doğrulanmıştır.





Şekil 4.33. *ADH3* promotoru üzerine glukozun etkisi

Daha önceki çalışmalarımızda glukoz ve etanol içeren besiyerlerinde geliştirilen hücrelerden yapılan gen ekspresyon analizi sonucu, *ADH3* promotorunun en yüksek ekspresyon seviyesinin etanol besiyerinde gerçekleştiğini ve etanol ile indüklenen bir gen olduğunu ortaya koymuştur (Veri gösterilmemiştir). Glukoz besiyerinde ise etanole göre daha az ekspresyon tespit edilmiştir. Bu ekspresyonun yapısal olarak çalıştığı tespit edilmiş *ADH2* geninin aktivitesine bağlı olarak glukoz besiyerinde üretilen etanolden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Şekil 4.33’de raportör gen olarak ksılanaz kullanılarak etanol, glukoz ve glukoz+etanol besiyerlerinde kaydedilen *ADH3* (900 bç) ve SNT5 promotorlarının aktiviteleri verilmiştir.

Sonuçlar, 900 bç promotorun glukoz besiyerinde %48 aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. SNT5 promotoru ile elde edilen aktivite ise %21 düzeyindedir. 900 bç promotor ile SNT5 promotoru arasındaki fark, SNT5 promotorunda URS1 (respressör) bölgesinin UAS2 (aktivatör) ile değiştirilmiş olmasıdır. Bu durum, glukoz besiyeri için bu bölgelerin farklı etki edebileceğini göstermiştir. Glukoz+etanol içeren besiyerinde 900 bç promotor ile %120 aktivite elde edilmesi etanol indüksiyonu ile promotor aktivitesinin arttığını göstermektedir. Ancak SNT5 ile glukoz+etanolda aktivite yaklaşık %100 gerçekleşmiş ve glukoz koşullarına göre artmış olsa da etanol koşullarının %50’si düzeydedir. Bu durum glukoz respresyonunu ortaya koymaktadır. Bu sonucun 900 promotorda gözlenmeyip SNT5’de gözlenmesi ise, URS1 bölgesinde glukozun ortamda olduğu koşullarda derepresyonda görev alan upstream elementin bulunabileceğini düşündürmektedir.

## 5. TARTIŞMA

*ADH3* promotörü üzerinde sondan silme analizleri ile promotör aktivitesinin değişmeden devam ettiği en kısa DNA bölgesi tespit edilmiş ve sonuç olarak *P. pastoris ADH3* promotörü 900 bç olarak belirlenmiştir. Bu DNA bölgesi promotörün *ADH3* geni translasyon başlatma kodonuna göre (ATG) pozisyonunu belirtmekte ve -900 ile 0 nükleotitleri arasında kalan bölgeyi kapsamaktadır.

Belirlenen promotör (900 bç) üzerinde gerçekleştirilen sondan ve içten silme analizleri ile elde edilen sonuçlar Ek 8.5’de özetlenmiştir. Sonuçların istatistiksel analizi Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak, sondan silme analizleri ve içten silme analizleri için kendi içinde olmak üzere ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Aynı harfler, değerler arasında önemli bir fark olmadığını ( $p < 0.05$ ) göstermektedir.

Sondan silme analizlerine göre -900 ila -800 bölgesinin silinmesi promotör aktivitesinde yaklaşık %30 düşüşe neden olmuştur. Bu sonuç, 800 bç promotör ile promotör aktivitesinin %70 korunduğu şekilde de ifade edilebilir. Promotör aktivitesi 700, 600, 500 ve 400 bç DNA bölgelerinde yaklaşık %70 olarak korunmuştur. Yani, -800 ile -400 arasındaki 5’ ucundan silme işlemlerinin promotör aktivitesini artırıcı yada azaltıcı yönde etkisi olmamıştır. Promotör aktivitesi 300 bç promotör ile yaklaşık %130 olurken 200 bç promotör ile yaklaşık %95, 100 bç promotör ile de yaklaşık %6 olmuştur.

Represör bölgenin silinmesi promotör aktivitesinde artışa neden olurken, aktivatör bölgenin silinmesi ise promotör aktivitesinde düşüşe neden olmaktadır. Elde edilen sonuca göre, promotör aktivitesinin 400 bç promotör ile %70 olurken 300 bç promotör ile %130 olması -400 ile -300 nükleotitleri arasında represör bölge bulunabileceğini göstermektedir. 200 bç promotör ile %95 promotör aktivitesi sağlanmıştır ancak 300 bç promotora göre aktivitede %35 düzeyinde bir düşüş gözlenmiştir. Bu durum, -300 ila -200 arasında aktivatör bir bölgenin bulunabileceğini göstermiştir. Sondan silme işlemi sırasında promotör aktivitesinde gözlenen artış ve düşüşler regülatör bölgeler hakkında fikir verebilmektedir ancak daha kesin sonuç elde edebilmek için içten silme analizleri gerekmektedir.

İçten silme analizi sonuçları *ADH3* promotörünün aktivitesinin düzenlenmesinde *ADH3* promotörü üzerinde 0 ila 99 (-900 ila -801), 462 ila 561 (-438 ila -339), 539 ila 638 (-361 ila -262), 616 ila 715 (-284 ila -185), 693 ila 792 (-207 ila -108) ve 770 ila 814 (-130 ila -86) nükleotitleri arasındaki mutasyonların etkili olduğunu göstermiştir.

Elde edilen sonuçlara göre 0 ila 99 (-900 ila -801) nükleotitleri arasındaki silme işlemi promotör aktivitesinde yaklaşık %30 düzeyinde bir düşüşe neden olurken, promotörün 462 ila 561 (-438 ila -339) nükleotitleri arasındaki silme işlemi promotör aktivitesinde yaklaşık %20; 616 ila 715 (-284 ila -185) bölgesinin silinmesi yaklaşık %70; 693 ila 792 (-207 ila -108) bölgesinin silinmesi yaklaşık %70; 770 ila 814 (-130 ila -86) bölgesinin silinmesi yaklaşık %30 düşüşe neden olmuştur. İçten silme analizleri sonucunda promotör aktivitesinde düşüşe neden olan bu bölgeler, promotör aktivitesinde pozitif regülasyondan sorumlu (UAS, Upstream Activator Site) olan bölgelerdir.

*ADH3* promotörü üzerinde 539 ila 638 (-361 ila -262) nükleotitleri arasında içten silme işlemi *ADH3* promotör aktivitesinde %63 artışa neden olmuştur. Silinmesi promotör aktivitesinde artışla sonuçlanan bu bölge promotör aktivitesinde negatif regülasyondan sorumlu (URS, Upstream Repressor Site) bir bölgedir.

İçten silme analizleri ile sondan silme analizleri karşılaştırıldığında; içten silme analizleri ile silinen 539 ila 638 (-361 ila -262) nükleotitleri arasında içten silme işlemi *ADH3* promotör aktivitesinde %63 artışa neden olurken; sondan silme analizlerinde -400 ile -300 arasındaki bölgenin silinmesi promotör aktivitesinde yaklaşık olarak %70'den %130'a olmak üzere %60 artış sağlamıştır. Dolayısıyla içten silme ve sondan silme analizi sonuçları birbirleri ile örtüşmektedir.

Sondan silme analizleri ile 700, 600, 500, ve 400 bç *ADH3* promotörleri arasında istatistiksel olarak birbirlerine göre aktivite farkı görülmemiştir ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar bu bölgelerde promotör aktivitesini düzenleyici bir bölge bulunmadığı göstermektedir. Ancak 700, 600, 500 ve 400 promotörlerinin aktiviteleri birbirine göre fark göstermezken 900 bç promotora göre fark göstermiştir ( $p < 0.05$ ). Bu bölgeler ile 900 bç promotör arasındaki yaklaşık %30 düzeyindeki aktivite farkı bu promotörlerde 900-800 arasındaki aktivite düşüşünün etkisine bağlı olarak, sondan silme analizlerinde görülen kümülatif etki ile açıklanabilir. Nitekim içten silme analizleri ile *ADH3* promotörü -700 ila -400 arasındaki DNA bölgesi silindiğinde promotör aktivitesi %94 düzeyinde korunmuştur. Ayrıca B, C, D, E ve F bölgelerinde gerçekleştirilen içten silme analizi sonucunda promotör aktivitesi üzerinde doğal 900 bç *ADH3* promotörüne göre istatistiksel olarak fark gözlenmemiştir ( $p < 0.05$ ).

Mutant promotör sekanslarının protein ekspresyonu verimi konukçu genomuna entegre olan ekspresyon kaseti sayısına bağlı olarak değişebilir. *ADH3* promotörü üzerinde -400 ila 0 nükleotitleri arasındaki DNA bölgesini (400 bç) promotör olarak içeren ekspresyon kasetininin 2 kopya halinde entegre olduğu klonda tek kopya içeren klona göre protein üretiminde artış gözlenmiştir (Sonuç gösterilmemiştir). Ancak literatürde artan kopya sayıları ile farklı sonuçlar gözlemleyen çalışmalar mevcuttur (Clare vd 1991, Vassileva vd 2001, Hohenblum vd 2004, Inan vd 2005, Zhu vd 2009, Ruth vd 2010). Dolayısıyla her yeni promotör ve bu promotörün regülasyonu altında üretilecek her yeni protein için en iyi üreten kopya sayısının farklı olacağı sonucuna varılabilir.

Silme analizlerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda 900 bç *ADH3* promotörü üzerinde:

- nükleotit 0 ila 99 (-900 ila -801) UAS1
- nükleotit 616 ila 792 (-284 ila -108) UAS2
- nükleotit 539 ila 638 (-361 ila -262) URS1 olarak tanımlanmıştır.

Belirlenen aktivatör (UAS1 ve UAS2) bölgeler kullanılarak beş farklı sentetik promotör oluşturulmuştur. Oluşturulan tüm sentetik promotörlerde *ADH3* promotörü TATA kutusunu içeren nükleotit 792 ila 900 (-108 ila 0) bölgesi bulunmaktadır. Ek 8.6'da sentetik promotörleri oluşturan bölgeler, bu bölgelerin birleştirilmesinde kullanılan enzim tanıma bölgeleri ve promotörler ile elde edilen aktivite değerleri verilmiştir. Oluşturulan sentetik promotörler ile yaklaşık %60 ila %200 düzeyinde aktivite elde edilmiştir. En yüksek aktivite SNT4 ve SNT5 ile gözlenmiştir. Fermentör

çalışmalarına SNT5 ile devam edilmiştir. SNT5 promotorunda EK 8.6'da da görüldüğü gibi 900 promotor üzerindeki URS bölgesi UAS2 ile değiştirilmiştir ve erlenmayer koşullarında 900 bç promotora göre %200 düzeyinde aktivite kaydedilmiştir.

Marx vd (2009) gen kopya sayısını arttırarak protein üretimini arttırdıklarında biyokütle veriminde düşüş gözlemişlerdir. Aynı çalışma grubunun bir sonraki çalışmasında birincil metabolizmada rol oynayan genler üzerine çalışarak çoklu kopyanın olumsuz etkisini ortadan kaldırmaya çalışmışlardır (Nocon vd 2014). Dolayısıyla hücrede rekombinant protein üretiminin yüksek düzeylere ulaşması hücrenin birincil metabolizması üzerine etki ederek, gelişimini etkileyebilmektedir. Bu tez çalışmasında hem erlenmayer koşullarında hem de fermentör koşullarında alınan sonuçlar 900 bç doğal *ADH3* promotoru ile 2 kat spesifik üretkenlik (U/g<sub>wcw</sub>/h) gösteren SNT5 promotorunun biyokütle artışı arasında kayda değer bir fark göstermemektedir.

Bu tez çalışmasında 900 bç *ADH3* promotoru ve SNT 5 promotoru ile fermentör koşullarında erlenmayer koşullarının yaklaşık 20 katı düzeyinde aktivite elde edilmiştir. Bu sonuç 1200 bç *ADH3* promotoru ile yapılan önceki çalışmamız (Karaoglan 2016b) ile de uyum göstermektedir. Ayrıca önceki çalışmada (Karaoglan 2016b) 1200 bç *ADH3* promotoru için spesifik üretkenlik değeri 0,126 U/g<sub>wcw</sub>/h iken bu çalışmada 900 bç *ADH3* promotoru için 0,111U/g<sub>wcw</sub>/h, SNT5 promotoru için 0,242 U/g<sub>wcw</sub>/h olarak hesaplanmıştır.

Çalışmada ayrıca *ADH3* promotoru üzerine glukozun etkisi erlenmayer koşullarında araştırılmıştır. Bu amaçla 900 bç *ADH3* promotoru ve SNT5 promotoru kullanılarak raportör protein ksilanaz üretilmiştir. Sonuçlar 900 bç *ADH3* promotoru ve SNT5 promotoru için promotor aktivitesindeki artış ve azalış yönünden birbirine paralel olsa da represyon/derepresyon düzeylerinde farklılık gözlenmiştir. Bu farklılığın iki promotor arasındaki tek değişiklik olan URS1 bölgesine bağlı olduğu düşünülmektedir. URS1 bölgesinde glukozun ortamda olduğu koşullarda derepresyonda görev alan bir upstream elementin bulunabileceğini düşünülmektedir. Doğal *ADH3* promotorunun davranışı izlendiğinde glukoz besiyerinde yaklaşık %50 düzeyinde promotor aktivitesi gösterirken, glukoz+etanol besiyerinde aktivite düzeyinin %120'ye ulaştığı gözlenmiştir. Glukoz besiyerinde gözlenen düşük promotor aktivitesi daha önceki çalışmalarımız kapsamında yapılan etanol ve glukoz besiyerinde gelişen hücrelerde yapılmış gen ekspresyon analizi sonuçları ile de örtüşmektedir.

## 6. SONUÇLAR

1. Çalışma kapsamında *ADH3* promotor bölgesi sondan silme analizleri ile 900 bç olarak belirlenmiştir.
2. İçten silme analizleri ile *ADH3* promotorunun pozitif ve negatif yönde düzenlenmesinde rol oynayan DNA dizileri (UAS1, UAS2 ve URS1) belirlenmiştir.
3. Belirlenen pozitif düzenleyici DNA dizileri kullanılarak 5 farklı sentetik promotor (SNT1-5) oluşturulmuş ve doğal *ADH3* promotorunun % 170'i ile %200'ü arasında promotor gücü elde edilmiştir.
4. En yüksek promotor aktivitesi gösteren sentetik promotor SNT5 ile doğal *ADH3* promotoru (900 bç) fermentör koşullarında karşılaştırılmıştır.
5. Doğal *ADH3* promotoru ve SNT5 promotoru üzerine glukoz karbon kaynağının etkisi araştırılmıştır ve URS1 bölgesinde glukoz derepresyonunda rol oynayan bir upstream element bulunabileceği öngörülmüştür.
6. Çalışma kapsamında etanol ile indüklenen farklı güçlerde (%6 ila %200 aralığında değişen) *ADH3* promotorları elde edilmiştir.
7. Çalışmada kullanılan yöntem, farklı promotor çalışmaları için de uygulanabilir bir yöntem olup, farklı promotorlar için yapılacak çalışmalara örnek niteliğindedir.
8. *P. pastoris* etanol metabolizması henüz tam olarak aydınlatılmamış bir mekanizmadır. Çalışmada kullanılan *ADH3* promotoru, *P. pastoris* etanol metabolizmasında etanol tüketiminden sorumlu tek gen olan *ADH3* geninin regülasyonundan sorumludur. Bu çalışma *ADH3* promotorunun düzenlenmesinde görev alan proteinlerin belirlenmesi için yol gösterici önemli veriler sunmaktadır ve dolayısıyla etanol metabolizmasının açığa kavuşturulmasında önemli rol oynamaktadır.
9. Çalışmada sunulan veriler ve gösterilen örnek yöntem doğrultusunda farklı sentetik promotorlar oluşturmak mümkündür. Bu sayede rekombinant protein üretimleri için istenilen farklı güçte promotorların oluşturulmasını da mümkün kılmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

- AHMAD, M., HIRZ, M., PICHLER, H. and SCHWAB H. 2014. Protein expression in *P. pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 98: 5301-5317.
- ALPER, H., FISCHER, C., NEVOIGT, E. and STEPHANOPOULOS, G. 2005. Tuning genetic control through promoter engineering. *PNAS*, 102: 36, 12678-12683.
- BALAMURUGAN, V., REDDY G.R. and SURYANARAYANA V.V.S. 2007. *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins-Vaccines. *Indian J Biotechnol.*, 6: 175-186.
- CHIEN, L.J., LEE, C.K. 2005. Expression of bacterial hemoglobin in the yeast, *Pichia pastoris*, with a low O<sub>2</sub>-induced promoter. *Biotechnol Lett.*, 27: 19, 1491-1497.
- CHO, J.Y and JEFFRIES, T.W. 1998. *P. stipitis* genes for alcohol dehydrogenase with fermentative and respiratory functions. *Appl Environ Microb.*, 81: 1350-1358.
- CEREGHINO J.L and CREGG J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS MicrobiolRev*, 24: 45-66.
- CLARE, J.J., ROMANOS M.A., RAYMENT F.B., ROWEDDER, J.E., SMITH, M.A., PAYNE, M.M., SREEKRISHNA, K. and HENWOOD, C.A. 1991. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene*, 105: 205–212.
- COS, O., RAMÓN, R., MONTESINOS, J.L. and VALERO, F. 2006. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microb Cell Fact.* 5: 17.
- CREGG, J.M., TSCHOPP, J.F., STILLMAN, C., SIEGEL, R., AKONG, M., CRAIG, W.S., BUCKHOLZ, R.G., MADDEN, K.R., KELLARIS, A., DAVIS, G.R., SMILEY, B.L., CRUZE, J., TORREGROSSA, R., VELICELEBI, G. and THILL, G.P. 1987. High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol.*, 5: 479-485.
- CREGG, J.M., VEDVICK, T.S. and RASCHKE, W.C. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology*, 11: 905-10.
- CREGG J.M. 2007. *Pichia* Protocols, *Methods in Molecular Biology*, 389, 2nd edition, Humana Press Inc., Totowa, NJ. 1-10
- CREGG, J.M. and TOLSTORUKOV, I. 2012. *P. pastoris ADH* promoter and use thereof to direct expression of proteins. United States patent US 8,222,386.

- D'ANJOU, M.C. and DAUGULIS, A.J. 2001. A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnol Bioeng.*, 72: 1-11.
- DALY, R. and HEARN M.T.W. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit.*, 18: 119–138.
- DE SCHUTTER, K., LIN, Y.C., TIELS, P., VAN HECKE, A., GLINKA, S., WEBER-LEHMANN, J., ROUZE P., PEER, Y., VAN, D.E. and CALLEWAERT N. 2009. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol*, 27 (6): 561-566.
- DIETZSCH, D., SPADIUT, O. and HERWIG, C. 2001. A dynamic method based on the specific substrate uptake rate to set up a feeding strategy for *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact.*, 10:14.
- DONOVIEL, M.S., KACHEROVSKY, N. and YOUNG, E.T. 1995. Synergistic activation of ADH2 expression is sensitive to upstream activation sequence 2 (UAS2) orientation, copy number and UAS1–UAS2 helical phasing. *Mol Cell Biol.*, 15: 3442–3449.
- FREDLUND, E., BLANK, L.M., SCHNURER, J., SAUER, U. and PASSOTH, V. 2004. Oxygen- and glucose-dependent regulation of central carbon metabolism in *Pichia anamola*. *Appl Environ Microb.*, 71: 5905-5911.
- HARTNER, F.S., RUTH, C., LANGENEGGER, D., JOHNSON, S.N., HYKA, P., LIN-CEREGHINO, G.P., LIN-CEREGHINO, J., KOVAR, K., CREGG, J.M. and GLIEDER, A. 2008. Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.*, 36: 12, e76.
- HOHENBLUM, H., GASSER, B., MAURER, M., BORTH, N. and MATTANOVICH, D. 2004. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.*, 85: 367–375.
- IDIRIS, A., TOHDA, H., KUMAGAI, H. and TAKEGAWA, K. 2010. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 86:403–417.
- INAN, M. and MEAGHER, M.M. 2001. Non-Repressing Carbon Sources for Alcohol Oxidase (AOX1) Promoter of *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng*, 92: 6, 585-589.
- INAN, M., FANDERS, S.A., ZHANG, W., HOTEZ, P.J., ZHAN, B. and MEAGHER, M.M. 2005. Saturation of the secretory pathway by overexpression of a hookworm (*Necator americanus*) protein (Na-ASP1). *Pichia Protocols, Methods in Molecular Biology*, 389, 2nd edition, Humana Press Inc., Totowa, NJ. 65-75.

- INAN, M., ARYASOMAYAJULA, D., SINHA, J. and MEAGHER, M.M. 2006. Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. *Biotechnol Bioeng.*, 93: 4.
- INAN, M., FANDERS, S.A., ZHANG, W., HOTEZ, P.J., ZHAN, B. and MEAGHER, M. 2007. Saturation of the secretory pathway by overexpression of a hookworm (*Necator americanus*) protein (Na-ASP1). *Pichia Protocols*, 2nd Ed., Humana Press, New Jersey, 65-75.
- JUNGO, C., MARISON I., VE STOCKAR U.V. 2007. Regulation of alcohol oxidase of a recombinant *Pichia pastoris* Mut<sup>+</sup> strain in transient continuous cultures. *J Biotechnol.*, 130, 236-246.
- KARAOĞLAN, M., ERDEN KARAOĞLAN, F. and INAN, M. 2016a. Functional analysis of alcohol dehydrogenase (*ADH*) genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett.*, 38: 463-469.
- KARAOĞLAN, M., ERDEN KARAOĞLAN, F. and INAN, M. 2016b. Comparison of *ADH3* promoter with commonly used promoters for recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, 121: 112-117.
- KOLLER, A., VALESCO, J. and SUBRAMANI, S. 2000. The CUP1 promoter of *Saccharomyces cerevisiae* is inducible by copper in *Pichia pastoris*. *Yeast*, 16: 651-656
- LIANG, S., CHENGJUAN Z., LIN Y., ZHANG X. and YE Y. 2013. Identification and characterization of P<sub>GCW14</sub>: a novel, strong constitutive promoter of *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett.*, 35: 1865-1871.
- MACAULEY-PATRICK, S., FAZENDA, M.L., MCNEIL, B. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22: 249-270.
- MATTANOVICH, D., GRAF, A., STADLMANN, J., DRAGOSITS, M., REDL, A., MAURER, M., KLEINHEINZ, M., SAUER, M., ALTMANN, F. and GASSER, B. 2009. Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*, 2 (8): 29.
- MARX, H., MECKLENBRÄUKER, A., GASSER, B., SAUER, M. and MATTANOVICH, D. 2009. Directed gene copy number amplification in *Pichia pastoris* by vector integration into the ribosomal DNA locus. *FEMS Yeast Res.*, 9: 1260-1270.
- NOCON, J., STEIGER, M.G., PFEFFER, M., SOHN, S.B., KIM, T.Y., MAURER, M., RUßMAYER, H., PFLUGL, S., ASK, M., HABERHAURER-TROYER, C., ORTMAYR, K., HANN, S., KOELLENSPERGER, G., GASSER, B., LEE, S.Y. and MATTANOVICH. 2014. Model based engineering of *Pichia pastoris*



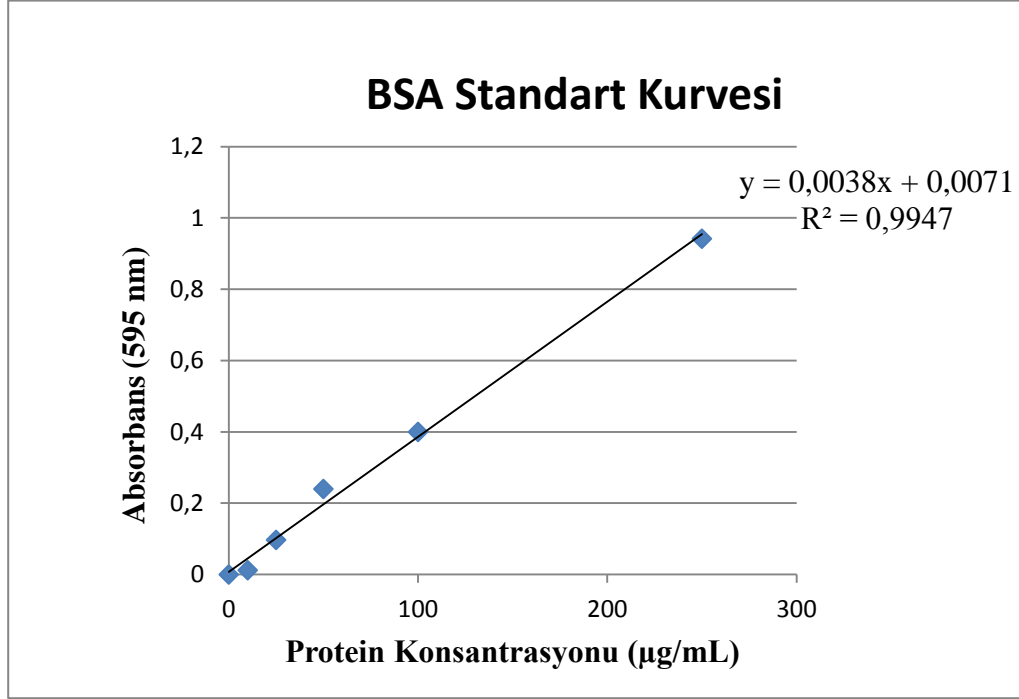
- central metabolism enhances recombinant protein production, *Metab Eng.*, 24: 129-138.
- PORRO, D., SAUER, M., BRANDUARDI, P. and MATTANOVICH, D. 2005. Recombinant protein production in yeasts. *Mol. Biotechnol.*, 31: 245-259.
- POTGIETER, T.I., CUKANB, M., DRUMMONDA, J.E., HOUSTON-CUMMINGS, N.R., JIANG, Y., LI, F., LYNAUGHB, H., MALLEMB, M., MCKELVEYA, T.W., MITCHELL, T., NYLENB, A., RITTENHOUR, A., STADHEIMB, T.A., ZHA, D. and D'ANJOU, M. 2009. Production of monoclonal antibodies by glycoengineered *Pichia pastoris*. *J Biotechnol.*, 139: 318-325.
- POTVIN, G., AHMAD, A. and ZHANG, Z. 2012. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochem Eng J.*, 64: 91-105.
- RUTH, C., ZUELLIG, T., MELLITZER, A., WEIS, R., LOOSER, V., KOVAR, K. and GLIEDER, A. 2010. Variable production windows for porcine trypsinogen employing synthetic inducible promoter variants in *Pichia pastoris*. *Syst Synth Biol.*, 4:181–191.
- QIN, X., QIAN, J., YAO, G., ZHUANG, Y., ZHANG, S. and CHU, J. 2011. GAP promoter library for fine-tuning of gene expression in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol.*, 77: 11, 3600-3608.
- SALIOLA, M., SHUSTER, J.R. and FALCONE, C. 1990. The alcohol dehydrogenase system in the yeast, *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, 6: 3, 193-204.
- SAMBROOK, J. and RUSSEL, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SHEN, S., SULTER, G., JEFFRIES, T.W. and CREGG, J.M. 1998. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 216: 93-102.
- SHUSTER, J., YU, J., COX, D., CHAN, R.V., SMITH, M. and YOUNG, E. 1986. ADR1-mediated regulation of ADH2 requires an inverted repeat sequence. *Mol Cell Biol.*, 6: 1894–1902.
- STRUHL, K. 1989. Molecular mechanisms of transcriptional regulation in yeast. *Annu. Rev. Biochem.*, 58: 1051-1077.
- 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 *P. pastoris*. *Nucleic Acids Res.*, 15: 3859-3876.

- VASSILEVA, A., CHUGH, D.A., SWAMINATHAN, S. and KHANNA, N. 2001. Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.*, 21: 71–80.
- VOGL, T. VE GLIEDER A. 2013. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *New Biotechnol.*, 30: 4, 385-404.
- WALTHER, K. and SCHULLER, H.J. 2001. Adr1 and Cat 8 synergistically activate the glucose-regulated alcohol dehydrogenase gene *ADH2* of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 147: 2037-2044.
- WANG, H., LI, J., LIU, L., LI, X., JIA, D., DU, G., CHEN, J. and SONG, J. 2012. Increased production of alkaline polygalacturonate lyase in the recombinant *Pichia pastoris* by controlling cell concentration during continuous culture. *Bioresource Technol.* 124: 338-346.
- WEINHANDL, K., WINKLER, M., GLIEDER, A. and CAMATTARI, A. 2014. Carbon source dependent promoters in yeasts. *Microb Cell Fact* 13:5.
- WU, S. and LETHWORTH G.J. 2004. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *BioTechniques*, 36: 152-154.
- YU, J., DONOVIEL, M. S. and YOUNG E.T. 1989. Adjacent upstream activation sequence elements synergistically regulate transcription of *ADH2* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 9: 34-42.
- ZHU, T., GUO, M., TANG, Z., ZHANG, M., ZHUANG, Y., CHU, J. and ZHANG, S. 2009. Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*. *J Appl Microbiol.*, 107: 954–963.

## 8. EKLER

## EK 8.1. Primer Listesi

İsim	Dizi	Erime Sıcaklığı [°C]
2000p-F	5'-aaaggatccgaagccaacgtgcagtcgc	75.0
1500p-F	5'-aaaggatccgtcgtcatgtgaaagccca	73.9
1400p-F	5'-aaaggatccttagacaccacgcgataat	67.6
1300p-F	5'-aaaggatcctctcatttatccagtcataa	64.8
1200p-F	5'-aaaggatcctgacggactagaggactct	70.4
1100p-F	5'-aaaggatcctcgcgcaaatgcacgacc	71.9
1000p-F	5'-aaaggatcccgattgccctctacaggcataag	75.0
900p-F	5'-aaaggatccatcccggaggagacttgcc	74.7
800p-F	5'-aaaggatccggggggtgattcggccg	74.2
700p-F	5'-aaaggatccaccaaatctattctcaa	66.2
600p-F	5'-aaaggatccaaattctagaaggggcc	69.0
500p-F	5'-cccggatccatagcagactttttgattcgg	72.0
400p-F	5'-aaaggatccaattcgtgattcccacc	69.0
300p-F	5'-aaaggatcctccgaaaagatctgtgtagt	67.6
200p-F	5'-aaaggatcctcacctgctattgtagac	70.4
100p-F	5'-aaaggatccattcacaattcacctcacta	66.2
ADH3-R	5'-ttcgaagtaaataagataaaaagctagtag	63.0
ADH3F -801	5'-aaaggatccaggggggtgattcggccg	74.4
ADH3R -823	5'-cggtagactgattgtctatgtggggtctctacag	75.5
ADH3F -724	5'-ctgtagagaccccacatagacaaatcagatcaccg	75.5
ADH3R -746	5'-accaatgctaactgcatgattgtcaccccccta	76.6
ADH3F -647	5'-taggggggtgaacaatgcatggcagttagcattggt	76.6
ADH3R -669	5'-ggaattttcaccctcagtagggaccggtgagaa	76.6
ADH3F -570	5'-ttctcaacggcctcatcagggggtgaaaattcc	76.6
ADH3R -592	5'-tgcgaaatcaaaaaagtcagaaattgggttaagg	69.8
ADH3F -493	5'-ccttaaaccaaatctgactttttgattcgcga	69.8
ADH3R -515	5'-ttagcagattcatggcattaagcagcaacttacgg	74.4
ADH3F -416	5'-ccgtaagtgtctgcttaagccatgaatctgctaa	74.4
ADH3R -438	5'-gacatgcagatttcccaggtgagaattgcaatcga	75.5
ADH3F -339	5'-tcgattgcaattctcacctgggagaatctgcatgtc	75.5
ADH3R -361	5'-gtttcaaacagcgggggttgggagttgaaagg	76.6
ADH3F -262	5'-cctttcaactccacaacccccgctgttgaaaac	76.6
ADH3R -284	5'-gatcggggtgacgtctacacagatctttcggaca	76.6
ADH3F -185	5'-tgtccgaaaagatctgtgtagacgtcaaccgcatc	76.6
ADH3R -207	5'-aattgtgaatattagagatgggcacgaattcgcacc	73.2
ADH3F -108	5'-ggtgcgaattcgtgccatctctaatattcacaatt	73.2
ADH3R -130	5'-caggggtatttatagtgattggtgtagcattgggg	74.4
ADH3F -86	5'-ccccaatgatcacaccaatcactataaatcccctg	74.4
ADH3R -700	5'-gtgggaatcaacgaaattgtaacggtgatactga	72.1
ADH3F -400	5'-tcagtatcaccgattaacaattcgtgattcccac	72.1
HIS4618F	5'- caatactacacagggctgatgt	60
HIS41146R	5'-gatggagtcgctttgaagac	58

**EK 8.2. Toplam Protein Miktarının Hesaplanmasında Kullanılan Standart Protein (BSA) Kurvesi**

EK 8.3. *ADH3* Promotoru Sekansı

1	GAAGCCAAAG TTGCAGTCG ACATAAAGCG CAGAAATAGC ATTTCCAAA
51	AGTGGACAAT AATGGGAAGT TGGAAATCTC TTCTATGGCA AACAAATACGC
101	CTCCAATTGG AGAACCGAAG GCCACACCTA CTCCCGCAGC CGTGGCAGCA
151	GTGATGAAAT GTCTCCTATT GAAGGCCAAA CCATTGAAAT ATTTGGAAAA
201	TAAAACACTA GGAACCCACG TACCTACACA GGCAGCATAG TGAACACTAG
251	GTCTTCCTT ACCAACACTC AGTCCAGAGG CGATGACCAA GGGTAACGTC
301	AATGATTGGA TGAAGAAGTGT ACCTTGATTG AGAAATGCCT TGAATCGAA
351	CCCACTAACA ATGATCTTGA TTTCCGATAT CCCTGAACCA GCTGCTGTCT
401	TAGAGTAAGT CTTGACCAAG ATTGCACCAA TTGAGGCCAAA AAGTACACTC
451	CATCCAATGT AGAGCAGATA GCTTGCTGGC CAAGGGTTCC AGAATGGGCA
501	GTGTCATGT GAAAGTCCCA TACAACAAA CTCCCTATT CAAATACCAG
551	CAGTAGAGCA ATACCCGTTT TTGATAGAGG TCAGCCATT CCGAATGATA
601	TTTAGACACC CAGCGATAAT TCCAACGAAA ACTCCGATTG ATGCTAAGCA
651	GAGCCAAATG ATGATCCAGG ATGAAAAACG ATGCTGGTTG GACTTGAGTG
701	TCTCATTAT CCAGTCAATA GTGTCAAAT GATCAAACCG AGCAATTGAT
751	CTGAGGTACC TGGAAATCTC AGAGTTTTTC CAGTACATCG CAGCGTTTTT
801	TGACCGTACT AGAGGACTCT TAGGGGAAGG TAGAATCAAT AAAGATCATA
851	TTAGGTAAGC AAAATTTGGA TGGAAATAGG GACTAGGTGT GGATCCGCGA
901	TCTCGCCAAA TTGCACGACC AGAGTGGATG CCGGATGGTG GTAACCCGTT
951	TCTTCCTTTT TACCACCCAA GTGCGAGTGA AACACCCCAT GCCTGCTCTC
1001	CGATTGCCCC TCTACAGGCA TAAGGGTGTG ACTTTGTGGG CTTGAATTTT
1051	ACACCCCTC CAACTTTTCT CGCATCAAT GATCCTGTTA CCAATATTGC
1101	ATGCCCGAG GAGACTTGCC CCCTAATTTT CCGCGTGT CCGGATCGC
1151	AGGGTGAGAC TGTAGAGACC CCACATAGTG ACAATGATTA TGTAAAGAAG
1201	GGGGGTGAT TCGCCCGCT ATCGAACTCT AACAACTAGG GGGGTGAACA
1251	ATGCCCAGCA GTCCCTCCCA CTCTTTGACA AATCAGTATC ACCGATTAC
1301	ACCCCAAATC TTATTTCAA CCGTCCCTCA TCCTTGCAAC CCTCTTTGGA
1351	CAAATGGCAG TTAGCATTGG TGCCTGACT GACTGCCCAA CCTTAAACCC
1401	AAATTTCTTA GAAGGGGCC ATCTAGTTAG CGAGGGTGA AAAATTCCTC
1451	CATCGGAGAT GTATTGACC TAAGTTGCTG CTTAAAAAAA ATCAGTTGAG
1501	ATAGCGAGAC TTTTTTGATT TCGCAACGGG AGTGCCTGTT CCATTGATT
1551	GCAATTCTCA CCCCTTCTGC CCAGTCTGC CAATTGCCA TGAATCTGCT
1601	AAATTTGTTG ATTTCCACCC CCCTTTCCAA CTCCACAAA TGTCCAATCT
1651	CGTTTTCCAT TTGGGAGAAT CTGCATGTGC ACTACATAAA GGGACCGGTG
1701	TCCGAAAAGA TCTGTGTAGT TTTCAACATT TTGTGCTCCC CCGCTGTTT
1751	GAAAACGGGG GTGAGCGCTC TCCGGGTGC GAATTCGTGC CCAATTCCTT
1801	TCACCTGCC TATTGTAGAC GTCAACCCG ATCTGGTGGC AATATAGCGC
1851	ACCCCAATG ATCACACCAA CAATTTGCTC ACCCTCCCC AATCTCTAAT
1901	ATTCACAAT CACCTCACTA TAAATACCCC TGCTCTGCTC CCAAATCTT
1951	TTTTCTTCT TCCATCAGCT ACTAGCTTTT ATCTTATTTA CTTTACGAAA

The diagram shows the sequence of the *ADH3* promoter region with brackets indicating lengths of 2000 bp, 1500 bp, 1000 bp, and 500 bp. The sequence is color-coded: blue for positions 1-951, green for 1001-1451, and black for 1501-1951. A grey arrow points to the start of the green region at position 1001.

## EK 8.4. Sentetik Promotorların DNA Dizileri

### ADH3-SNT1

atgcccggagg agacttgcccc ctaatttcgcg gcgctgtcccg  
gatcgcagggt gagactgtaga gacccacata gtgacaatgat  
tatgtaagaag tctagatagtt ttcaacatddd gtgctcccccc  
gctgtttgaaa acgggggtgag cgctctccggg gtgccaattcg  
tgcccaattcc tttcaccctgc ctattgtagac gtcaaccgca  
tctggtgcaaa tatagcgcacc cccaatgatca caccaacaatt  
ggtccaccct ccccaatctct aatattcaca ttcacctcact  
ataaatacccc tgcctgtctcc caaattctddd ttccttctcc  
atcagctacta gcttttatctt atttactttac gaaa

### ADH3-SNT2

tagttttcaac attttgtgctc cccccgctgtt tgaaaacgggg  
gtgagcgtct cgggggtgca attcgtgcca attcctttcac  
cctgcctattg tagacgtcaac ccgcatctggt gcgaatatagc  
gcacccccaat gatcacaccaa caattggtcca cccctcccaa  
aagcttttagtt ttcaacatddd gtgctcccccc gctgtttgaaa  
acgggggtgag cgctctccggg gtgccaattcg tgcccaattcc  
tttaccctgc ctattgtagac gtcaaccgca tctggtgcaaa  
tatagcgcacc cccaatgatca caccaacaatt ggtccaccct  
cccaatctct aatattcaca ttcacctcact ataaatacccc  
tgcctgtctcc caaattctddd ttccttctcc atcagctacta  
gcttttatctt atttactttac gaaa

### ADH3-SNT3

atgcccggagg agacttgcccc ctaatttcgcg gcgctgtcccg  
gatcgcagggt gagactgtaga gacccacata gtgacaatgat  
tatgtaagaag tctagatagtt ttcaacatddd gtgctcccccc  
gctgtttgaaa acgggggtgag cgctctccggg gtgccaattcg  
tgcccaattcc tttcaccctgc ctattgtagac gtcaaccgca  
tctggtgcaaa tatagcgcacc cccaatgatca caccaacaatt  
ggtccaccct ccccaaaagct ttagttttcaa cttttgtgct  
cccccgctgt ttgaaaacggg ggtgagcgtc tccgggtgag  
aattcgtgcc aattcctttca ccctgcctatt gtagcgtcaa  
ccgcatctgg tgccaatatag cgcacccccaa tgatcacacca  
acaattggtcc acccctccca atctctaata tcacaattcac  
ctcaactataaa taccctgtcc tgcctccaaat tctttttct  
tcttccatcag ctactagcttt tatcttattta ctttacgaaa

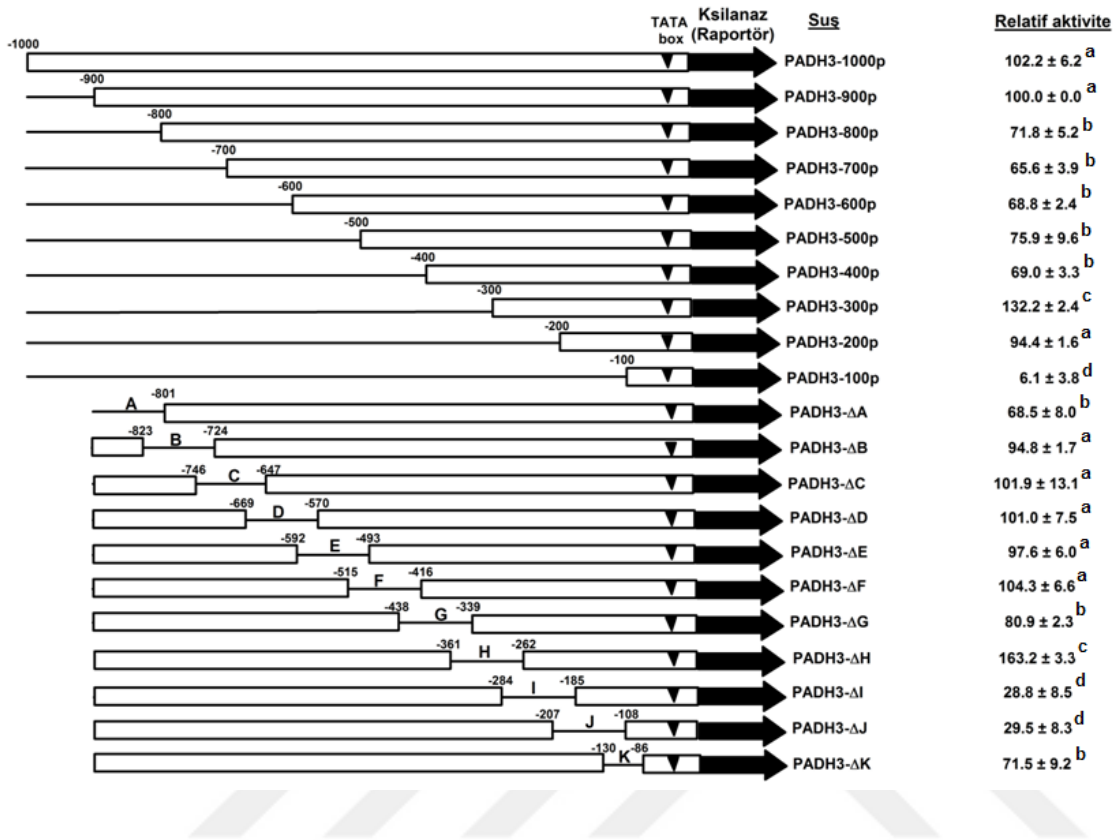
**EK 8.4. Sentetik Promotorların DNA Dizileri (Devamı)****ADH3-SNT4**

atgcccgagg agacttgcccc ctaatttcgcg gcgtcgtcccc  
 gatcgagggt gagactgtaga gacccacata gtgacaatgat  
 tatgtaagaag tctagatagtt ttcaacatttt gtgctccccc  
 gctgtttgaaa acgggggtgag cgctctccggg gtgcaattcg  
 tgcccaattcc ttccacctgc ctattgtagac gtcaaccgca  
 tctggtgcgaa tatagcgacc ccaatgatca caccaacaatt  
 ggtccaccct ccccaagagct ctagttttcaa cattttgtgct  
 cccccgctgt ttgaaaacggg ggtgagcgctc tccggggtgcg  
 aattcgtgccc aattcctttca ccctgcctatt gtagacgtcaa  
 cccgcatctgg tgcaatatag cgacccccaa tgatcacacca  
 acaattggtcc acccctccca aaagctttagt tttcaacattt  
 tgtgctccccc cgctgttgaa aacgggggtga gcgctctccgg  
 ggtgcaaatc gtgcccaattc cttccacctg cctattgtaga  
 cgtcaaccgca atctggtgoga atatagcgac ccccaatgatc  
 acaccaacaat tgggtccacccc tcccacatctc taatattcaca  
 attcacctcac tataaataacc ctgtcctgctc ccaaattcttt  
 tttccttcttc catcagctact agcttttatct tatttacttta  
 cgaaa

**ADH3-SNT5**

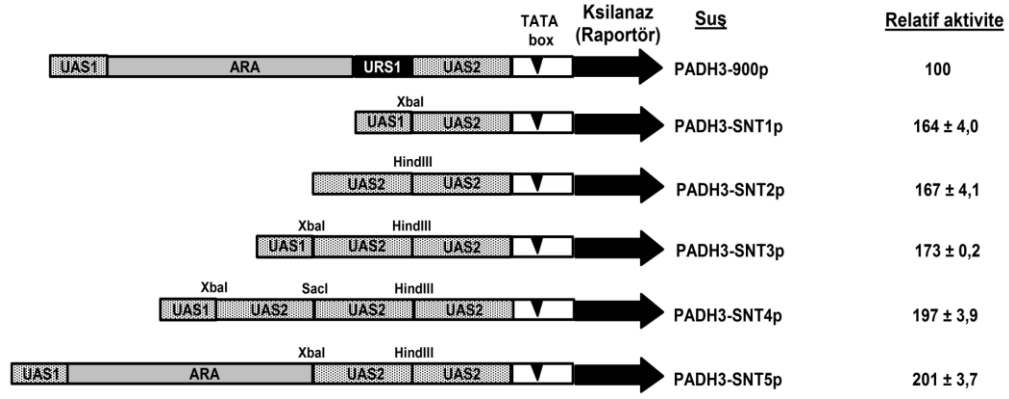
atgcccgagg agacttgcccc ctaatttcgcg gcgtcgtcccc  
 gatcgagggt gagactgtaga gacccacata gtgacaatgat  
 tatgtaagaag aggggggtgat tggccggcta tcgaactctaa  
 caactaggggg gtgaacaatgc ccagcagctct ccccaactctt  
 gacaaatcagt atcaccgatta acaccccaaat cttattctcaa  
 cgggtccctcat ccttgaccccc tctttggacaa atggcagttag  
 cattggtgcac tgactgactgc ccaaccttaaa cccaaatttct  
 tagaaggggcc catctagttag cgaggggtgaa aaattcctcca  
 tcggagatgta ttgaccgtaag ttgctgcttaa aaaaaatcagt  
 tcagatagcga gacttttttga tttcgcaacgg gagtgcctggt  
 ccattcgattg caattctcacc cctctgcccga gtctgccaat  
 tgcccataat ctgctaatttc gttgattccca cccccctttcc  
 aactccacaaa tctagatagtt ttcaacatttt gtgctccccc  
 gctgtttgaaa acgggggtgag cgctctccggg gtgcaattcg  
 tgcccaattcc ttccacctgc ctattgtagac gtcaaccgca  
 tctggtgcgaa tatagcgacc ccaatgatca caccaacaatt  
 ggtccaccct ccccaaaagct ttagttttcaa cattttgtgct  
 cccccgctgt ttgaaaacggg ggtgagcgctc tccggggtgcg  
 aattcgtgccc aattcctttca ccctgcctatt gtagacgtcaa  
 cccgcatctgg tgcaatatag cgacccccaa tgatcacacca  
 acaattggtcc acccctccca atctctaatat tcacaattcac  
 ctactataaa taccctgtcc tgetcccaaat tcttttttctc  
 tcttccatcag ctactagcttt tatcttattta ctttacgaaa

### EK 8.5. Sondan silme ve içten silme analizleri ile elde edilen aktivite sonuçlarının şematik gösterimle özeti





### EK 8.6. Sentetik promotorlarla elde edilen aktivite sonuçlarının şematik gösterimle özeti



## ÖZGEÇMİŞ

Fıdan ERDEN KARAOĞLAN 1987 yılında Kdz. Ereğli'de doğdu. İlköğretim ve liseyi Kdz. Ereğli'de tamamladı. 2005 yılında Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı. 2010 yılında Mühendislik Fakültesi ikincisi ve onur öğrencisi olarak Gıda Mühendisi ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2012 yılında ilgili anabilim dalından Bilim Uzmanı ünvanı ile mezun oldu ve Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Doktora öğrenimine başladı. Hala aynı kurumda öğrenimine devam etmektedir.

